

**Freisetzung von Stickstoffmonoxid  
aus Oximen und Dephostatin-Derivaten**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg  
Fachbereich Chemie

vorgelegt von

**Bianca Rickerts**

Hamburg 2005



Gutachter : Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein  
Prof. Dr. Detlef Geffken

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 3. August 2005

Die vorliegende Arbeit  
entstand auf Anregung und unter der Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein**

am Institut für Pharmazie  
der Universität Hamburg

meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die wohlwollende Betreuung und Unterstützung, die freundliche Motivation und die fruchtbaren Diskussionen recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Christine Bostedt möchte ich für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente recht herzlich danken. Durch ihre zahlreichen praktischen und fachlichen Anregungen hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich danke ich Herrn Simon Moch für seine zahlreichen Anregungen zur praktischen Durchführung der Experimente, ohne die ich es oft sehr schwer gehabt hätte. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für seine Geduld, seine Unterstützung und sein Verständnis für meine Arbeit bedanken. Er hat mir in vielen Situationen immer wieder Kraft gegeben, und er war besonders in schwierigen Zeiten eine große Stütze für mich.

Bei Frau Andrea Nicola Lübbe möchte ich mich für die überaus gute Zusammenarbeit bei diversen gemeinsamen Projekten, für die fruchtbaren Diskussionen, die unermüdliche, kritische Durchsicht des Manuskripts sowie die äußerst angenehme und freundschaftliche Atmosphäre recht herzlich bedanken.

Nicht zuletzt danke ich ihr sowie Herrn Dr. Thomas Lemcke, meinem Vater und allen anderen, die mir im Kampf mit meinem Rechner fachlichen und seelischen Beistand geleistet haben, für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Frau Katrin Bennesch und Frau Steffi Jaeger möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken. Ihnen beiden sowie Herrn Dr. Jörg Zimmermann, Herrn Guido Schmeinck, Herrn Andreas Soltau und Frau Dr. Susanne Behnes danke ich recht herzlich für die sehr angenehme Atmosphäre während meines Aufenthaltes am Institut für Pharmazie.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Herrn Rudolf Nohr-Jürgens für seine stete Hilfsbereitschaft in allen praktischen Dingen sowie die häufige Bereitstellung von Nervennahrung richten.

Frau Katharina Wehner danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Ganz herzlich möchte ich Ihr sowie Frau Ilona Schon, Frau Katrin Schlüter, Frau Judith Möllenbeck und Herrn Dr. Albrecht Sakmann für die angenehme Atmosphäre und die interessanten Gesprächsthemen während unserer „Essensrunde“ danken.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an das technische Personal, insbesondere Frau Annette Kloodt und Herrn Bernhard Moll für deren stete Hilfsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit und reibungslosen Ablauf des Studenten-Praktikums beigetragen hat, richten.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Frau Galos und Frau Kulosa für ihre unermüdliche Unterstützung in allen formellen Angelegenheiten.

Frau Johanna Moch danke ich recht herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn Dr. Norbert Gerling möchte ich mich für die freundliche Überlassung der Dephostatin-Derivate und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Uwe Mainz danke ich für die Unterstützung während der Erstellung von diversen Texten in englischer Sprache, die im Laufe dieser Arbeit anfielen, sowie deren kritische Durchsicht.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern recht herzlich bedanken. Sie haben mir durch ihre finanzielle Unterstützung während des Pharmaziestudiums und durch ihr unerschütterliches Vertrauen in meine Fähigkeiten diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

## Abkürzungen

Ang	Angeli's Salz
Asc	Ascorbinsäure
BOX	Benzaldehydoxim
BPOX	Benzophenonoxim
Bu <sub>4</sub> NIO <sub>4</sub>	Tetrabutylammoniumperiodat
CBOX	2-Chlorbenzaldehydoxim
CHOX	Cyclohexanonoxim
CytP450	Cytochrom P450
DBOX	2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim
DPN	Dephostatin
Et-DPN	Ethyl-3,4-dephostatin
FeTFPPCI	5, 10, 15, 20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21 <i>H</i> 23 <i>H</i> -porphyrin-eisen(III)-chlorid
FeTPPCI	5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21 <i>H</i> 23 <i>H</i> -porphyrin-eisen(III)-chlorid
FLOX	9-Fluorennoxim
GTN	Glyceroltrinitrat
<sup>1</sup> HNMR	Protonenresonanzspektroskopie
ISMN	Isosorbitmononitrat
ISMNox	Ketoxim von Isosorbitmononitrat
Me-Et-DPN	4-O-Methoxy-ethyl-3,4-dephostatin
MnTPPCI	5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21 <i>H</i> 23 <i>H</i> -porphyrin-mangan(III)-chlorid
MOX-DPN	Methoxim-3,4-Dephostatin
MW	Mittelwert
NBOX	2-Nitrobenzaldehydoxim
NOS	NO-Synthase
NpN	Nitroprussid-Natrium
PhIO	Iodosobenzol
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
SD	Standardabweichung
TPPCI	Tetraphenyl-porphrin-chlorid

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	
1.1	<b>Einführung</b> .....	1
1.2	<b>Eigenschaften von NO</b> .....	2
1.2.1	Chemische Merkmale.....	2
1.2.2	Physiologische Bedeutung.....	6
1.2.3	Pathophysiologische Bedeutung.....	8
1.3	<b>NO-Biosynthese</b> .....	8
1.4	<b>NO-Pharmaka</b> .....	12
1.4.1	Organische Nitrate.....	12
1.4.2	Molsidomin.....	14
1.4.3	Nitroprussid-Natrium.....	14
1.4.4	NO-Gas.....	15
1.5	<b>Aufgabenstellung</b> .....	16
<b>2.</b>	<b><u>Oxime als NO-Donatoren</u></b> .....	<b>17</b>
2.1	<b>Chemische Eigenschaften der Oxime</b> .....	17
2.2	<b>Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften der Oxime</b> .....	20
2.2.1	Pharmakologie.....	20
2.2.2	Toxikologie.....	21
2.3	<b>Theoretische Betrachtung zur Spaltung der Hydroxyimino-Funktion</b> .....	22
2.4	<b>Die untersuchten Oxime</b> .....	30
2.4.1	Aldoxime.....	30
2.4.1.1	E-Benzaldehydoxim.....	30
2.4.1.2	2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim.....	31
2.4.1.3	2-Chlorbenzaldehydoxim.....	31
2.4.1.4	2-Nitrobenzaldehydoxim.....	32
2.4.2	Ketoxime.....	32
2.4.2.1	Cyclohexanonoxim.....	32
2.4.2.2	Fluorennoxim.....	33
2.4.2.3	Benzophenonoxim.....	34

<b>2.5</b>	<b>Das angewendete Modellsystem</b> .....	35
2.5.1	Cytochrom P450.....	35
2.5.2	Synthetische Porphyrine.....	37
2.5.3	Iodosobenzol.....	39
2.5.4	Kofaktoren und Lösemittel.....	40
2.5.4.1	Kupfer(II)-sulfat.....	40
2.5.4.2	Kaliumhexacyanoferrat(III).....	41
2.5.4.3	Lösemittel.....	41
<b>2.6</b>	<b>Die NO-Messung</b> .....	41
2.6.1	Prinzip der Chemilumineszenzmethode.....	41
2.6.2	Versuchsaufbau.....	42
2.6.2.1	Probenaufgabe.....	43
2.6.2.2	Messung von Nitrit und Nitrat.....	44
2.6.3	Messdurchführung.....	44
2.6.4	Auswertung der Messergebnisse.....	45
<b>2.7</b>	<b>Ergebnisse der NO-Messung</b> .....	45
2.7.1	Aldoxime.....	46
2.7.1.1	E-Benzaldehydoxim.....	46
2.7.1.2	2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim.....	47
2.7.1.3	2-Chlorobenzaldehydoxim.....	48
2.7.1.4	2-Nitrobenzaldehydoxim.....	49
2.7.2	Ketoxime.....	50
2.7.2.1	Cyclohexanonoxim.....	50
2.7.2.2	Fluorennoxim.....	52
2.7.2.3	Benzophenonoxim.....	53
2.7.3	Kinetische Betrachtung.....	54
2.7.3.1	Aldoxime.....	57
2.7.3.2	Ketoxime.....	61
<b>2.8</b>	<b>Ergebnisse der Nitrit-Messung am Beispiel von Fluorennoxim</b> .....	64
<b>2.9</b>	<b>Nachweis der Carbonylverbindung mittels Dünnschichtchromatographie</b> .....	69
2.9.1	Durchführung.....	70
2.9.2	Ergebnisse.....	70

<b>2.10</b>	<b>Nachweis von Hydroxylamin</b> .....	71
2.10.1	Eigenschaften von Hydroxylamin.....	71
2.10.2	Versuchsprinzip und Durchführung.....	76
2.10.3	UV/Vis-Spektroskopie: Oxime.....	79
2.10.4	UV/Vis-Spektroskopie: Hydroxylaminhydrochlorid.....	84
2.10.4.1	Durchführung.....	84
2.10.4.2	Ergebnisse.....	85
<b>2.11</b>	<b>Untersuchung von Hydroxylamin mittels der Chemilumineszenzmethode</b> .....	86
2.11.1	NO-Messung aus Hydroxylaminhydrochlorid.....	86
2.11.2	Nitrit-Messung aus Hydroxylaminhydrochlorid.....	87
<b>2.12</b>	<b>Angeli`s Salz</b> .....	89
2.12.1	Chemische Eigenschaften.....	90
2.12.2	Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften.....	96
2.12.3	Chemilumineszenzbestimmungen.....	97
2.12.3.1	Ergebnisse.....	97
2.12.4	Fluorimetrische Bestimmungen.....	100
2.12.4.1	Versuchsprinzip.....	101
2.12.4.2	Versuchsdurchführung und Ergebnisse.....	103
<b>2.13</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	107
2.13.1	Dünnschichtchromatographie.....	107
2.13.2	Nachweis von Hydroxylamin.....	108
2.13.2.1	Vermessung von Hydroxylamin.....	108
2.13.2.2	Vermessung der Oxime.....	109
2.13.3	Angeli`s Salz.....	113
2.13.3.1	Chemilumineszenzbestimmungen.....	113
2.13.3.2	Fluorimetrie.....	117
2.13.4	Chemilumineszenzbestimmungen:Hydroxylamin, Oxime.....	119
2.13.4.1	Hydroxylamin.....	119
2.13.4.2	Oxime.....	123
<b>2.14</b>	<b>Fazit</b> .....	141
<b>3.</b>	<b>Dephostatine als NO-Donatoren</b> .....	144
<b>3.1</b>	<b>Eigenschaften</b> .....	144

<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der NO-Messung.....</b>	<b>146</b>
<b>3.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>147</b>
<b>4.</b>	<b><u>Zusammenfassung.....</u></b>	<b>149</b>
<b>5.</b>	<b><u>Summary.....</u></b>	<b>153</b>
<b>6.</b>	<b><u>Anhang.....</u></b>	<b>156</b>
<b>6.1</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>156</b>
6.1.1	Geräte.....	156
6.1.2	Verwendete Gase.....	157
6.1.3	Verwendete Spritzen.....	157
6.1.4	Methoden.....	158
6.1.4.1	Chemilumineszenzmethode.....	158
6.1.4.2	Hydroxylamin-Nachweis.....	162
6.1.4.3	Fluorimetrischer Peroxynitrit-Nachweis.....	164
6.1.4.4	Dünnschichtchromatographie.....	165
6.1.5	Pufferlösungen.....	166
6.1.5.1	Herstellung der Pufferlösungen.....	166
6.1.5.2	Einstellung der Pufferlösungen.....	166
6.1.6	Verwendete Substanzen.....	167
<b>6.2</b>	<b>Gefahrenstoffverzeichnis.....</b>	<b>168</b>
<b>6.3</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>170</b>
	<b>Tagungsbeiträge und Publikationen.....</b>	<b>179</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>180</b>

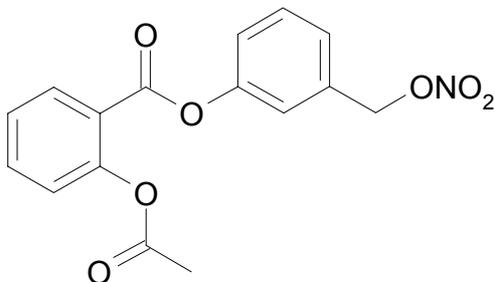
# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Stickstoffmonoxid (NO) freisetzende Arzneimittel sind heutzutage wichtiger Bestandteil der Behandlung der Angina pectoris und anderer Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Diese stellen mit über 4 Millionen Toten pro Jahr die häufigste Todesursache in West-Europa dar.

1980 wurde erstmals von einer endogenen Substanz berichtet, die eine Acetylcholin-induzierte Vasodilatation vermittelt. Diese Gefäß Erweiterung tritt nur bei intaktem Gefäßendothel auf. Zunächst nannte man die Substanz „endothelium-derived-factor“, EDRF <sup>[1]</sup>. Sechs Jahre später bewiesen zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid handelt <sup>[2-4]</sup>. 1998 erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad für die Entdeckung der endothelvermittelten Relaxation durch NO und dessen Wirkmechanismus als Signalmolekül den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Seit dieser Zeit ist Stickstoffmonoxid aus der Fachpresse nicht mehr wegzudenken. Erst kürzlich wurde die Entdeckung der NO-Synthase-Aktivierung durch therapeutische Mengen an Aspirin mit dem „International ASPIRIN<sup>®</sup> Award“ von der Firma Bayer AG an Dr. Nina Grosser von der Universität Halle-Wittenberg und Dr. Leon Iri Kupferwasser vom Sinai Medical Center, Los Angeles, ausgezeichnet.

Auch so genanntes „NO-Aspirin“ <sup>[5]</sup>, ein Hybrid-Molekül bestehend aus Acetylsalicylsäure und einem NO-Donator, als möglicherweise magenschonendere Variante des Schmerzmittels, ist bereits bekannt.



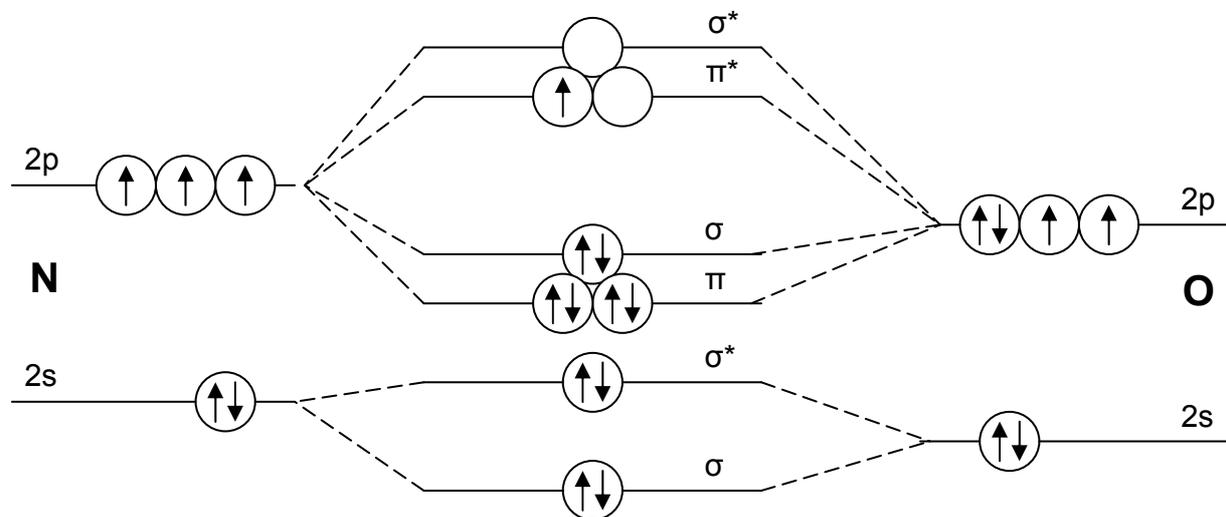
2-Acetoxybenzoessäure-3'-(nitroxymethyl)phenylester

(NO-Aspirin)

## 1.2 Eigenschaften von NO

### 1.2.1 Chemische Merkmale

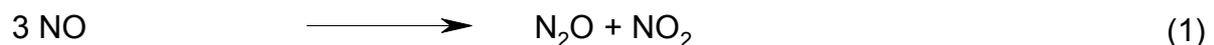
Stickstoffmonoxid (Stickstoffoxid, Stickoxid, NO) besitzt elf Valenzelektronen mit der Elektronenkonfiguration  $(\sigma_1)^2(\sigma_1^*)^2(\sigma_2\pi)^6(\pi^*)$ . Das ungepaarte  $\pi^*$ -Elektron im antibindenden Orbital macht das Molekül paramagnetisch und es resultiert eine Bindungsordnung von 2,5.



**Abbildung 1:** Molekülorbitalmodell des NO im Grundzustand.

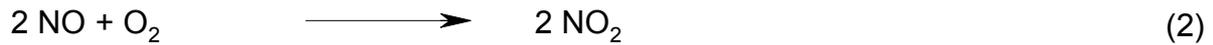
Der radikalische Charakter von NO bedingt die meisten seiner chemischen Reaktionen.

Unter Standardbedingungen ist Stickstoffmonoxid ein farbloses, thermodynamisch instabiles Gas. Unter hohem Druck im Bereich von 30-50°C zerfällt es leicht zu Distickstoffoxid und Stickstoffdioxid. Letzteres ist ein braunes Gas mit ebenfalls radikalischem Charakter:



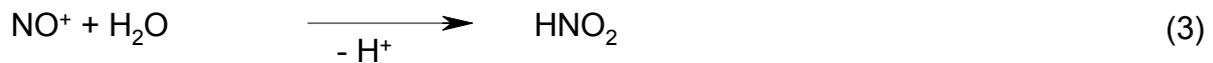
Diese Disproportionierung ist jedoch kinetisch gebremst.

In der Atmosphäre beträgt die Halbwertszeit von NO etwa 24 Sekunden. Mit reinem Sauerstoff und in hoher Konzentration reagiert es spontan zu  $\text{NO}_2$  [6]:



Diese Reaktion verläuft bezogen auf NO nach 2. Ordnung und bezogen auf den Sauerstoff nach 1. Ordnung.

Durch Oxidation und damit Abspaltung des ungepaarten  $\pi^*$ -Elektrons entsteht das Nitrosium-Ion  $\text{NO}^+$ , mit der Oxidationszahl +3.  $\text{NO}^+$  reagiert in wässriger Lösung sofort weiter zu salpetriger Säure:



Durch Reduktion von NO entsteht das Nitroxyl-Anion  $\text{NO}^-$ . Dessen Säure Nitroxyl (Nitrosylhydrid, HNO) dimerisiert sehr rasch zu untersalpetriger Säure ( $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ). Diese ist extrem instabil und bildet sofort unter Wasserabspaltung Distickstoffoxid (Lachgas,  $\text{N}_2\text{O}$ ):

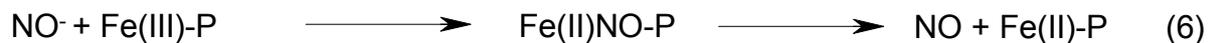


Früher nahm man an, dass diese Reaktion vornehmlich im Sauren stattfindet, da hierfür Nitroxyl benötigt wird. In den ersten Untersuchungen wurde ein  $\text{pK}_a$ -Wert von 4,7 für HNO ermittelt <sup>[7]</sup>. Das bedeutet, dass im neutralen Milieu  $\text{NO}^-$  vorliegen müsste, wodurch die Distickstoffoxid-Bildung nicht stattfinden kann. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der  $\text{pK}_a$ -Wert von HNO sehr viel höher liegt, nämlich bei 11. Daraus resultiert eine nahezu vollständige Protonierung von  $\text{NO}^-$  zu HNO im Neutralen und demnach eine relativ leichte Reaktion gemäß Gleichung (4) zu Distickstoffoxid und Wasser <sup>[8]</sup>.

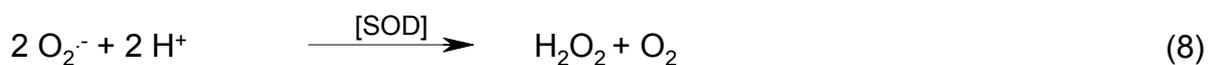
Diese Dimerisierung wird durch geringe Sauerstoff-Mengen katalysiert <sup>[9]</sup>. In Gegenwart von großen Sauerstoff-Mengen kann  $\text{NO}^-$  zu dem toxischen Peroxynitrit reagieren. Diese Reaktion findet vornehmlich im alkalischen Milieu statt:



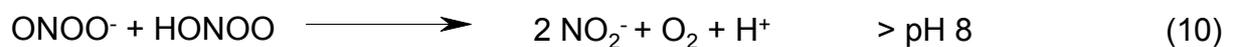
Eine Reduktion von NO zu NO<sup>-</sup> ist unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch benachteiligt und hat somit kaum praktische Bedeutung. Die umgekehrte Reaktion hingegen ist durchaus möglich und wird katalysiert durch Superoxiddismutase (SOD). Jedoch konkurrieren hierbei andere Reaktionen, vor allem die mit Gluthation (GSH, s. 2.12). Diese spielt im Cytosol und anderen GSH-reichen Kompartimenten die größte Rolle. In der Zellmembran hingegen dominiert die Reaktion mit Sauerstoff und mit Eisen(III)-Häm-Proteinen. Letzteres führt zur Bildung von Eisen(II)-NO-Häm-Proteinen. Diese setzen bei ihrem Zerfall NO frei:



Ebenfalls physiologisch bedeutsam ist die Reaktion von NO mit Superoxidradikal-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu Peroxynitrit, da diese dreimal so schnell abläuft wie die Dismutierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, auch wenn diese durch SOD katalysiert wird:

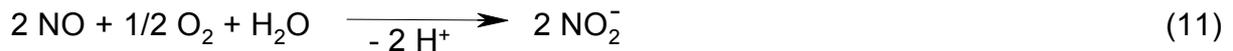


Peroxynitrit zerfällt bei pH-Werten unter 7 überwiegend zu Nitrat, bei pH-Werten über 8 unter Bildung von Nitrit und Sauerstoff:



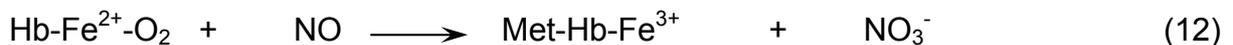
Die Dimerisierungstendenz von NO in der Gasphase ist eher gering, dennoch konnten N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle nachgewiesen werden. Das Dimer wird bei einigen Stickstoffmonoxid-Reaktionen, sowohl in der Gasphase als auch in Lösung, als mögliches Intermediat postuliert, z.B. für die Autoxidation zum Stickstoffdioxid<sup>[10]</sup>.

Die Löslichkeit von NO in Wasser ist mit 1,7 x 10<sup>-3</sup> mol/L relativ gering und ungefähr vergleichbar mit der von molekularem Stickstoff, Sauerstoff und Kohlenmonoxid. In wässrigen Lösungen reagiert NO mit Sauerstoff fast ausschließlich zu Nitrit:



Rein theoretisch kann aus der Reaktion von NO mit Sauerstoff auch Nitrat entstehen. Dieses ist jedoch kinetisch benachteiligt und findet nur in sehr geringem Ausmaß statt.

Dennoch wird in vivo aus NO Nitrat gebildet. Dieses stammt aus der Reaktion mit Oxy-Hämoglobin, wobei Methämoglobin entsteht <sup>[11]</sup>. NO konkurriert dabei mit dem Sauerstoff um die Bindungsstelle am Hämoglobin-Molekül. Diese Reaktion verläuft sehr rasch und wird darum auch als NO-Assay verwendet (Oxyhämoglobin-Assay) <sup>[10]</sup>:

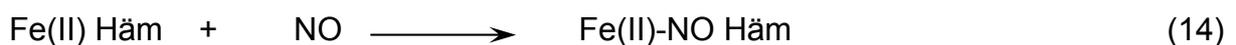


Die beiden letztgenannten Reaktionen sind dafür verantwortlich, dass die Halbwertszeit von NO unter physiologischen Bedingungen nur ca. 5 Sekunden beträgt <sup>[12]</sup>.

Des Weiteren vermag NO mit Thiolen zu S-Nitrosothiolen zu reagieren. Letztere stellen die Haupttransportform für Stickstoffmonoxid über längere Wegstrecken im Organismus dar. Die SH-Gruppen werden u. a. vom Cystein aus Serumalbumin bereitgestellt <sup>[13]</sup>:



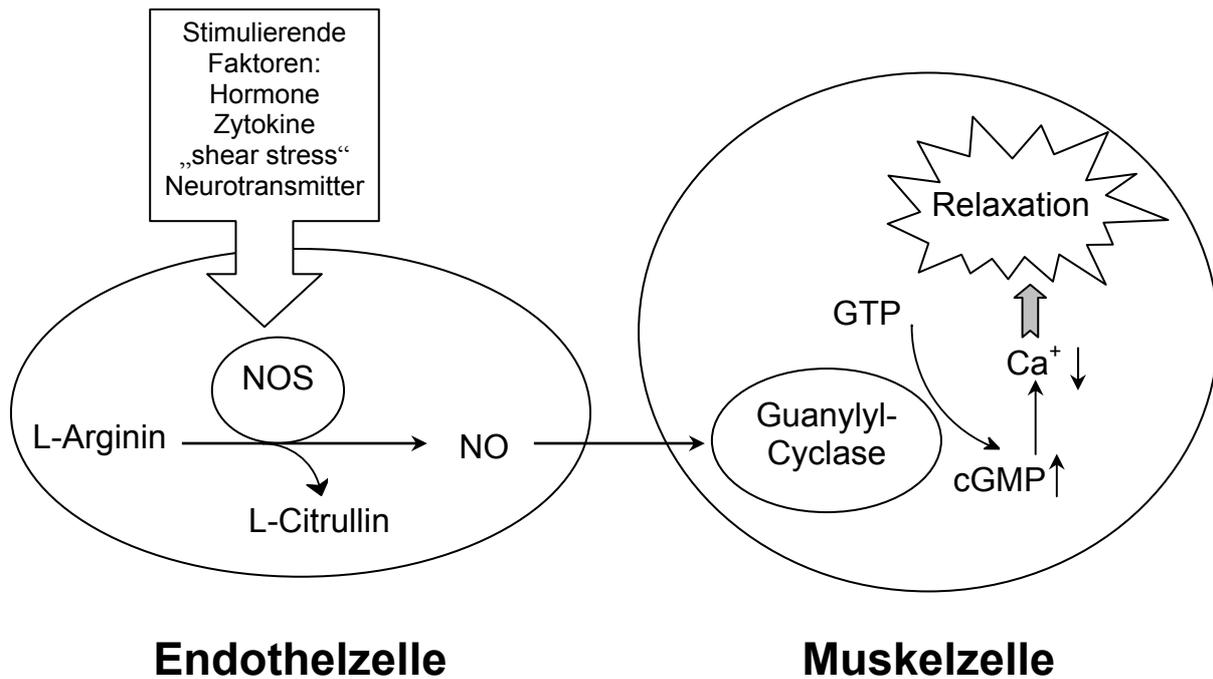
Große physiologische Bedeutung hat auch die Fähigkeit von NO mit Metall-Ionen und metallhaltigen Proteinen zu reagieren, wie das Beispiel der hämhaltigen Guanylyl-Cyclase zeigt, dessen Reaktion mit NO letztlich zur Vasodilatation führt <sup>[14]</sup>:



### 1.2.2 Physiologische Bedeutung

Stickstoffmonoxid ist das kleinste bioaktive Molekül, welches endogen gebildet wird. Es erfüllt im Organismus zahlreiche Aufgaben. Die bekannteste ist seine vasodilatierende Wirkung. Im Gefäßendothel durch die endotheliale NO-Synthase (s. 1.3) gebildet, aktiviert es in der glatten Gefäßmuskulatur die Guanylyl-Cyclase\*, indem es an die Häm-Gruppe des Enzyms bindet. Dabei wird ein Histidin-Rest verdrängt. Daraus resultiert eine erhöhte cGMP-Bildung, welche letztendlich zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation führt <sup>[15]</sup> (s. Abb. 2). Es gibt vielerlei Faktoren, welche in der Lage sind die endogene NO-Synthase zu stimulieren, wie z.B. Testosteron, Bradykinin und Serotonin. Auch durch gesteigerten Blutfluss („shear stress“) kann die NO-Biosynthese auf physikalischem Wege gesteigert werden.

\*Es stellte sich heraus, dass die Guanylyl-Cyclase (Gc) nicht vollständig im Cytosol gelöst vorliegt, wie in den letzten 20 Jahren angenommen, sondern zu einem großen Teil auch membrangebunden vorkommt. In dieser gebundenen Form hat sie eine viel höhere Affinität zu NO als in der löslichen. Dieses hat zweierlei Gründe: Erstens kommt NO eher in der Membran als im Zellinneren vor und zweitens befindet sich die membrangebundene Gc immer in der Nähe NO-produzierender Enzyme. Letzteres ist besonders hinsichtlich der Instabilität des Stickstoffmonoxids von Interesse <sup>[16]</sup>.



**Abbildung 2:** Die NO-Biosynthese und die daraus resultierende NO-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle.

Eine weitere Bedeutung von NO im vaskulären System ist die Hemmung der Thrombozytenaggregation, die Reduktion der Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel und die Hemmung von Superoxidradikal-Anionen-produzierenden Enzymen [17, 18]. Diese Mechanismen unterstützen den antiarteriosklerotischen und endothelprotektiven Effekt von NO.

Auch in anderen Geweben spielt NO eine wichtige Rolle, wie z.B. im zentralen und peripheren Nervensystem, wo es an der langfristigen Modulation synaptischer Übertragungen beteiligt ist. Im peripheren Nervensystem fungiert es als atypischer Neurotransmitter über intrazelluläre Membranrezeptoren. Für das Immunsystem ist es durch die Einbindung in die unspezifische Abwehrreaktion der Makrophagen von Bedeutung. Dort schädigt es oxidativ eingedrungene Keime über die Bildung von Peroxynitrit (z.B. durch Peroxidation von Membranlipiden oder durch Reaktion mit Guanin hervorgerufene Strangbrüche der DNA). Die bereits erwähnte rasche Bindung von NO an eisenhaltige Enzyme wird hier ebenfalls ausgenutzt.

### 1.2.3 Pathophysiologische Bedeutung

Da es Krankheiten gibt, die mit NO in Verbindung stehen, spielt dieses auch aus pathophysiologischer Sicht eine Rolle. Hierbei können Erkrankungen sowohl aus einer Über- als auch aus einer Unterproduktion von Stickstoffmonoxid resultieren.

NO ist in der Lage mit Superoxidradikal-Anionen zu Peroxynitrit zu reagieren (s. 1.2.1). Dieses ist aufgrund seines hohen Oxidationspotentials in der Lage mit verschiedenen biologischen Strukturen zu reagieren, und somit den Organismus zu schädigen. Peroxynitrit kann u. a. Membranlipide peroxidieren und dessen Reaktion mit dem Nukleotid Guanin führt zu Strangbrüchen der DNA <sup>[19]</sup>. Das aus Peroxynitrit möglicherweise resultierende Hydroxylradikal (OH<sup>•</sup>) wird ebenfalls für die Pathogenese von Stickstoffmonoxid diskutiert. Des Weiteren ist NO selber in der Lage Reaktionen einzugehen, welche für den Organismus schädlich sind. Hohe NO-Konzentrationen können z.B. zur Desaminierung der DNA führen <sup>[20]</sup>. Im Gefäßsystem bewirkt eine NO-Überproduktion, wie sie bei der Sepsis vorkommt, eine verstärkte Vasodilatation. Diese kann im leichtesten Falle eine Hypotonie, im schlimmsten Falle ein multiples Organversagen herbeiführen. Ein NO-Mangel hingegen, wie er im Zuge einer endothelialen Dysfunktion auftritt, bewirkt z.B. Hypertonie und Thrombosen.

Im Nervensystem wird eine überschießende NO-Produktion und deren gewebe-schädigende Folgen bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose und Morbus Parkinson diskutiert.

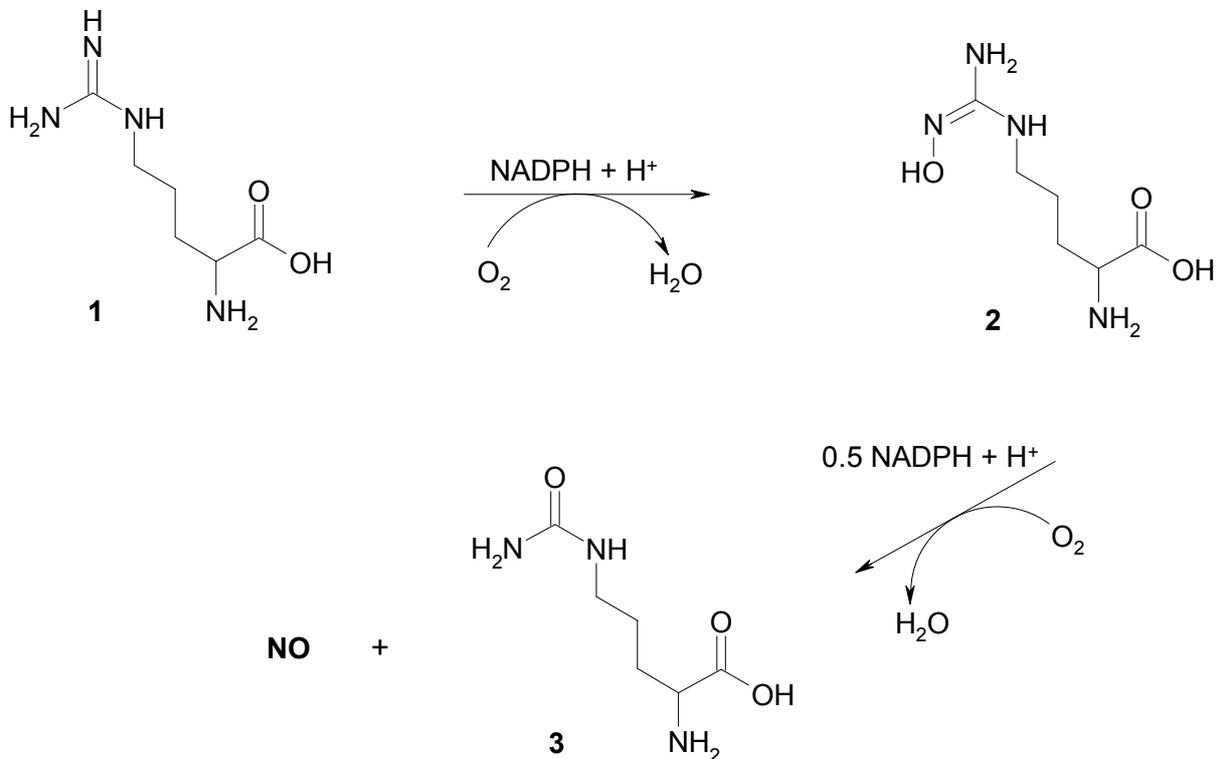
Auch auf den Einfluss eines erhöhten NO-Spiegels, verursacht durch eine gesteigerte Aktivität der NO-Synthase, auf die Pathogenese von Migräne gibt es Hinweise <sup>[21]</sup>.

Gemessenes NO-Gas in der Atemluft gilt als ein nicht-invasiver Marker für oxidativen Stress und Inflammation. Dessen Anteil ist z.B. bei nicht therapierten Asthma-Patienten höher als bei gesunden Probanden <sup>[22]</sup>.

## 1.3 Biosynthese von NO

NO wird endogen in einem katalytischen Prozess aus der Aminosäure L-Arginin durch eine Fünf-Elektronenoxidation synthetisiert (s. Abb.3). Es entstehen dabei

Citrullin und NO. Diese Reaktion verläuft in zwei Schritten und wird durch die hämhaltigen NO-Synthasen (NOS, s. unten) <sup>[4]</sup> katalysiert.



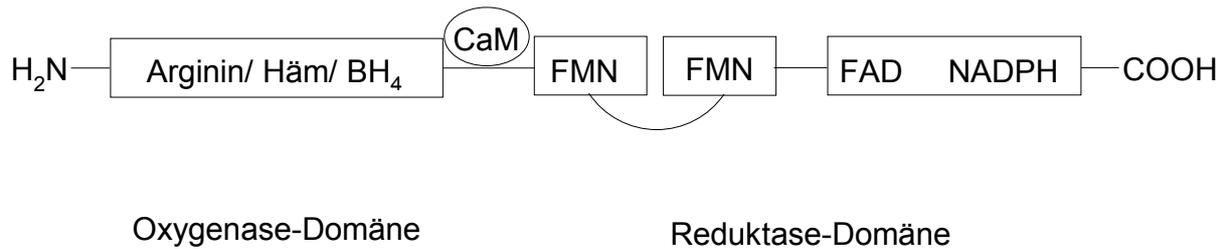
**Abbildung 3:** NO-Biosynthese aus L-Arginin.

Im ersten Reaktionsschritt wird zunächst unter Verbrauch von einem Mol NADPH + H<sup>+</sup> und Sauerstoff in einer Zwei-Elektronenoxidation N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin [NOHA, (2)] als Zwischenprodukt aus L-Arginin (1) gebildet. Im zweiten Reaktionsschritt kommt es unter Verbrauch von einem halben Mol NADPH + H<sup>+</sup> und Sauerstoff zur oxidativen Bindungsspaltung der Hydroxyimino-Gruppe von NOHA, wobei NO und Citrullin (3) entstehen. Bei diesem letzten Reaktionsschritt werden 3 Elektronen übertragen <sup>[23-25]</sup>.

Nur der erste Reaktionsschritt ist für die NO-Synthase spezifisch. Der zweite Schritt kann z.B. auch von Cytochrom P450 katalysiert werden <sup>[26-28]</sup>.

Die NO-Synthasen sind aus zwei identischen Monomeren aufgebaut, welche in zwei große Domänen aufgeteilt werden können, und zwar in die C-terminale Reduktase-Domäne und in die N-terminale Oxygenase-Domäne <sup>[29]</sup>. Die Reduktase-Domäne besitzt Bindungsstellen für jeweils ein Molekül NADPH + H<sup>+</sup>, FAD und FMN, die Oxygenase-Domäne hingegen bindet Häm, Tetrahydrobiopterin und das Substrat L-Arginin. Zwischen den beiden Domänen liegt die Bindungsstelle für Calmodulin.

Diese spielt eine Schlüsselrolle für die Struktur und Funktion der Enzyme: Durch die Anbindung von Calmodulin kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch der Elektronenfluss des NADPH auf die Flavine erhöht und die Übertragung der Elektronen von der Reduktase- auf die Oxygenase-Domäne durch die Flavine ermöglicht wird <sup>[30]</sup>.



**Abbildung 4:** *Beispielhafter schematischer Aufbau eines NOS-Homodimers. Zwischen den einzelnen Isoformen gibt es noch kleine strukturelle Unterschiede, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird.*

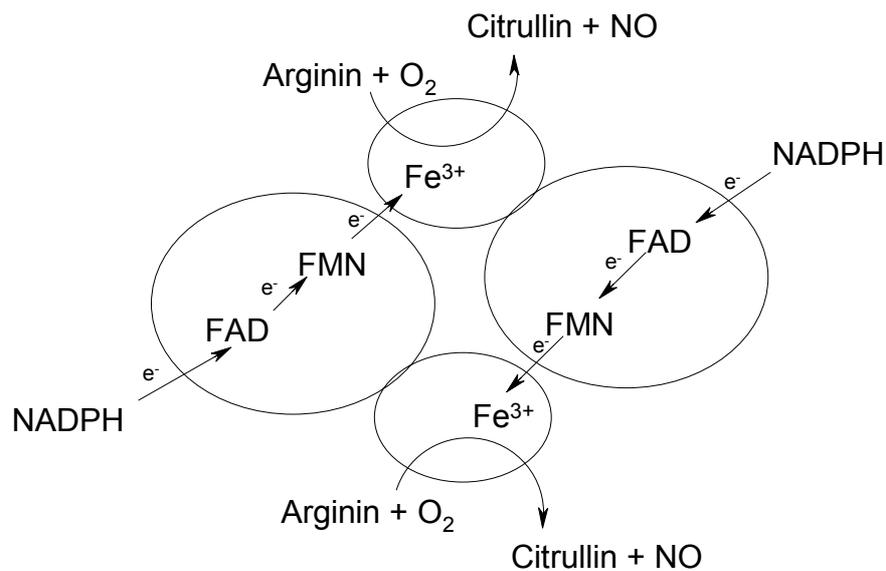
In der gängigen Literatur wird von drei Isoformen der NO-Synthase berichtet <sup>[31, 32]</sup>:

- neuronale NOS (nNOS bzw. NOS-I)  
Diese wurde zuerst im neuronalen Gewebe entdeckt und liegt konstitutiv vor.
- induzierbare NOS (iNOS bzw. NOS-II)  
Deren Expression findet vornehmlich in Zellen des Immunsystems statt und wird durch inflammatorische Zytokine oder bakterielle Endotoxine induziert.
- endotheliale NOS (eNOS bzw. NOS-III)  
Diese wurde zuerst in vaskulären Endothelialzellen entdeckt und liegt wie die nNOS konstitutiv vor.

Infolge einer Erhöhung von intrazellulärem Calcium kommt es zur Anbindung von Calmodulin an die eNOS oder nNOS. Dadurch wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex gebildet und somit das Enzym aktiviert. Bei der iNOS ist Calmodulin ständig gebunden, wodurch diese in der Lage ist unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration große Mengen an NO zu bilden. Es werden Diskussionen hinsichtlich

der Existenz weiterer Isoformen der NOS, wie z.B. einer mitochondrialen NOS geführt <sup>[31]</sup>.

Die Verknüpfung der Monomere (s. Abb. 4) zum aktiven Dimer kann sowohl bei der eNOS als auch bei der nNOS unterschiedlich ausfallen, während für die iNOS nur die Verknüpfung über die Reduktase-Domänen identifiziert wurden <sup>[33]</sup>. Abbildung 5 zeigt den Aufbau eines aktiven NOS-Dimers und den Elektronentransfer am Beispiel von nNOS.



**Abbildung 5:** Elektronentransfer und Aufbau des aktiven Dimers am Beispiel von nNOS.

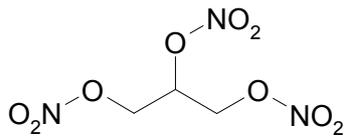
## **1.4 NO-Pharmaka**

Die meisten NO-Donatoren finden aufgrund ihrer vasodilatierenden Effekte klinische Anwendung in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Allen voran steht dabei die Therapie der Angina pectoris. Wichtige Vertreter dieser Arzneimittelklasse werden hier kurz vorgestellt.

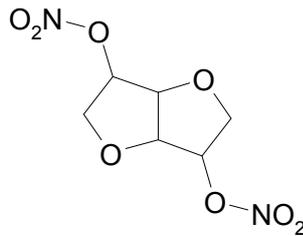
### **1.4.1 Organische Nitrate**

Vertreter dieser Substanzklasse setzen NO nach reduktiver enzymatischer Bioaktivierung im Organismus frei. Dazu gehören Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN) und Pentaerythryltetranitrat (PETN). Letzteres setzt wahrscheinlich auf einem redoxgeförderten, nichtenzymatischem Weg NO frei und führt als einziges auch nicht zur Entwicklung einer für organische Nitrate typischen Toleranz<sup>[34]</sup>. Als mögliche Ursache für die Nitrattoleranz werden derzeit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert. Organische Nitrate scheinen dabei die Produktion von ROS zu fördern, wohingegen PETN diese eher senkt.

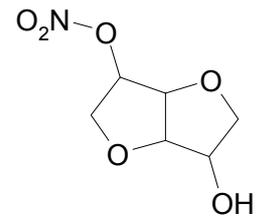
Kürzlich geriet die Langzeittherapie mit NO-Pharmaka zur Prophylaxe von Anfällen der Angina pectoris aufgrund dieser möglicherweise geförderten ROS-Bildung in Verruf. Daher besteht für diese Thematik dringender Forschungsbedarf, besonders wenn sich die These bewahrheitet, dass PETN die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu senken vermag.



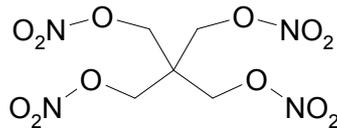
Glyceroltrinitrat  
(Nitrolingual®)



Isosorbiddinitrat  
(Isoket®)



Isosorbidmononitrat  
(Ismo®)



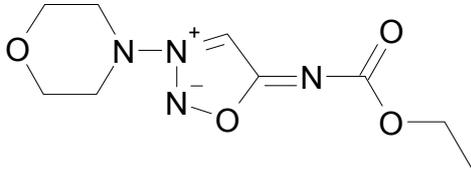
Pentaerythrityltetranitrat  
(Dilcoran®)

**Abbildung 6:** *Klinisch eingesetzte organische Nitrate. Bis auf PETN zeigen alle Verbindungen die für diese Substanzklasse typische Toleranzentwicklung, welche eine intermittierende Therapie mit einer zwölfstündigen Pause verlangt. Die Ursache für die fehlende Nitratoleranz unter der Gabe von PETN ist noch unklar.*

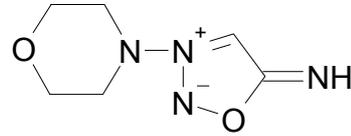
Aufgrund ihrer vasodilatatorischen Eigenschaften im venösen Strombett steigern organische Nitrate die Durchblutung bzw. das Sauerstoffangebot, da durch die Senkung des venösen Blutangebotes an das Herz, die diastolische Wandspannung (Vorlast) sinkt. So gelingt es mit Hilfe dieser Arzneimittel, selbst bei koronarsklerotischer Angina pectoris den Strömungswiderstand des Blutes in den Gefäßen zu senken. Bei koronarspastischer Angina pectoris führt die relaxierende Wirkung auf Arterien zur Lösung von Koronarspasmen und zur Normalisierung der Durchblutung. Aufgrund der Abnahme des Ventrikelfüllvolumens und des Aortendrucks sinkt die systolische Wandspannung (Nachlast) und somit auch der Sauerstoffbedarf <sup>[35]</sup>.

Eine weitere Anwendung findet Glyceroltrinitrat in Form einer 0,2 % igen Salbe bei Analfissuren. Hier wird ein Abfall des Schließmuskeltonus bewirkt <sup>[36]</sup>.

### 1.4.2 Molsidomin



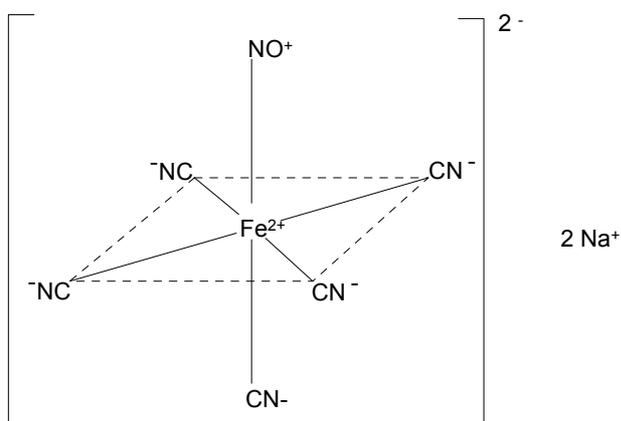
Molsidomin (Corvaton®)



SIN-1

Ein weiterer NO-Donor, der klinische Anwendung findet ist das Sydnonimin Molsidomin (Corvaton®). Es wird ebenfalls bei Angina pectoris eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein pro-drug, welches im Organismus zunächst durch enzymatische Abspaltung des Ethoxycarbonylrestes in SIN-1 umgewandelt wird. Nach erfolgter Ringöffnung wird NO oxidativ abgespalten. Da es hier nicht zu einer Toleranzentwicklung kommt, wird Molsidomin u. a. zur Überbrückung der Nitratpause eingesetzt, jedoch nur unter eingeschränkten Bedingungen, da die Substanz im Tierversuch zu Nasentumoren führte <sup>[37]</sup>.

### 1.4.3 Nitroprussid-Natrium



Nitroprussid-Natrium (Nipruss®) setzt (unter Lichteinfluss) spontan NO frei und wird zur kontrollierten Blutdrucksenkung bei der hypertensiven Krise benutzt <sup>[38]</sup>. Es darf jedoch nur zur kurzzeitigen Therapie und nur unter strenger Beobachtung eingesetzt

werden, da es zur Freisetzung der Cyanid-Ionen im Organismus kommt. Als Antidot bei Cyanid-Intoxikation dient Natriumthiosulfat.

Das Ausbleiben einer Nitrattoleranz bei Molsidomin und Nitroprussid-Natrium wird auf einen Wirkmechanismus zurückgeführt, der sich von den organischen Nitraten unterscheidet <sup>[35]</sup>.

#### **1.4.4 NO-Gas**

NO-Gas wird therapeutisch bei akutem Lungenversagen (entzündungs- oder unfallbedingt), pulmonaler Hypertonie (besonders bei Neugeborenen), obstruktiver Atemwegserkrankung, nach kardiochirurgischem Eingriff oder Lungentransplantation eingesetzt <sup>[39]</sup>. Hierbei macht man sich die NO-vermittelte Vasodilatation an den Gefäßmuskelzellen und die damit verbundene Blutdrucksenkung zunutze. Der Sauerstoffgehalt des Blutes steigt an. Hinzu kommt ein kurzzeitiger bronchodilatatorischer Effekt. Es wurde auch bei länger andauernder Inhalations-Therapie keine Toleranzentwicklung festgestellt.

Alle bisher erwähnten Arzneistoffe werden bei Erkrankungen eingesetzt, welche auf einen NO-Mangel beruhen.

Zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine überschießende NO-Produktion hervorgerufen werden, könnten u. a. NOS-Inhibitoren eingesetzt werden. Hier ist jedoch eine ausreichende Isoformselektivität das große Problem. Ein iNOS-Inhibitor wäre z.B. ein guter Ansatz zur Therapie der Sepsis. Ein solcher Inhibitor darf jedoch nicht die eNOS angreifen, da sich ansonsten wieder ein NO-Mangelzustand mit daraus resultierender Problematik einstellen würde (s. 1.2.3).

Einige Studien über den Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor (PTP-Inhibitor) Dephostatin geben Hinweise auf eine mögliche Neuroprotektion durch die Bereitstellung von geringfügigen NO-Mengen. Zum einen soll die NO-vermittelte Aktivierung der Guanylyl-Cyclase an diesem Effekt beteiligt sein, zum anderen wird auch eine direkte Hemmung der PTP durch Stickstoffmonoxid diskutiert <sup>[40]</sup>.

Die PTP-Inhibition soll die durch Wachstumsfaktoren induzierte, neuroprotektive Wirkung imitieren. Dieser Zusammenhang könnte im Rahmen der Suche nach neuen Therapieoptionen zur Bekämpfung von neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson eine Rolle spielen.

### **1.5 Aufgabenstellung**

In unserem Arbeitskreis wurden bereits verschiedene Hydroxyimino-Verbindungen eingehend auf ihre NO-Freisetzung untersucht. Diese Substanzklasse ist strukturell eng verwandt mit dem endogenen NO-Donor N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin.

In der Fachliteratur erscheinen regelmäßig Artikel, in denen von der vasodilatierenden Wirkung einiger Oxime berichtet wird <sup>[41-43]</sup>. Zusätzlich konnte in einer Studie Fluorennoxim als Modell-Substanz zur Aufklärung der NO-Biosynthese verwendet werden <sup>[44]</sup>. Diese Berichte veranlassten uns, Oxime als NO-Donatoren mit unserem biomimetischen Modellsystem ebenfalls genauer zu untersuchen. Dabei wurden für diese Studie möglichst einfache, strukturell ähnliche Verbindungen ausgewählt, um eventuelle Rückschlüsse der NO-Freisetzung auf den molekularen Aufbau ziehen zu können. Das Grundschema der Messungen schließt dabei an vorangegangene Arbeiten in unserem Arbeitskreis an.

Die Untersuchung des Nitroxyl-Donors Angeli's Salz sollte zur Aufklärung des NO-Freisetzungsmechanismus aus Oximen sowie zur Aufklärung möglicher Zwischenprodukte beitragen.

Des Weiteren interessierten wir uns für die Vermessung neuer, bisher unbekannter NO-Donatoren. Unter diesem Aspekt wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Derivate des Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Dephostatin vermessen, die bisher noch nicht auf ihre NO-Freisetzung untersucht worden waren.

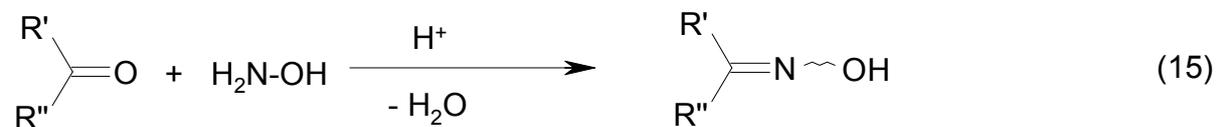
## 2. Oxime als NO-Donatoren

### 2.1 Chemische Eigenschaften der Oxime

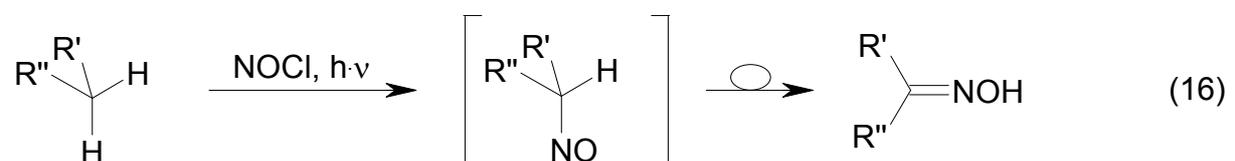
Die Bezeichnung Oxim dient zur Charakterisierung von Verbindungen, die die Atom-Gruppierung  $R^1R^2C=N-OH$  enthalten ( $R^1$  = organischer Rest). Diese Struktur bezeichnet man als Hydroxyiminoverbindung. Oxime, die von Aldehyden abgeleitet wurden, nennt man Aldoxime ( $R^2 = H$ ) und solche, die von Ketonen gebildet wurden, Ketoxime ( $R^2 =$  organischer Rest).

Die Benennung erfolgt systematisch nach der IUPAC-Regel C-842 durch Anhängen von "...oxim" an den Namen der entsprechenden Carbonyl-Verbindung oder durch Voranstellen von „Hydroxyimino...“. Aufgrund ihrer Stereochemie existieren Aldoxime und unsymmetrische Ketoxime in zwei isomeren Formen, die früher als syn- und anti-Form unterschieden wurden; heute wird jedoch die (E)- und (Z)-Nomenklatur vorgezogen. Allerdings ist die Konfigurationsstabilität der Oxime im Allgemeinen ziemlich gering, denn meistens kann man bereits durch mäßiges Erwärmen eine Umlagerung bewirken. In einigen Fällen ist sogar bekannt, dass eine Trennung der beiden möglichen geometrischen isomeren Formen bisher noch nicht gelungen ist <sup>[45]</sup>.

Oxime entstehen bei der Umsetzung der entsprechenden Carbonyl-Derivate mit Hydroxylamin:



Ferner können sie auch durch zahlreiche andere Reaktionen gebildet werden, wie z.B. durch Einwirkung von Nitrosylchlorid und Lichtenergie auf Kohlenwasserstoffe:



Dabei lagert sich der zunächst gebildete Nitroso-Kohlenwasserstoff sofort zu dem entsprechenden Oxim um <sup>[46]</sup>.

Die Oxime sind, bis auf einige niedere aliphatische Vertreter, bei Raumtemperatur kristallin und können zur Isolierung und Identifizierung von Carbonyl-Verbindungen herangezogen werden.

In der Natur kommen sie nur selten vor <sup>[47]</sup>.

Oxime sind amphoter. Sie können sowohl als Säuren Metallsalze oder Komplexe, als auch infolge ihrer basischen Eigenschaften mit Säuren Salze bilden. Das Bestreben Salze zu bilden ist bei den einzelnen Oximen jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt. Bei den Mono-Oximen überwiegt der schwach saure Charakter. Sie sind wie Phenole in Natronlauge, aber nicht mehr in Soda-Lösung löslich. Bei den auf diese Weise gebildeten Alkalisalzen der Oxime ist der Sauerstoff der am stärksten basische Molekülteil; im freien Oxim dagegen ist dies normalerweise der Stickstoff. Manche haben jedoch durch bestimmte Substituenten an Basizität eingebüßt, wie z.B. 2,4-Dinitrobenzaldehydoxim <sup>[46]</sup>.

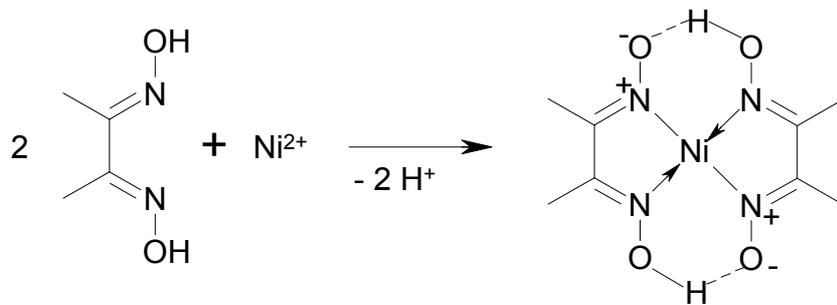
Durch elektronenschiebende Substituenten lassen sich Oxime leichter oxidieren <sup>[48]</sup>.

Die Tendenz des Stickstoffes den negativen Sauerstoff durch Wasserstoff oder andere positive Reste zu ersetzen, ist recht groß. Daher erleiden Aldoxime bereits durch die Behandlung mit Essigsäureanhydrid Wasserabspaltung unter Bildung eines Nitrils:



Ketoxime lassen sich aus diesem Grunde durch die Einwirkung von konzentrierten Mineralsäuren, wie H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder HCl zu den entsprechenden Carbonsäureamiden bzw. -aniliden umlagern (Beckmann-Umlagerung). Dabei bindet das Proton der konz. Säure an ein Elektronenpaar des N- oder O-Atoms des Ketoxims unter Bildung eines Iminium- oder Oxonium-Ions, welches letztendlich zur Amid-Bildung führt. Die Beckmann-Umlagerung verläuft stereospezifisch. Im Jahre 2002 wurde jedoch von einer durch photosensibilisierten Elektronentransfer induzierten Amid-Bildung aus Benzaldehydoxim berichtet <sup>[49]</sup>.

Viele Oxime bilden stabile Komplexe oder weniger stabile Additionsverbindungen mit Metallen, insbesondere mit denen der 8. Nebengruppe wie z.B. Eisen, aber auch Mangan oder Kupfer. Ein weiteres Beispiel ist der kräftig rot gefärbte schwerlösliche Komplex, welcher sich bei der gravimetrischen Bestimmung von Nickel aus der Reaktion mit Diacetyldioxim ergibt:



**Abbildung 7:** Nachweisreaktion der gravimetrischen Bestimmung von Nickel mit Diacetyldioxim

Die Bindung an das Metall über den Stickstoff ist für diese Art von Reaktion typisch <sup>[50, 51]</sup>.

Bei Aldoximen ist die Tendenz zur Ausbildung komplexer Schwermetallsalze nur gering. Es sind jedoch Aldoxim-Metall-Komplexverbindungen bekannt, die aus Kupfer-, Nickel- und Kobalt-Salzen gebildet wurden. Nur die (Z)-Form ist zur Bildung solcher Additionsverbindungen befähigt; (E)-Aldoxime können jedoch durch die Metallsalze in die (Z)-Form übergehen.

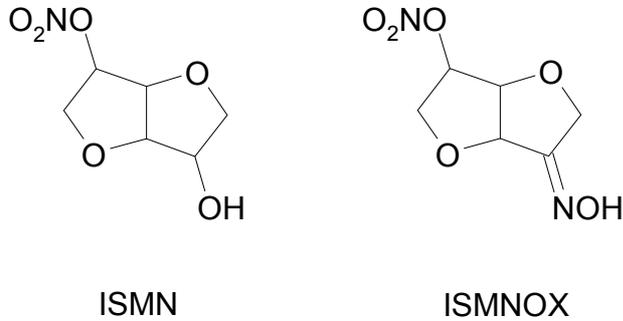
Wie sich u.a. durch IR-Untersuchungen belegen lässt, neigen Oxime zur Assoziation. Diese wird durch Wasserstoffbrücken bewirkt und führt in der Regel nicht über das doppelte Molekulargewicht hinaus <sup>[45]</sup>.

In pharmakologischen Arbeiten wird berichtet, dass Oxime oxidative Eigenschaften besitzen. Diese sind jedoch geringer als die des Oxim-Hydrolyseproduktes Hydroxylamin.

Unter oxidativen Bedingungen sind sie in der Lage NO freizusetzen. Dies gilt jedoch nicht für O-alkylierte Oxime <sup>[48]</sup>. Das aus *Streptomyces griseosporus* isolierte Ketoxim FK 409 besitzt starke vasodilatatorische Eigenschaften. Es setzt NO unter Ausbildung eines Diketons frei <sup>[52]</sup>.



Im Jahre 2004 wurde die NO-Freisetzung eines von Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) abgeleiteten Ketoxim (ISMNOX) an glatten Muskel- und Endothelzellen von isolierten Rattenarterien beschrieben <sup>[54]</sup>.



Es stellte sich heraus, dass ISMNOX die NO-Konzentration im Untersuchungsmedium nicht nur stärker anheben konnte, sondern auch die von den organischen Nitraten bekannte Nitrattoleranz ausblieb. Ungefähr zur selben Zeit wurden Ergebnisse aus Untersuchungen an Rattenaorten veröffentlicht <sup>[53]</sup>, welche Ähnliches berichteten: Die dort untersuchten Oxime konnten auch in jenen Popenansätzen als NO-Donatoren wirken, wo bereits eine Nitrattoleranz vorlag. Die NO-Bildung schien dabei unabhängig von der NO-Synthase stattzufinden, da auch dort der NO-Spiegel angehoben werden konnte, wo das Endothel nicht mehr intakt war. Es wurde postuliert, dass die hier untersuchten Ketoxime und Aldoxime NO nicht im Endothel sondern in den glatten Muskelzellen freisetzen. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Oxime als NO-Donatoren in Zukunft klinische Anwendung finden könnten <sup>[53, 54]</sup>.

### 2.2.2 Toxikologie

Es gibt Berichte über die Hämotoxizität mancher Oxime (unter anderem auch von Cyclohexanonoxim), die zu Anämien und Methämoglobinämie mit deren Folgen führt (Zyanose, Allgemeinsymptome wie z.B. Kopfschmerzen und Atemnot) <sup>[43]</sup>. Durch diese Substanzklasse kommt es in Anwesenheit von Erythrocyten zu oxidativem Stress <sup>[42, 43, 55]</sup>. Hierfür soll die Reaktion mit Hämoglobin zu Methämoglobin verantwortlich sein, wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstehen <sup>[56]</sup>. Alle hämotoxischen Effekte waren jedoch *in vitro* stärker als *in vivo*, und zumindest für

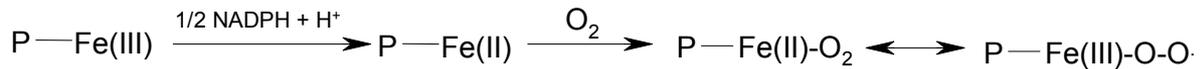
CHOX konnte gezeigt werden, dass die hämotoxischen Effekte von dem Hydrolyseprodukt Hydroxylamin ausgehen <sup>[42]</sup>. Für alle untersuchten Oxime wurden protektive Maßnahmen durch die Erythrozyten beschrieben <sup>[43]</sup>. Vergleiche zwischen Blut mit intakten Erythrozyten und Hämolysaten haben immer wieder gezeigt, dass zum einen die Aufnahme der Oxime in die Erythrozyten behindert wird und zum anderen intrazelluläre Schutzfaktoren (u. a. die Methämoglobinreduktase) gegen Oxime innerhalb der roten Blutkörperchen vorhanden sind <sup>[4, 42]</sup>. Für das ebenfalls hämotoxische Hydroxylamin gelten diese Schutzmechanismen nicht. Es sei an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen, dass Hydroxylamin selber im natürlichen Zellmetabolismus gebildet und durch eine NADH-abhängige Reduktase entgiftet wird. Dieses geschieht durch Umwandlung zu Ammoniak, welcher über den Harnstoffzyklus inaktiviert wird <sup>[57, 58]</sup>. Tatsächlich ist die hämotoxische Wirkung von Hydroxylamin in vitro z.T. 4fach stärker als in vivo <sup>[42]</sup>. Es wird ferner angenommen, dass CHOX vornehmlich in der Leber zu Hydroxylamin abgebaut wird und nur zu einem kleinen Teil langsam im Blut hydrolysiert. Es scheint jedoch so zu sein, dass lediglich die Hydrolyse im Blut für die Hämotoxizität der Oxime verantwortlich ist und nicht dessen Abbau in der Leber. Erstere stellt jedoch im Vergleich zur Verarbeitung in der Leber nur den kleineren Teil der Oxim-Verstoffwechselung dar. Des Weiteren zeigten diese Studien, dass es innerhalb der Oxim-Gruppe starke Unterschiede der Toxizität gibt, so dass eine generelle Aussage diesbezüglich nicht getroffen werden kann.

Es sei jedoch noch einmal deutlich hervor gehoben, dass erstens hauptsächlich das aus Oximen gebildete Hydroxylamin die Hämotoxizität dieser Substanzklasse ausmacht. Zweitens ist Hämoglobin für die toxische Reaktion notwendig ist und nicht andere hämhaltige Enzyme wie z.B. Cytochrom P450.

### **2.3 Theoretische Betrachtung zur Spaltung der Hydroxyimino-Funktion**

Der zweite Schritt der NO-Biosynthese aus N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu NO und Citrullin erfolgt über die NO-Synthase (NOS) durch eine oxidative Bindungsspaltung der N-Hydroxyguanidingruppe (s. 1.3). Dafür wurde eine 3-Elektronen Oxidation postuliert, bei der 1 mol Sauerstoff und ½ mol NADPH + H<sup>+</sup> verbraucht werden <sup>[25]</sup>. Ausgangspunkt für diesen Oxidations-Mechanismus ist im Falle des NOHA ein

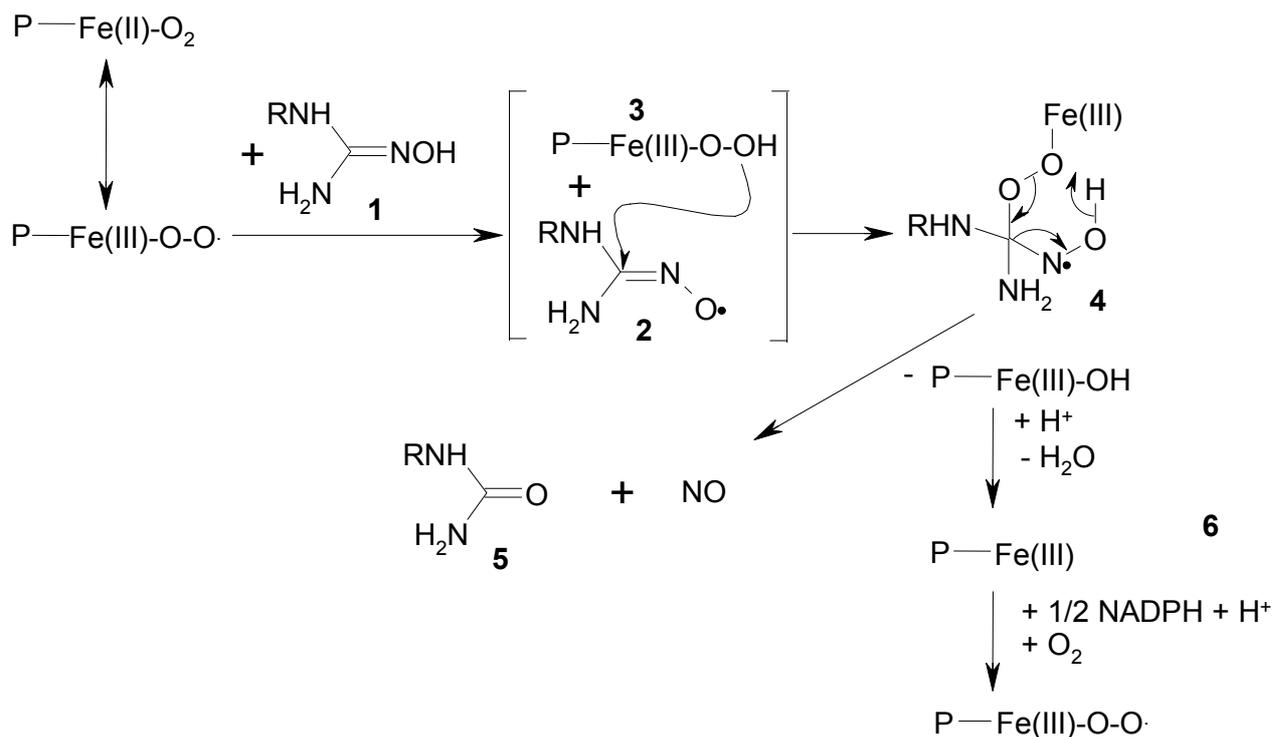
Fe(II)-O<sub>2</sub>-Komplex, der sowohl als Fe(II)-O<sub>2</sub> oder als Fe(III)-OO<sup>•</sup> vorliegen kann. Dieser Komplex wurde als 3-Elektronen-Oxidanz beschrieben, und entsteht im katalytischen Zyklus aus einem Fe(III)-Komplex durch die reduktive Einwirkung von NADPH + H<sup>+</sup> und Anlagerung von molekularem Sauerstoff. Dabei wird ein Elektron auf das Porphyrin übertragen:



P = Porphyrin-Rest

**Abbildung 8:** *Entstehung des Fe(II)-O<sub>2</sub> bzw. Fe(III)-OO<sup>•</sup>-Komplexes durch die Einwirkung von molekularem Sauerstoff.*

Abbildung 9 zeigt einen möglichen Weg der endogenen NO-Synthese aus NOHA unter NOS-Katalyse <sup>[25]</sup>. Dieser beginnt mit der Deprotonierung der Hydroxyimino-Gruppe des NOHA (**1**) durch den Fe(III)-O-O<sup>•</sup>-Komplex. Dadurch entsteht ein Iminoxy-Radikal (**2**) und ein Fe(III)-O-OH-Komplex (**3**) als Zwischenprodukt. Dieser Eisenhydroperoxid-Komplex (**3**) greift anschließend nukleophil am C-Atom des Iminoxy-Radikals an, was zu einem zyklischen Peroxo-Intermediat (**4**) führt. Dieses Intermediat zerfällt anschließend zu NO und Citrullin (**5**). Der anfängliche Eisen(III)-Komplex wird zurück erhalten (**6**).

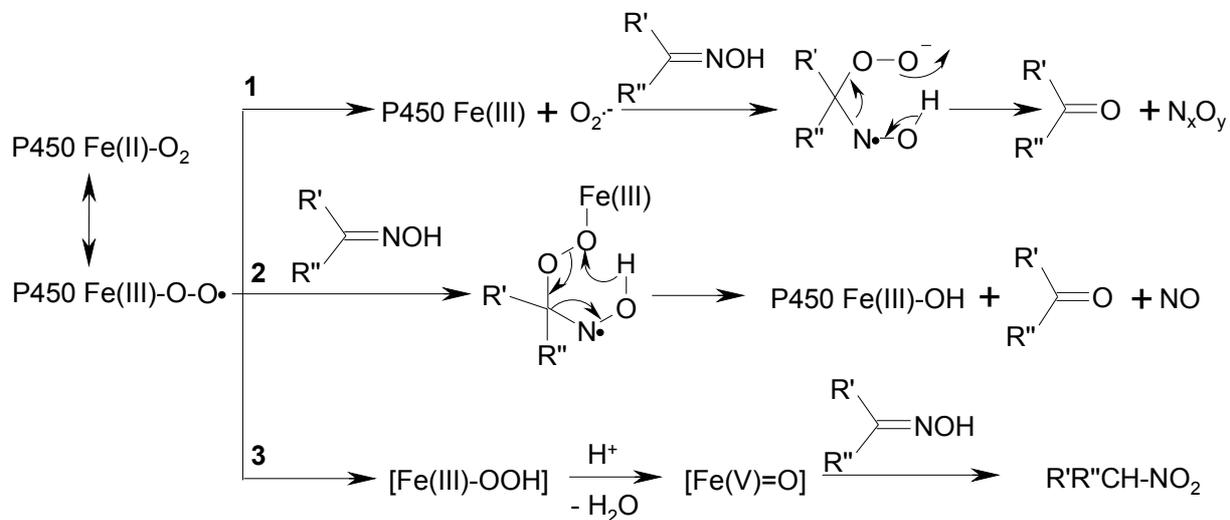


P = Porphyrin-Rest

**Abbildung 9:** Ein möglicher Mechanismus der endogenen Freisetzung von NO aus  $N^\omega$ -Hydroxy-L-arginin durch NOS und CytP450 [25, 59].

Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu NOHA könnte man für andere Hydroxyimino-Verbindungen, z.B. Oxime, zumindest einen ähnlichen Mechanismus vermuten. Für bestimmte Oxime konnte tatsächlich eine oxidative NO-Freisetzung gezeigt werden, die unabhängig von NOS, jedoch unter Beteiligung von Cytochrom P450 erfolgt [53]. Allerdings gibt es Hinweise, dass dieser Reaktionsweg doch etwas von dem oben beschriebenen (s. Abb. 9) abweicht. Als Erklärung werden sterische Gründe genannt. NOHA als natürliches Substrat passt besser in das aktive Zentrum der NO-Synthase als ein Oxim. Deshalb bindet der oben erwähnte Fe(III)-OO•-Komplex nicht direkt an die Hydroxyimino-Gruppe, sondern zerfällt durch Einwirkung von NADPH + H<sup>+</sup> und Sauerstoff in den Fe(III)-Komplex und Superoxidradikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Letzteres oxidiert dann die Hydroxyimino-Gruppe zu NO und der korrespondierenden Carbonyl-Verbindung (Abb.10, Reaktion 1). Dieses geschieht auch, wenn die Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Oximen oder NOHA durch Cytochrom P450 (CytP450) katalysiert wird.

In dem Zusammenhang wird aber auch erwähnt, dass die Superoxidradikal-Bildung nur der Hauptreaktionsweg von insgesamt drei Möglichkeiten der oxidativen Hydroxyimino-Bindungsspaltung unter Enzymbeteiligung ist. Durch Inhibierungsversuche mittels SOD (katalysiert die Dismutation von zwei Molekülen  $O_2^{\cdot-}$  zu  $H_2O_2$ ) konnte die Reaktion nur z.T. unterdrückt werden, was zu der Überlegung führte, dass es auch durch direkte Reaktion des Eisen-Komplexes mit der Hydroxyimino-Gruppe zur oxidativen Spaltung kommen könnte. Jedoch verläuft diese sehr viel langsamer als die Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  aus dem Fe(III)-OO $\cdot$ -Komplex<sup>[25, 59]</sup> und ist darum kinetisch benachteiligt. Aus diesem Grund wurde als weiteres oxidierendes Agens ein Fe(V)=O-Komplex postuliert. Diese Verbindung kann direkt mit einem Oxim reagieren. Die zu dem Fe(V)=O-Komplex mesomere Struktur Fe(IV)-O $\cdot$  wirkt stärker oxidierend als das Superoxid-Radikal. Es führt im Falle der oxidativen Spaltung von Ketoximen zur Bildung von Nitroalkanen (s. Abb. 10, Reaktion 3)<sup>[59]</sup>. Im Gegensatz zu Reaktion 1 in Abbildung 10 wird diese durch SOD nicht inhibiert. Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurde ebenfalls hauptsächlich mit der Fe(V)=O-Spezies gearbeitet.

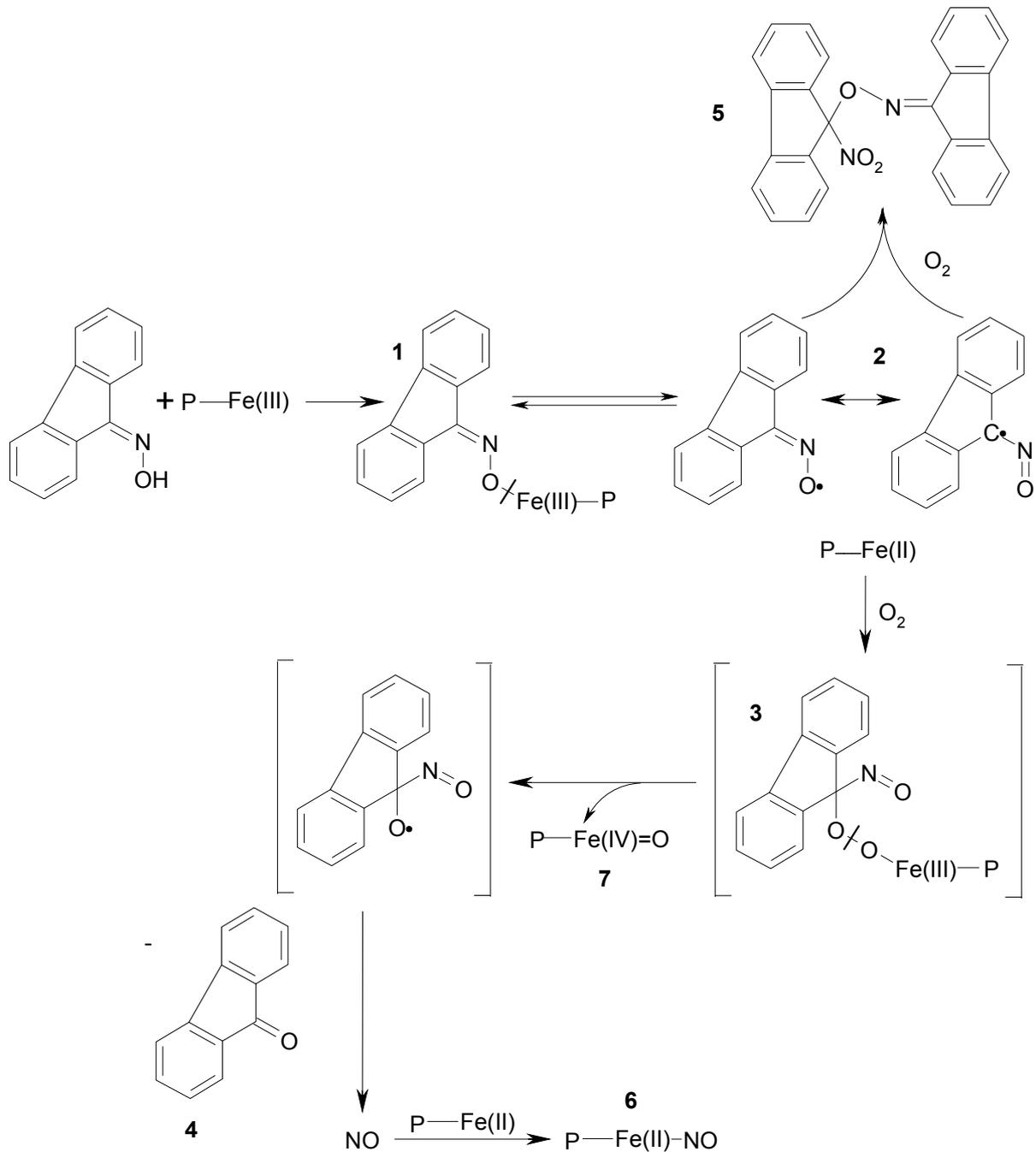


**Abbildung 10:** Drei mögliche Reaktionswege, die zur oxidativen Bindungsspaltung der Hydroxyimino-Gruppe unter Beteiligung von CytP450 führen können. Reaktion 1 ist kinetisch begünstigt und findet wahrscheinlich bevorzugt statt. N<sub>x</sub>O<sub>y</sub> sind NO und die Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat<sup>[25, 59]</sup>.

War bei der NOS die Affinität des NOHA als natürliches Substrat zum aktiven Zentrum des Enzyms deutlich besser als die der anderen Hydroxyimino-

Verbindungen, so liegen im Falle des Cytochrom P450 andere Verhältnisse vor. Die Affinitäten sowohl des NOHA als auch der übrigen Hydroxyimino-Verbindungen sind alle als mäßig einzustufen, weswegen Reaktion 1 in Abbildung 10 in diesem Falle auch für NOHA postuliert wird <sup>[25]</sup>.

Es gibt noch weitere Literaturangaben, die auf eine mögliche Ähnlichkeit der NO-Freisetzung zwischen Oximen und NOHA hinweisen. Eine Studie aus dem Jahre 1999 verwendet 9-Fluorenonoxim als Modellsubstanz für die endogene, NOS-vermittelte NO-Freisetzung <sup>[44]</sup>. Untersucht wurde die Einwirkung von molekularem Sauerstoff und enzym-imitierende Eisen(III)-Porphyrine auf das betreffende Oxim. Man fand Fluorenon (**4**) als organisches Hauptprodukt (ca. 80%), einen Fe(II)(NO)Porphyrin-Komplex (**6**) sowie das dimerähnliche O-(9-Nitro-9-fluorenyl)-Fluorenonoxim (**5**) als Produkte dieser Reaktion (s. Abb. 11). Versuche mit <sup>18</sup>O<sub>2</sub> konnten zeigen, dass die Produktverteilung der über die NOS vermittelten Reaktion aus NOHA ähnelt und diese u. a. vom Druck des zugesetzten Sauerstoffs abhängig ist. Anhand von kristallographischen und spektroskopischen Untersuchungen postulierte man den in Abbildung 11 dargestellten Reaktionsmechanismus. Als Intermediat wird auch hier ein Fluorenyl-iminoxy-Radikal (**2**) gebildet. Dieses entsteht jedoch durch die Spaltung eines Eisen(III)-Oxim-Komplexes (**1**) und nicht durch Deprotonierung, wie es von einigen Autoren bei der NO-Biosynthese für NOHA angenommen wird <sup>[23-25]</sup> (s. Abb. 9). Die Homolyse der Eisen-Sauerstoffbindung im Oximat (**1**) mit nachfolgender Bildung des Iminoxy-Radikals (**2**) wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt dieser Reaktionskaskade identifiziert. Anschließend lagert sich molekularer Sauerstoff zwischen das Radikal (**2**) und das Eisen(II)-Porphyrin und bildet intermediär eine sehr instabile Peroxy-Eisen(III)-Häm-Spezies (**3**). Aus diesem Intermediat spaltet sich sofort eine Eisen(IV)-Porphyrin-Gruppe (**7**) ab. Der verbliebene Rest reagiert über ein weiteres instabiles Radikal zu NO und der Carbonyl-Verbindung Fluorenon (**4**). Die Bildung der instabilen Zwischenprodukte und deren rascher Zerfall sind sehr wichtig für die katalytische Wirkung des Porphyrins.



P = TPPCI

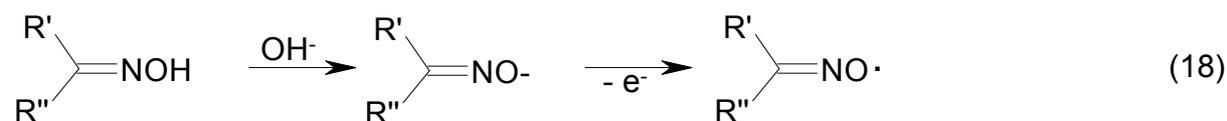
**Abbildung 11:** Vorgeschlagerter Mechanismus für die porphyrin-katalysierte Oxidation von 9-Fluorenoxim zu NO und Fluorenon <sup>[44]</sup>.

Die in Abbildung 11 beschriebene NO-Freisetzung aus Fluorennoxim (FLOX) war das erste Beispiel für eine durch synthetische Eisenporphyrine katalysierte Oxidation eines Oxims unter Verwendung von molekularem Sauerstoff.

Die Bindung eines Oxims an ein Metall-Ion über den Sauerstoff, wie sie in Verbindung (1) vorliegt, war vorher nur wenig bekannt. In früheren Arbeiten wurde berichtet, dass Oxime üblicherweise über den basischeren Stickstoff an Metall-Ionen binden <sup>[50, 51, 60]</sup>.

Die bereits erwähnten Iminoxy-Radikale werden sowohl für die endogene NO-Synthese aus NOHA als auch für die NO-Freisetzung aus Oximen postuliert. Diese Verbindungen sind bekannt dafür, dass sie schnell dimerisieren. Oft stehen die gebildeten dimerähnlichen Moleküle mit den Iminoxy-Radikalen in einem chemischen Gleichgewicht, d.h. sie bilden die Radikale bei ihrem Zerfall wieder zurück. Die Stabilität der dimerähnlichen Moleküle, von denen eines in Abbildung 10 zu sehen ist, hängt außer von der Struktur und Konzentration der Ausgangssubstanz noch von verschiedenen anderen Faktoren ab, wie pH-Wert, Temperatur und Art des Lösemittels. Das dimerähnliche Molekül (5) aus Abbildung 11 ist z.B. ein typischer Vertreter für ein Ketoxim als Ausgangssubstanz. Arylaldoxime mit elektronenziehenden Substituenten bilden ebenfalls diese O-N-Verknüpfungen, während Aldoxime mit elektronenschiebenden Resten eher eine N-N-Verknüpfung eingehen. Letzteres gilt auch für das dem FLOX strukturell eng verwandten Benzophenonoxim. Sterische Unterschiede, die durch die fehlende Verknüpfung der beiden Phenyl-Reste zustande kommen, werden dafür verantwortlich gemacht. Dies ist ein erster Hinweis auf die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten innerhalb der Oxim-Gruppe. Die Zerfallsprodukte dieser dimerähnlichen Moleküle setzen sich unter anderem zusammen aus der entsprechenden Carbonyl-Verbindung, dem entsprechenden Nitril, Stickstoff und eine kleine Menge an Dickstoffoxid <sup>[61]</sup>.

Einem anderen Vorschlag zur intermediären Ausbildung der Iminoxy-Radikale liegen ionische Prozesse zugrunde <sup>[62]</sup>:



Dieser Mechanismus wäre durch ein alkalisches Milieu begünstigt.

In früheren Arbeiten wurde ebenfalls ein alkalisches Medium als vorteilhaft für die NO-Freisetzung aus Oximen postuliert, da eine vorausgehende Deprotonierung angenommen wurde <sup>[63]</sup>. Für das vasodilatatorisch wirksame Ketoxim FK409 wurde die Deprotonierung am  $\alpha$ -C-Atom zur Nitrogruppe als geschwindigkeitsbestimmender Schritt zur NO-Freisetzung identifiziert. Ein solcher Aspekt spielt jedoch für diese Studie eine eher untergeordnete Rolle, da Oxime mit diesem Strukturelement nicht ausgewählt wurden.

Generell ist die Spaltbarkeit von Oximen konstitutionsbedingt. Am schwersten spaltbar sind die rein aliphatischen Aldoxime infolge der dort sehr reaktionsfähigen Aldehydgruppe. Danach folgen die Oxime der aromatischen Aldehyde und schließlich die Ketoxime. Allerdings lassen sich einfache cycloaliphatische Ketoxime wieder schwerer verseifen <sup>[46]</sup>.

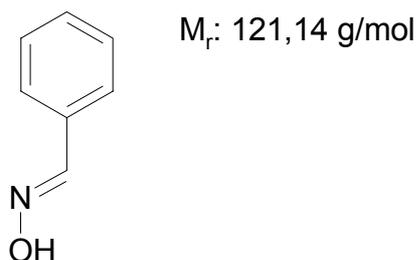
Die Hydrolyse kann durch elektronenschiebende Gruppen in  $\alpha$ -Position begünstigt werden, da die Bindung zwischen dem Stickstoff und dem benachbarten C-Atom gelockert wird. Die Geschwindigkeit wird allgemein davon bestimmt wie schnell sich ein Proton an die Oxim-Gruppe anlagern kann. Der für die Hydrolyse günstigste pH-Wert liegt bei pH 2,3. Leider führt diese nicht immer zur vollständigen Regenerierung der entsprechenden Carbonyl-Verbindung, da Neben- oder Weiterreaktionen eintreten können. In solchen Fällen hilft die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts durch Entfernung eines der Produkte, z.B. durch Zerstörung bzw. Entfernung des Hydroxylamins <sup>[46]</sup>.

In einer einer Literaturquelle aus dem Jahre 1998 <sup>[64]</sup> wurde von einer milden Regeneration der Carbonyl-Verbindungen in relativ hohen Ausbeuten u. a. aus Aldoximen bzw. Ketoximen berichtet. Hierbei wurden neben dem Sauerstoffdonor Natriumperodat bzw. Tetraammoniumperiodat Mangan-Porphyrine als CytP450-Imitatoren verwendet. Interessanterweise fanden unter den gewählten oxidativen Bedingungen im Falle von Aldoximen als Ausgangssubstanz keine Weiterreaktionen der erhaltenen Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren statt <sup>[64]</sup>.

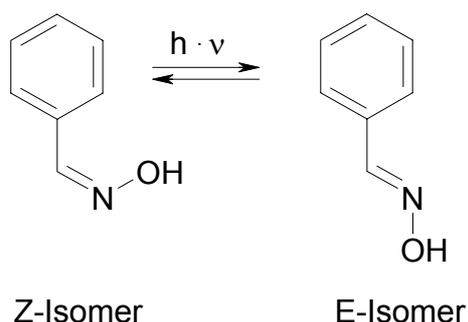
## 2.4 Die untersuchten Oxime

### 2.4.1 Aldoxime

#### 2.4.1.1 E-Benzaldehydoxim



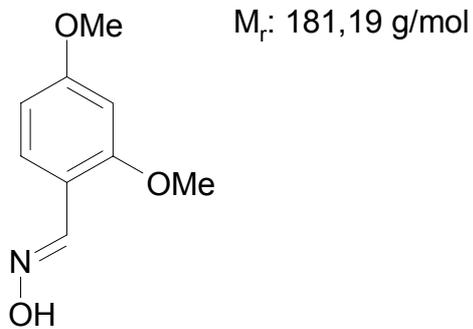
Das E-Benzaldehydoxim (BOX) entsteht bei der Umsetzung von Benzaldehyd mit Hydroxylamin. Es handelt sich um eine weiße kristalline Substanz mit einem Schmelzpunkt von 35°C, einem Molekulargewicht von 121,14 g/mol. In Wasser ist sie schwer löslich. Man erhält das stabilere Z-Isomer auch nach Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in eine etherische Lösung von E-Benzaldehydoxim und anschließender Zugabe von Natriumcarbonatlösung <sup>[65]</sup>. Nach Bestrahlung mit UV-Licht in Benzol lässt sich die Z-Form zur energiereicheren E-Form in einer Gleichgewichtsreaktion isomerisieren:



Beide Stereoisomere unterscheiden sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften: Der Schmelzpunkt des E-Isomers beträgt 35°C, der des Z-Isomers 132°C. Lässt man Acetanhydrid mit E-Benzaldehydoxim reagieren so entsteht das übliche Acetylderivat. Z-Benzaldehydoxim hingegen liefert unter denselben Bedingungen unter Wasserabspaltung Benzonnitril.

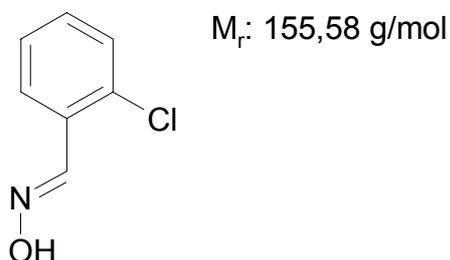
Die vasodilatierenden Eigenschaften von E-Benzaldehydoxim wurde bereits 1989 beschrieben <sup>[41]</sup>.

#### 2.4.1.2 2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim



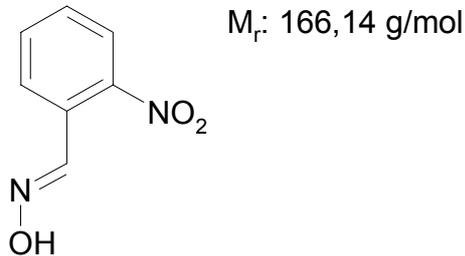
2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim (DBOX) ist ein weißes Pulver mit einem Molekulargewicht von 181,19 g/mol und einem Schmelzpunkt von 105-108°C. Es ist löslich in Ethanol, jedoch schwer löslich in Wasser. In der Literatur gibt es Hinweise auf eine erleichterte Oxidierbarkeit und dadurch vielleicht auch eine vermehrte NO-Bildung durch elektronenschiebende Substituenten <sup>[48]</sup>. DBOX besitzt jeweils eine elektronenschiebende Methoxy-Gruppe in ortho- und in para-Stellung.

#### 2.4.1.3 2-Chlorbenzaldehydoxim



2-Chlorbenzaldehydoxim (CBOX) ist eine weiße, kristalline, schwach riechende Substanz mit einem Molekulargewicht von 155,58 g/mol und einem Schmelzpunkt von 73-76°C. CBOX wurde aufgrund seines elektronenziehenden Restes in ortho-Stellung für diese Studie ausgewählt.

#### 2.4.1.4 2-Nitrobenzaldehydoxim (NBOX)



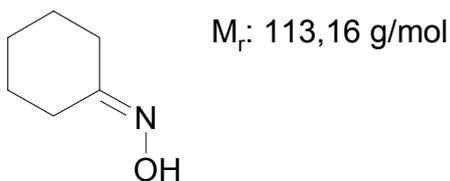
2-Nitrobenzaldehydoxim (NBOX) besteht aus schwach gelblichen feinen Nadeln. Es hat ein Molekulargewicht von 166,14 g/mol und einen Schmelzpunkt von 88-92°C. Es wurde aufgrund seines elektronenziehenden Restes, der sich genau wie bei CBOX in ortho-Stellung befindet, für diese Studie ausgewählt.

Obwohl sich in diesem Molekül eine Nitro-Gruppe befindet, sollte dessen Rolle nicht dieselbe sein wie in dem vasodilatatorisch wirksamen Oxim FK409, da sich hier am  $\alpha$ -C-Atom kein abspaltbares Proton befindet.

#### 2.4.2 Ketoxime

In dieser Studie sollte auch ein etwaiger Unterschied der NO-Freisetzung zwischen Aldoximen und Ketoximen erarbeitet werden. Aus diesem Grunde entschieden wir uns für Vertreter der Ketoxime, die eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu den oben erwähnten Benzaldehydoxim-Derivaten haben.

##### 2.4.2.1 Cyclohexanonoxim

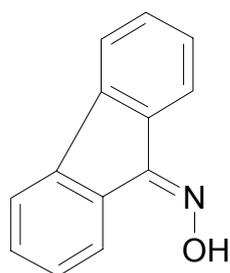


Cyclohexanonoxim (CHOX) ist aufgrund zahlreicher bekannter Reaktionen der geläufigste Vertreter dieser Oxim-Reihe. Die Substanz besteht aus weißen Kristallen,

hat ein Molekulargewicht von 113,16 g/mol und schmilzt bei 89-91°C. Das Oxim hat große technische Bedeutung, da es als wichtiges Zwischenprodukt bei der Herstellung von  $\epsilon$ -Caprolactam, dem Ausgangsstoff von Perlon bzw. Dederon (wird für Strumpfwarenartikel verwendet) auftritt. CHOX wird dabei mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, wodurch es zur Beckmann-Umlagerung kommt. Daraus resultiert das zyklische Carbonsäureamid. Des Weiteren ist es Ausgangsprodukt zahlreicher anderer Reaktionen, wie z. B. die Bildung eines 4-Oxazolin-2-on-Derivates nach Reaktion mit Dimethylcarbonat bei 190°C [66]. Für CHOX gibt es ebenfalls Angaben in der Literatur, dass es in der Lage ist NO freizusetzen. Allerdings ist diese Substanz hämotoxisch, wobei die Erythrocyten als Hauptangriffspunkt identifiziert wurden [42]. Sie verursacht eine hämolytische Anämie und Methämoglobinämie. Dabei vermutet man jedoch, dass nicht das Oxim selber die Hämotoxizität ausmacht, sondern dessen Hydrolyseprodukt Hydroxylamin, welches als Intermediat der NO-Freisetzung aus Oximen diskutiert wird. Bereits 1989 wurden seine vasodilatatorischen Effekte beschrieben, die aber schwächer ausfielen als die von Hydroxylamin [41].

Aufgrund dieser Berichte und seiner strukturellen Ähnlichkeit zu FLOX wurde Cyclohexanonoxim in diese Versuchsreihe aufgenommen.

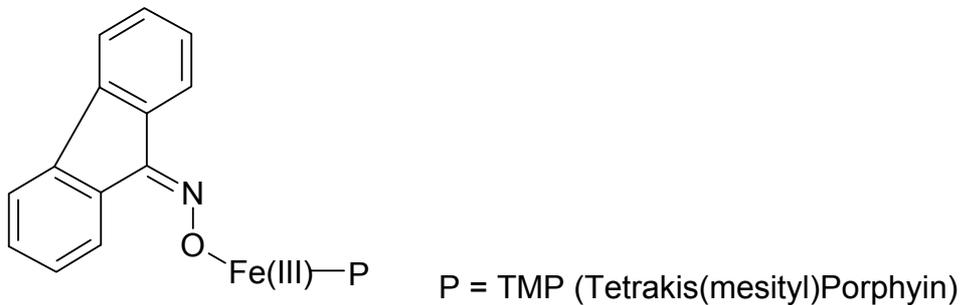
#### 2.4.2.2 Fluorennoxim



$M_r$ : 195,22 g/mol

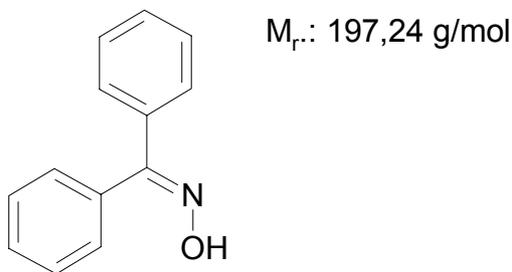
Fluorennoxim (FLOX) besteht aus gelben, feinen Nadeln. Es hat ein Molekulargewicht von 195,22 g/mol und einen Schmelzpunkt von 193-194°C. Es ist wenig löslich in Ethanol und sehr schlecht löslich in Wasser. Vor einigen Jahren wurde FLOX als Modell-Substanz für die durch NO-Synthase vermittelte NO-Biosynthese aus  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin verwendet [44]. Mit Hilfe des Oxims gelang der

Nachweis der NO-Freisetzung unter Beteiligung eines Eisen-Porphyrins und eines bis dahin selten beobachteten Eisen-Sauerstoff-Porphyrinkomplexes:



In einer anderen Arbeit wird von einer hohen Ausbeute an Fluorenon nach Oxidation unter Beteiligung von Mangan-Porphyrinen in Gegenwart von Natriumperiodat ( $\text{NaIO}_4$ ) bzw. Tetraammoniumperiodat ( $\text{Bu}_4\text{NIO}_4$ ) berichtet <sup>[64]</sup>. Diese Hinweise aus der Literatur machten FLOX für die NO-Messungen interessant.

#### 2.4.2.3 Benzophenonoxim



Benzophenonoxim (BPOX) ist eine weiße kristalline Substanz, die bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert werden soll. Das Oxim hat ein Molekulargewicht von 197,24 g/mol, ist sehr schwer löslich in Wasser und schmilzt bei  $141\text{-}143^\circ\text{C}$ . Auch BPOX wurde in Gegenwart von einem Mangan(III)-Porphyrin und  $\text{NaIO}_4$  bzw.  $\text{Bu}_4\text{NIO}_4$  mit hoher Ausbeute zu Benzophenon umgesetzt. Strukturell ist es CHOX und vor allem FLOX sehr ähnlich und sollte deswegen ebenfalls im Rahmen dieser Studie untersucht werden.

## **2.5 Das angewendete Modellsystem**

In der Literatur findet man zahlreiche Hinweise auf die Beteiligung von Hämproteinen bei der NO-Freisetzung aus verschiedenen Substanzklassen, und zwar sowohl bei einem reduktiven, als auch bei einem oxidativen Freisetzungsmechanismus. Organische Nitrate sind ein Beispiel für den reduktiven, Hydroxyimino-Verbindungen für den oxidativen katalytischen Weg unter Bildung von NO.

Metabolismusstudien mit Hilfe von Enzymen durchzuführen ist aufgrund ihrer schwierigen Handhabung problematisch. Für deren einwandfreie Funktion müssen zahlreiche Beschränkungen der Reaktionsbedingungen toleriert werden (optimale Temperatur, pH-Wert und Lösemittel). Außerdem sind geeignete Enzyme sehr teuer. Aus diesem Grund entschied man sich, einfache biomimetische Modellsysteme zu entwickeln, die kostengünstig und praktisch in der Anwendung sind. Seither konnten eine Vielzahl solcher Modelle etabliert werden, welche häufig in der Aufklärung von Arzneistoff-Metabolisierungen Anwendung finden.

Als Vorbild für das hier verwendete Enzymmodell diente in diesem Fall das hämhaltige Cytochrom P450, dessen Reduktasedomäne große Ähnlichkeit zu der der NO-Synthase (NOS) aufweist und welches in der Lage ist den zweiten Schritt der NOS vermittelten NO-Biosynthese zu katalysieren (s. 1.3). Die enzymatische NO-Freisetzung bisher bekannter NO-Donatoren wird überwiegend durch das Cytochrom P450-System katalysiert.

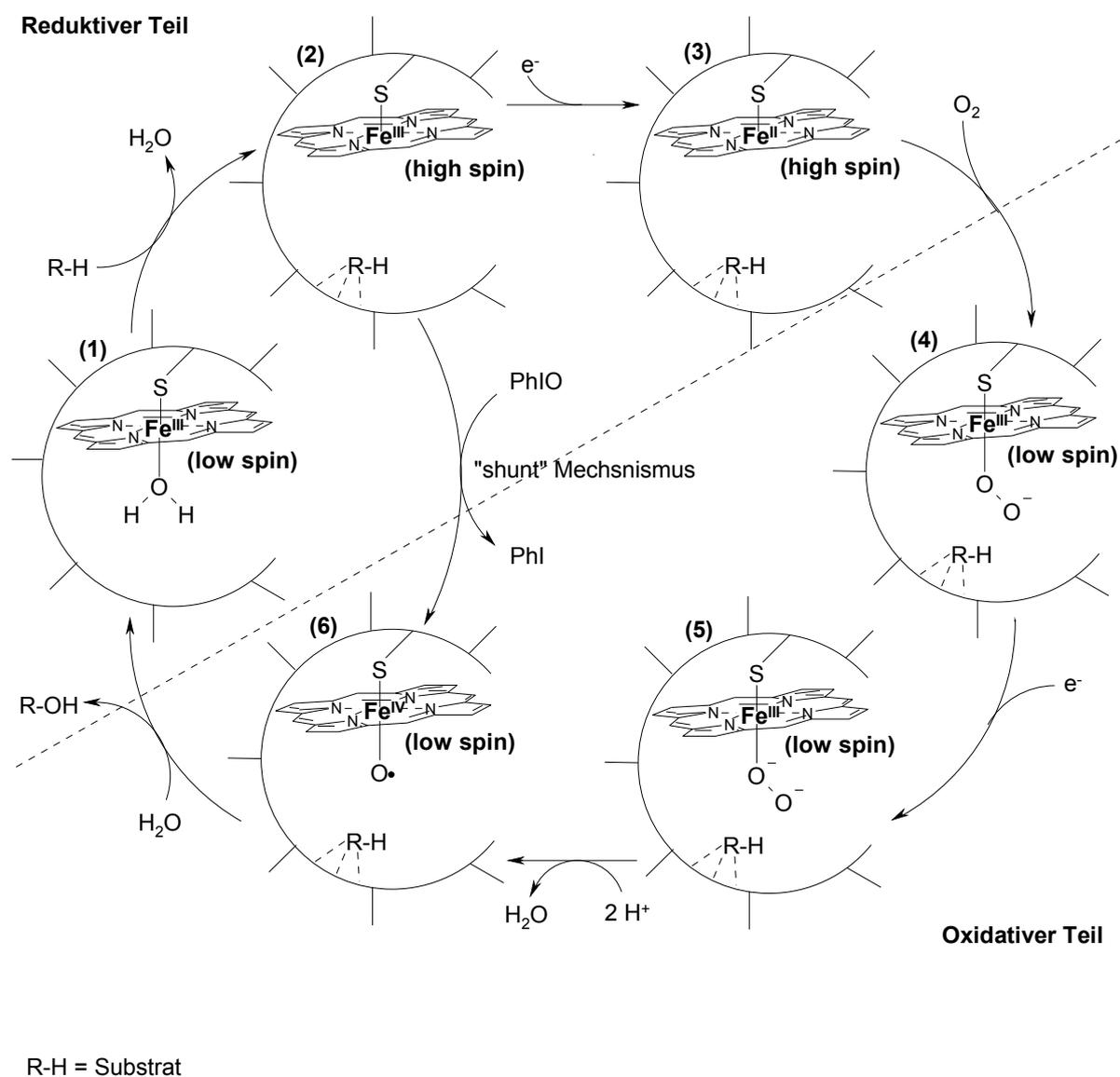
Im Arbeitskreis Duchstein ist es gelungen, ein Modellsystem zu entwickeln, welches in der Lage ist die durch Cytochrom P450 vermittelten Reaktionen zu imitieren <sup>[67]</sup>. Die Bestimmung von freigesetztem NO in Anwesenheit des Modells sollte einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieses Enzyms bei der oxidativen Bioaktivierung liefern.

### **2.5.1 Cytochrom P450**

Das Hämprotein Cytochrom P450 gehört zur Gruppe der Monooxygenasen. Diese übertragen einzelne Sauerstoffatome bei den von ihnen katalysierten Reaktion.

Die allen P450-Isoenzymen gemeinsame Struktur im aktiven Zentrum ist eine Eisen-Protoporphyrin-Einheit. Die Bindung zu dem Enzym erfolgt über den Thiolat-Liganden an das Eisen-Zentralatom <sup>[68]</sup>.

Beispiele für typische Reaktionen dieser Enzymgruppe sind u. a. Epoxidierung, *N*- und *O*-Desalkylierung und Hydroxylierung <sup>[69-71]</sup>. Es handelt sich dabei um oxidative Reaktionen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass der katalytische Zyklus des CytP450 formal aus einem reduktiven ersten Teil und einem oxidativen zweiten Teil besteht (Abb. 10). Hierbei wird nur auf den zuletzt genannten näher eingegangen, da die in dieser Studie untersuchten NO-Donatoren aufgrund ihrer Struktur eine oxidative Aktivierung erwarten ließen.



**Abbildung 12:** Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450.

Struktur (1) beschreibt das Enzym im Ruhezustand. Während der Bindung des Substrates (R-H) wird Wasser als sechster Ligand verdrängt und Fe(III) geht unter Anhebung des Redoxpotentials auf +170 mV <sup>[68]</sup> vom low-spin in den high-spin-Zustand (2) über. Danach werden NADPH + H<sup>+</sup>-Äquivalente bereitgestellt und es erfolgt die Ausbildung eines Fe(II)-high-spin-Zustandes (3). Dieser Komplex reagiert dann mit Sauerstoff weiter zu dem Fe(III)O<sub>2</sub><sup>-</sup>-low-spin-Zustand (4). Ein weiteres Elektron (5) wird übertragen und zwar an den gebundenen Sauerstoff, wonach dieser unter Wasserabspaltung disproportioniert. Es kommt zur Ausbildung einer hoch oxidierten Zwischenstufe des Eisens, dem Fe(IV)-low-spin-Zustand (6), das so genannte Oxyferrylkation. Dieser Komplex birgt „aktivierten Sauerstoff“ in seiner Struktur, mit dem das Substrat R-H zum hydroxylierten Produkt ROH reagieren kann. Dabei kehrt das Enzym wieder in seinen Grundzustand (1) zurück <sup>[72]</sup>.

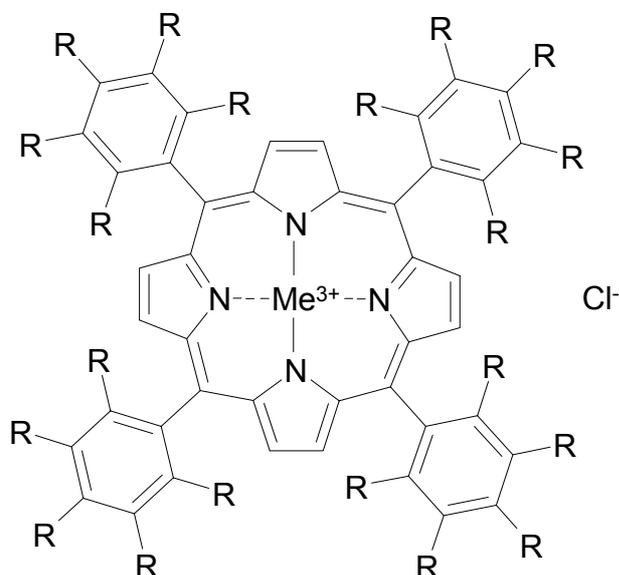
Komplex (3) ist für die Cytochrom P450 vermittelten Reduktionen verantwortlich, was auch die Reduktion von Arznei- und Fremdstoffen einschließt <sup>[67]</sup>. Den oxidativen Teil hingegen führen hochoxidierte Zwischenstufen des Eisens durch, wie z.B. das Oxyferrylkation (6).

Im biomimetischen Enzymmodell kann nicht mit molekularem Sauerstoff gearbeitet werden, da im katalytischen Zyklus von Cytochrom P450 dieser in Gegenwart von Eisenporphyrinen reaktiv gespalten wird. Der Sauerstoff müsste neben einem geeigneten Reduktionsmittel eingesetzt werden. Bei dieser Reaktion treten jedoch zwischenzeitlich, wie oben erwähnt, hochoxidierte Zwischenstufen von Übergangsmetallen auf, was eine räumliche Trennung von Metall und Reduktionsmittel für die experimentellen Durchführungen erfordert. Das ist jedoch schwer zu realisieren. Darum werden für die Versuche im Modell synthetische Sauerstoffdonatoren eingesetzt, welche formal vorreduzierten Sauerstoff übertragen und somit die reduktive Aktivierung des molekularen Sauerstoffs umgehen („shunt“ Mechanismus, s. Abb. 11) <sup>[68]</sup>. Ein Beispiel dafür ist Iodosobenzol.

## 2.5.2 Synthetische Porphyrine

Als wesentlicher Bestandteil des Enzymmodells sind niedermolekulare Metall-Porphyrin-Verbindungen zu nennen. Sie dienen als Ersatz für den aktiven Teil des

Cytochrom P450. Das Zentralatom der hier verwendeten Modellsubstanzen ist in ein Tetraphenylporphyringrundgerüst eingebettet:



$\text{Me}^{3+} = \text{Fe}^{3+}, \text{Mn}^{3+}$

FeTPPCI, MnTPPCI: R = H

FeTFPPCI: R = F

**Abbildung 13:** *Tetraphenylporphyringrundgerüst*

Für die hier durchgeführten Messungen wurden hauptsächlich drei verschiedene Tetraphenylporphyrine verwendet:

1. FeTPPCI

(5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-eisen(III)-chlorid)

Diese Verbindung diente in früheren Arbeiten bereits erfolgreich bei der Untersuchung von Hydroxyiminoverbindungen als Enzym-Ersatz <sup>[73]</sup>.

2. MnTPPCI

(5,10,15,20-Tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphyrin-mangan(III)-chlorid)

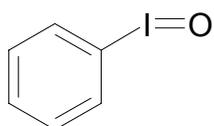
Die Verwendung dieses Porphyrins lieferte bei der Untersuchung, welche sich mit der milden Regenerierung von Carbonyl-Verbindungen aus den entsprechenden Oximen beschäftigte, z. T. recht hohe Ausbeuten an Aldehyden bzw. Ketonen. Darum war auch es interessant, die NO-Freisetzung unter Beteiligung dieser Substanz zu betrachten <sup>[64]</sup>.

3. FeTFPPCI

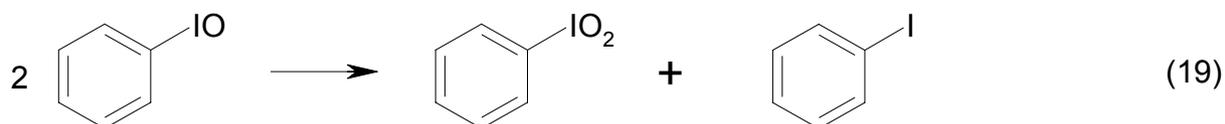
(5,10,15,20-Tetrakis(pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphyrin-eisen(III)-chlorid)

Mit diesem Porphyrin konnten bereits im Arbeitskreis Duchstein gute Erfolge bei der Oxygenierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen erzielt werden. Die Ergebnisse unter Verwendung dieser Substanz waren so erstaunlich, dass sie ihr den Beinamen „Superkomplex“ einbrachte.

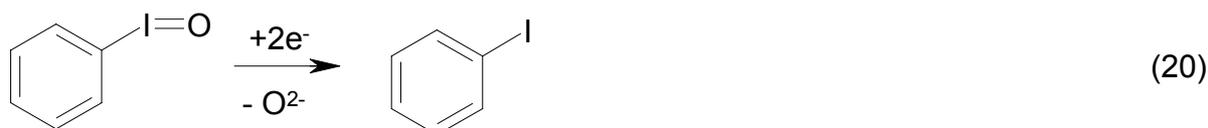
### 2.5.3 Iodosobenzol



Der zweite wichtige Bestandteil des Modellsystems ist der Lieferant des „vorreduzierten“ Sauerstoffs mit der Oxidationszahl -2. Dafür wurde in allen hier durchgeführten Untersuchungen die instabile hypervalente Iodverbindung Iodosobenzol (PhIO, Iodosylbenzol) <sup>[74]</sup> verwendet. Diese Substanz disproportioniert schon bei längerem Stehenlassen, aber auch durch Erhitzen mit Wasser zu Iodylbenzol und Iodbenzol <sup>[75]</sup>:



PhIO ist ein starkes Oxidationsmittel. Der Sauerstoff liegt mit einer Oxidationszahl von -2 elektronisch auf der Stufe des Wassers. Die Verbindung kann relativ leicht Sauerstoff übertragen, wobei es zwei Elektronen aufnimmt:

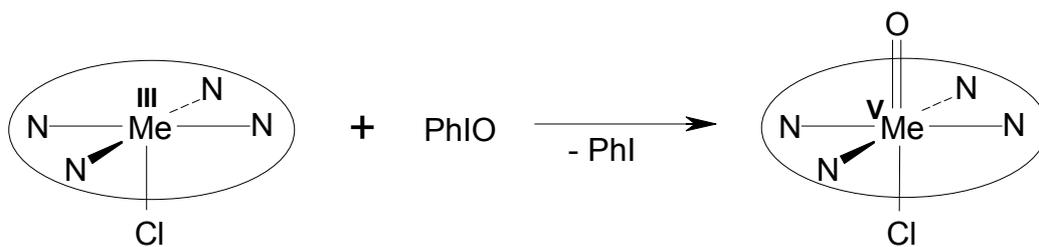


**Abbildung 15:** Umwandlung von Iodosobenzol in Iodbenzol

Bereits in den Siebzigern des letzten Jahrhunderts wurde Iodosobenzol als Sauerstoffquelle für das CytP450-System eingesetzt <sup>[76]</sup>.

Der Vorteil des Einsatzes dieser Substanz bestand darin, dass weder Iodosobenzol, noch Iodbenzol leicht zu oxidieren sind.

Bei der Reaktion zwischen Sauerstoffdonor und Porphyrin wird letzteres durch Aufnahme von zwei Elektronen in die reaktive Me(V)=O-Form gemäß Abbildung 14 („shunt“) überführt.



**Abbildung 14:** Oxidation von Me(III)TPPCl zum reaktiven Me(V)=O mittels Iodosobenzol. Diese Reaktion wurde sowohl für Eisen als auch für Mangan gezeigt <sup>[77, 78]</sup>.

## 2.5.4 Kofaktoren und Lösemittel

Neben den Bestandteilen des biomimetischen Modellsystems wurden noch weitere Substanzen zugefügt. Bei deren Auswahl wurden u. a. physiologische oder oxidative Eigenschaften berücksichtigt. Diese Verbindungen sollten zur Aufklärung des Freisetzungsmechanismus beitragen.

### 2.5.4.1 Kupfer(II)-sulfat

(CuSO<sub>4</sub>)

Kupfer stellt für den Organismus ein essentielles Spurenelement dar, wobei der normale Kupfer-Serumgehalt 12-24 µmol/l beträgt. Es ist an der Erythropoese beteiligt <sup>[79]</sup>.

Kupfer(II)-Ionen spielen eine Rolle bei der Oxidation von NO<sup>-</sup>, welches aus Hydroxylamin und Angeli's Salz (Na<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) freigesetzt wird <sup>[8, 80]</sup>.

### 2.5.4.2 Kaliumhexacyanoferrat(III)

( $K_3[Fe(CN)_6]$ , rotes Blutlaugensalz)

Kaliumhexacyanoferrat(III) wird u. a. zur Hämoglobinbestimmung eingesetzt.

Es wurde für diese Untersuchungen aufgrund seiner oxidativen Eigenschaften ausgewählt. So ist es in Lage, Oxime zu oxidieren <sup>[61]</sup>. Es eignet sich noch besser als Kupfer(II)-sulfat zur Oxidation von aus Angeli's Salz freigesetzten  $NO^-$ .

### 2.5.4.3 Lösemittel

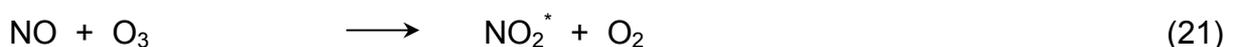
Für die hier durchgeführten Experimente wurden Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten als Lösemittel verwendet. Die meisten Untersuchungen erfolgten bei dem physiologischem pH-Wert von 7,4. Es wurden aber auch Untersuchungen bei pH 4,5 und 9,0 durchgeführt. Die Wahl eines sauren und eines basischen Milieus sollte zur Aufklärung des  $NO$ -Freisetzungsmechanismus beitragen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass eine Beckmann-Umlagerung, wie sie eingangs beschrieben wurde, unter den Bedingungen des sauren Puffers nicht stattfindet, da das Medium dafür nicht sauer genug ist (s. 2.1).

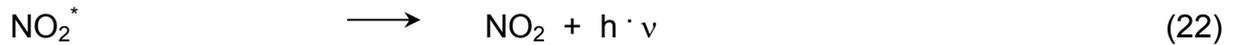
## 2.6 Die $NO$ -Messung

Die freigesetzten  $NO$ -Mengen wurden mittels der Chemilumineszenzmethode erfasst. Diese Methode ist ein sehr selektiver, direkter Nachweis für  $NO$ , womit sich durch vor geschaltete Reduktion auch Nitrit oder Nitrat nachweisen lassen.

### 2.6.1 Prinzip der Chemilumineszenzmethode

Stickstoffmonoxid reagiert mit Ozon unter Sauerstoffausschluss zu  $NO_2^*$  im angeregten Zustand.





Die Intensität der bei der Rückkehr in den Grundzustand freigesetzten Photonen ist proportional zur NO-Konzentration. Das dabei emittierte Licht umfasst den Wellenlängenbereich von 640-3000 nm und hat sein Maximum bei 1200 nm.

Die hohe Umsetzungsgeschwindigkeit ermöglicht dem Chemilumineszenz-Assay, schnell auf Änderungen in der NO-Konzentration zu reagieren. Dadurch beeinflussen andere Stickoxide das Signal nicht, weil sie zu langsam reagieren und darüber hinaus eine höhere Aktivierungsenergie benötigen.

Die Messung erfolgte mit dem NO-Analyzer 280 der Firma Sievers in Boulder, Texas (USA) (s. Abb. 15).

### 2.6.2 Versuchsaufbau

Die oben beschriebene Reaktion findet in der Reaktionszelle im Inneren des Gerätes statt. Sie umfasst ca. 20 mL. Durch dieses kleine Volumen werden scharfe Peaks erzeugt, und es ist möglich auch sehr geringe NO-Konzentrationen zu erfassen.

Das Ozon wird im Ozongenerator, der dem Messgerät vor geschaltet ist, aus Carbogen, einer Mischung aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoff als Trockenmittel, hergestellt.

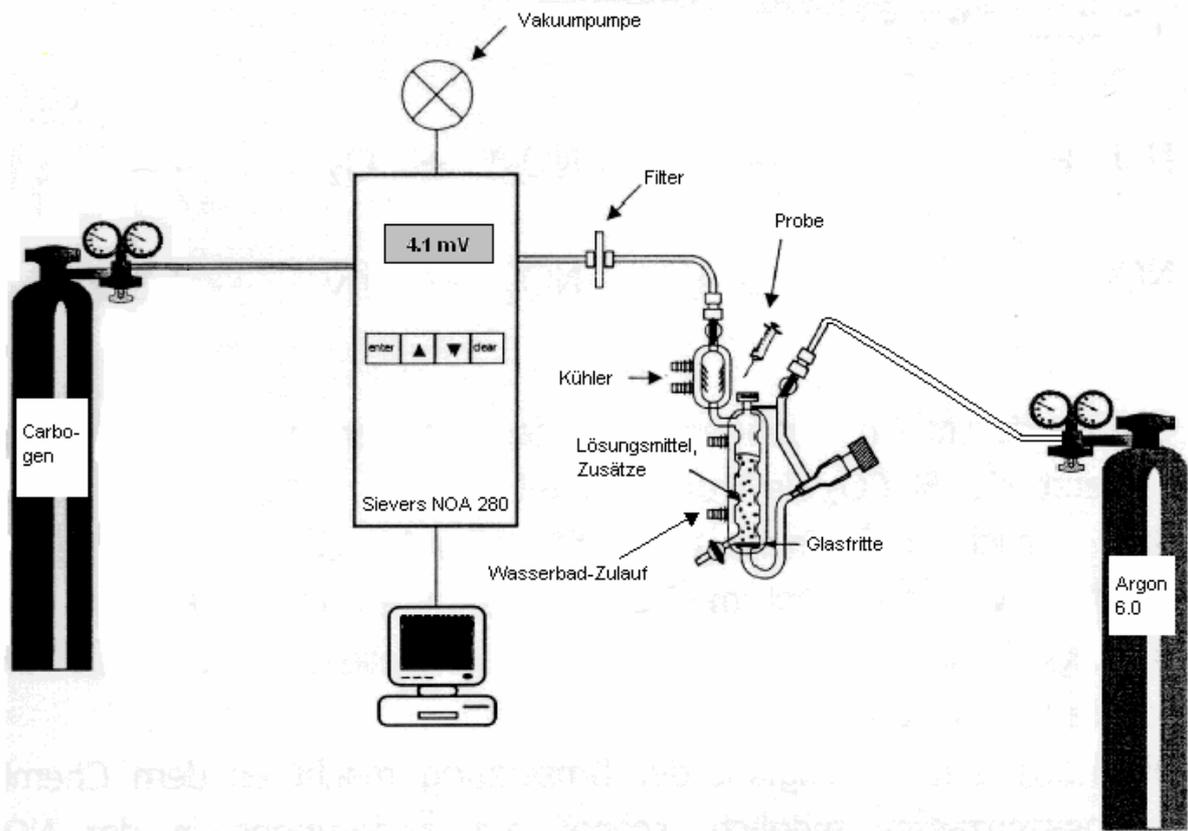
Zur Vorbeugung möglicher Auslöschung der Chemilumineszenz durch Weiterreaktion von angeregtem  $\text{NO}_2^*$  mit anderen Gas-Molekülen, muss der Druck in der Reaktionszelle niedrig gehalten werden, üblicherweise unter 15 Torr.

Die emittierten Photonen werden mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert. Dieser benötigt für seine einwandfreie Funktion Kühlung auf eine Temperatur von unter  $-10^\circ\text{C}$ . Außerdem befindet sich ein optischer Filter zwischen dem Photomultiplier und der Reaktionszelle, der nur den Durchtritt von Wellenlängen oberhalb 600 nm zulässt. Dies dient der Vermeidung von Störungen durch die Reaktion von Ozon mit anderen Spezies wie z.B. einigen schwefelhaltigen Verbindungen.

Um den Einstrom der Probe in die Reaktionszelle zu erleichtern und zur Unterstützung des Sauerstoffausschlusses sorgt eine Pumpe für einen ständigen leichten Unterdruck im System.

### 2.6.2.1 Probenaufgabe

Die Probe wird mittels einer gasdichten Spritze in einer definierten Menge durch ein Septum in das Reaktionsgefäß („purge-and-trap-reaction vessel“) überführt. Die freigesetzten NO-Mengen werden mit Hilfe von Argon als Trägergas aus dem Reaktionsgefäß in das Messgerät gespült. Für die korrekte Auswertung der Messergebnisse ist ein konstanter Gasfluss von 200 mL/min notwendig. Dieser wird durch eine Metall-Fritte als Durchflusswiderstand an der Eintrittsstelle zum Messgerät gewährleistet.



**Abbildung 15:** Versuchsaufbau für die NO-Messung nach der Chemilumineszenzmethode mit Hilfe des Gerätes der Firma Sievers <sup>[73]</sup>.

### 2.6.2.2 Messung von Nitrit und Nitrat

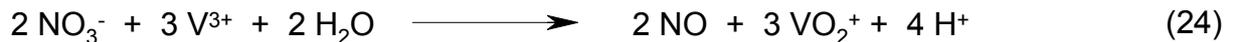
Auch die potentiellen Nebenprodukte Nitrit und Nitrat können mittels der Chemilumineszenzmethode erfasst werden. Dazu müssen jedoch entsprechende Reduktionen der Messung vorangehen, weil das Gerät nur NO erfassen kann.

Die quantitative Umsetzung von Nitrit zu NO erfolgt in einer Mischung aus konzentrierter Essigsäure und 1 % iger Kaliumiodid-Lösung bei 37°C:



Vorhandenes NO wird hier ebenfalls erfasst.

Für die quantitative Reaktion von Nitrat zu NO wird VCl<sub>3</sub> in 1 N Salzsäure als Reduktionsgemisch und eine Temperatur von 95°C benötigt:



Hierbei werden vorhandenes NO und Nitrit ebenfalls erfasst.

### 2.6.3 Messdurchführung

Für die Messungen wurde das Reaktionsgefäß des Messgerätes bei allen Bestimmungen mittels Argon anaerobisiert und mit Hilfe eines zirkulierenden Wasserbades auf 37°C/95°C temperiert (s. Abb.15).

Die Konzentrationsberechnungen wurden über die Integration der gewonnenen Peakflächen mit Hilfe der entsprechenden Kalibriergeraden durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte aufgrund der quantitativen Umsetzung von Nitrit zu NO [Gleichung (23)] sowohl für die NO- als auch für die Nitrit-Bestimmung mittels einer 5 µmol/L Kaliumnitritlösung. Für die Nitrat-Messung wurde eine 100 µmol/L Kaliumnitratlösung verwendet, da auch hier die Reaktion von Nitrat zu NO quantitativ verläuft.

Die NO-Messungen erfolgten nach direktem Einspritzen der Probe in das Reaktionsgefäß des NO-Analysers. Dabei wurde in der Flüssigkeit in situ gebildetes NO erfasst. Diese so genannte Liquid-Methode wurde im Arbeitskreis Duchstein im

Rahmen früherer Arbeiten entwickelt und etabliert <sup>[63, 73]</sup>. Die Bestimmung von Nitrit und Nitrat erfolgte ebenfalls aus Lösungen, jedoch aus externen Reaktionsgefäßen (Vials).

#### **2.6.4 Auswertung der Messergebnisse**

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte als arithmetisches Mittel aus 5 Messwerten in Säulendiagrammen. Gezeigt wird immer die Konzentration in Prozent in Abhängigkeit verschiedener Zusätze.

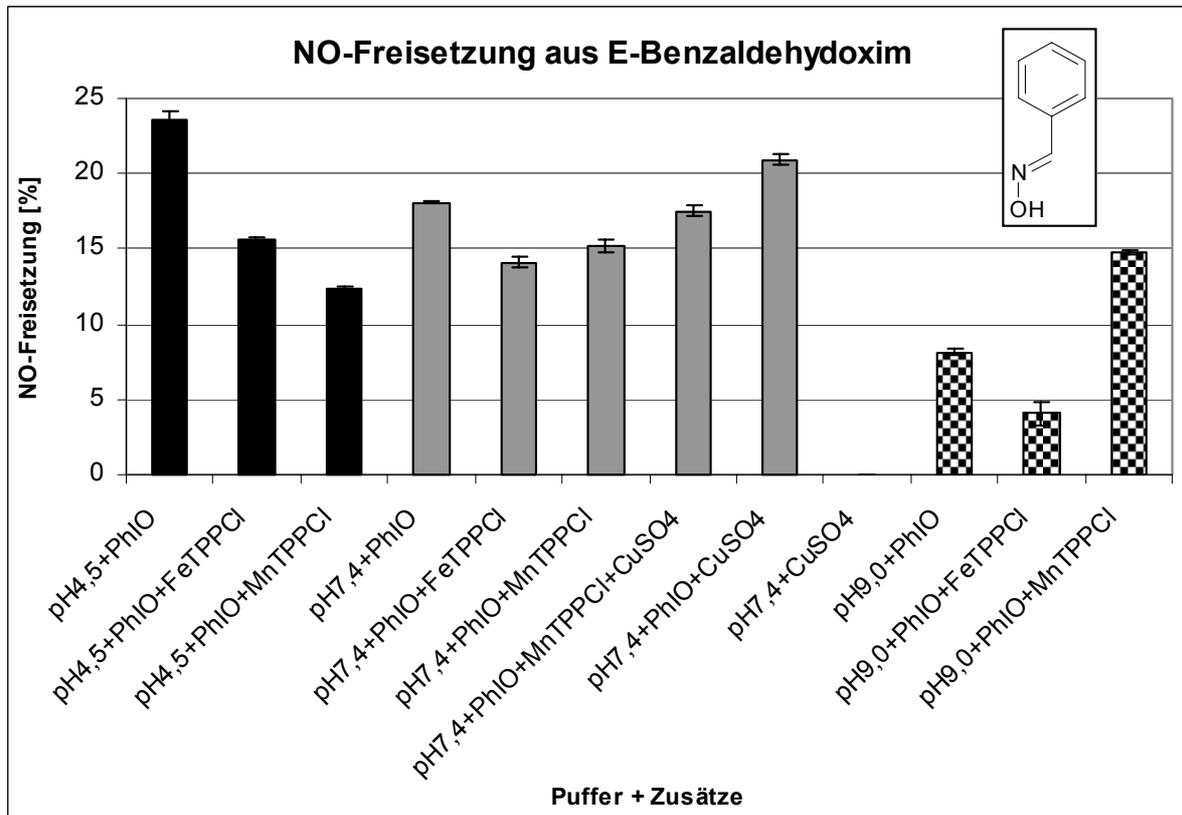
#### **2.7 Ergebnisse der NO-Messungen**

In den folgenden Graphiken sind der Übersichtlichkeit halber die verschiedenen pH-Werte durch bestimmte Muster kenntlich gemacht. Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung verwendet ( $MW \pm SD$ ). Alle Messwerte sind in % angegeben.

## 2.7.1 Aldoxime

### 2.7.1.1 *E*-Benzaldehydoxim

(BOX)



**Abbildung 16:** NO-Freisetzung aus *E*-Benzaldehydoxim.

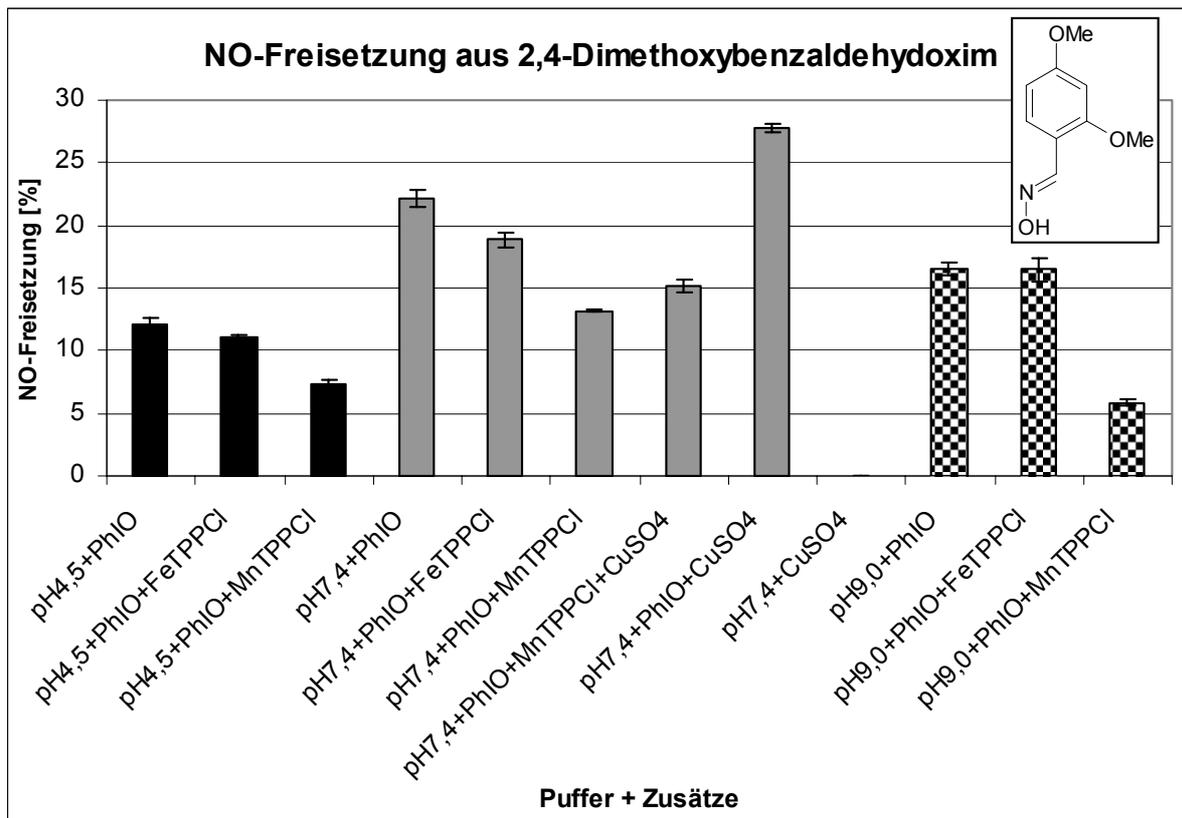
Die NO-Freisetzung aus Benzaldehydoxim sank mit steigendem pH-Wert; der höchste Wert dieser Serie wurde mit 23 % bei pH 4,5 unter alleiniger Gabe von Iodosobenzol erreicht.

Durch die Zugabe von Porphyrinen war bis auf eine Ausnahme keine Erhöhung der NO-Bildung zu verzeichnen. Es wurde sogar weniger freigesetzt als ohne Porphyrin-Zugabe bei gleichem pH-Wert. Interessant jedoch war das Verhalten von MnTPPCI unter Variation des pH-Wertes: Im sauren Milieu lag die NO-Freisetzung unter dem von FeTPPCI. Im neutralen Milieu war der nach Mangan-Porphyrin zugegebene Wert etwas höher als der mit Eisen-Porphyrin, jedoch überstieg er das Ergebnis ohne Porphyrin nicht. Im basischen jedoch war die NO-Ausbeute unter Verwendung von MnTPPCI sogar deutlich größer als ohne Porphyrin-Zusatz.

Des Weiteren wurde die NO-Freisetzung nur noch durch die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen, aber nur in Gegenwart des Sauerstoffdonors verbessert. Die alleinige Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  bewirkte keine NO-Freisetzung.

### 2.7.1.2 2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim

(DBOX)



**Abbildung 17:** NO-Freisetzung aus 2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim.

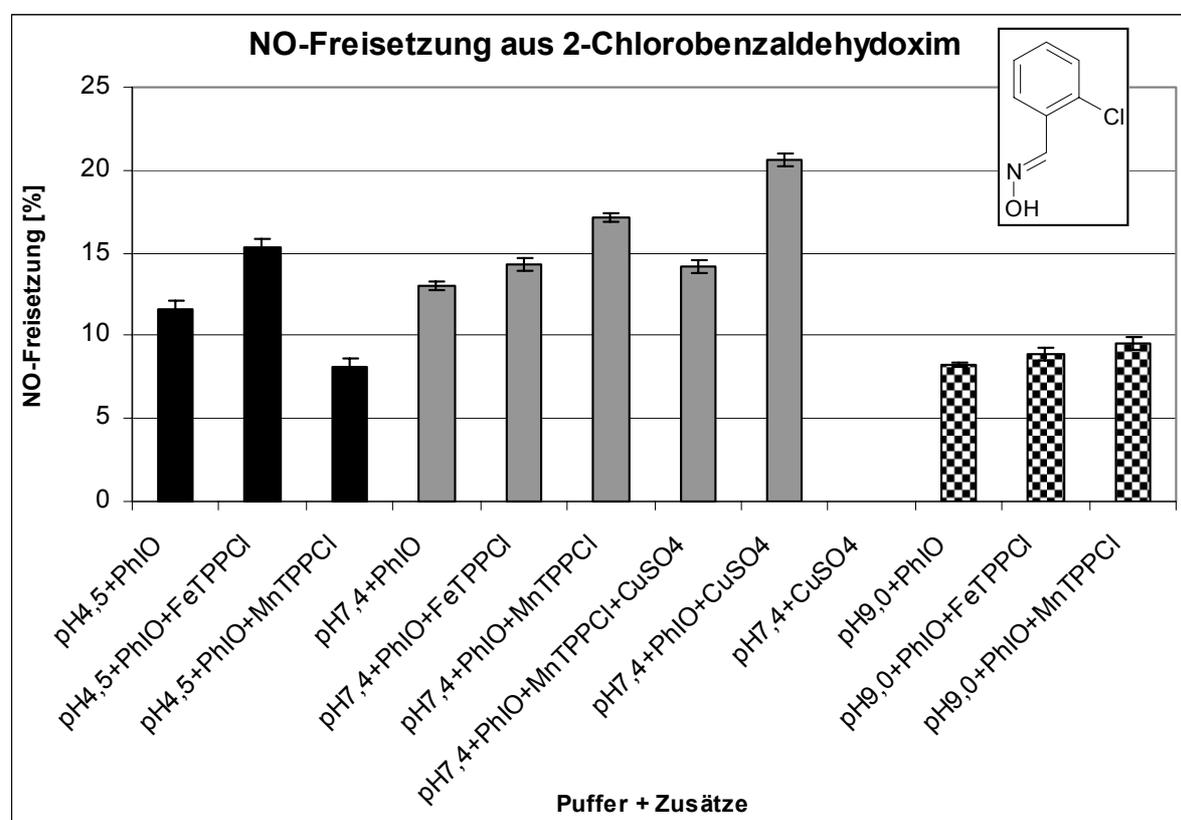
2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim setzte im neutralen Milieu am meisten, im sauren hingegen am wenigsten NO frei.

Durch die Zugabe von Porphyrinen war keine weitere Erhöhung der NO-Freisetzung zu verzeichnen. Bei pH 4,5 und 9,0 war die NO-Freisetzung unter FeTPPCI-Zugabe praktisch identisch mit den Ergebnissen ohne Porphyrin-Anwesenheit; im neutralen Milieu war sie gegenüber dem FeTPPCI-freien Versuch sogar erniedrigt. Unter der Zugabe von MnTPPCI waren in allen verwendeten Medien die Werte niedriger als ohne Porphyrin.

Der Einsatz von Kupfer(II)-Ionen brachte in Gegenwart von Iodosobenzol und ohne Porphyrin-Zusatz eine Erhöhung von immerhin 6 % gegenüber dem kupferfreien System. Dieser Wert war mit ca. 28 % der höchste aus DBOX, und die Kombination von CuSO<sub>4</sub> mit MnTPPCI erbrachte eine höhere Freisetzung als mit Porphyrin allein. Ohne den Einsatz von Iodosobenzol war auch in Gegenwart von Kupfer(II)-Ionen keine NO-Freisetzung festzustellen.

### 2.7.1.3 2-Chlorobenzaldehydoxim

(CBOX)



**Abbildung 18:** NO-Freisetzung aus 2-Chlorobenzaldehydoxim.

Chlorobenzaldehydoxim setzte im alkalischen Milieu am wenigsten NO frei; im Neutralen und im Sauren sind die Werte ohne Porphyrinzusatz fast identisch, jedoch zeigte sich eine leichte Überlegenheit der NO-Freisetzung bei pH 7,4.

FeTPPCI erhöhte die Werte im sauren Milieu gegenüber dem porphyrinfreien System; nicht aber im neutralen und alkalischen. MnTPPCI sorgte bei pH 4,5 sogar für eine Minderung der NO-Freisetzung; im neutralen Milieu fand eine leichte

Erhöhung der NO-Freisetzung statt und im Alkalischen war der Wert mit dem Ergebnis der Probe ohne Porphyrinzusatz fast identisch.

Unter Zugabe von Kupfer(II)-Ionen und dem Sauerstoffdonor bei pH 7,4 wurde hier mit ca. 21 % der höchste Wert der NO-Freisetzung aus CBOX erzielt. In Anwesenheit des MnTPPCI sanken die Werte jedoch wieder auf das Niveau des porphyrinfreien Systems. Ohne Iodosobenzol war unter CuSO<sub>4</sub>-Zusatz kein NO messbar.

### 2.7.1.4 2-Nitrobenzaldehydoxim

(NBOX)

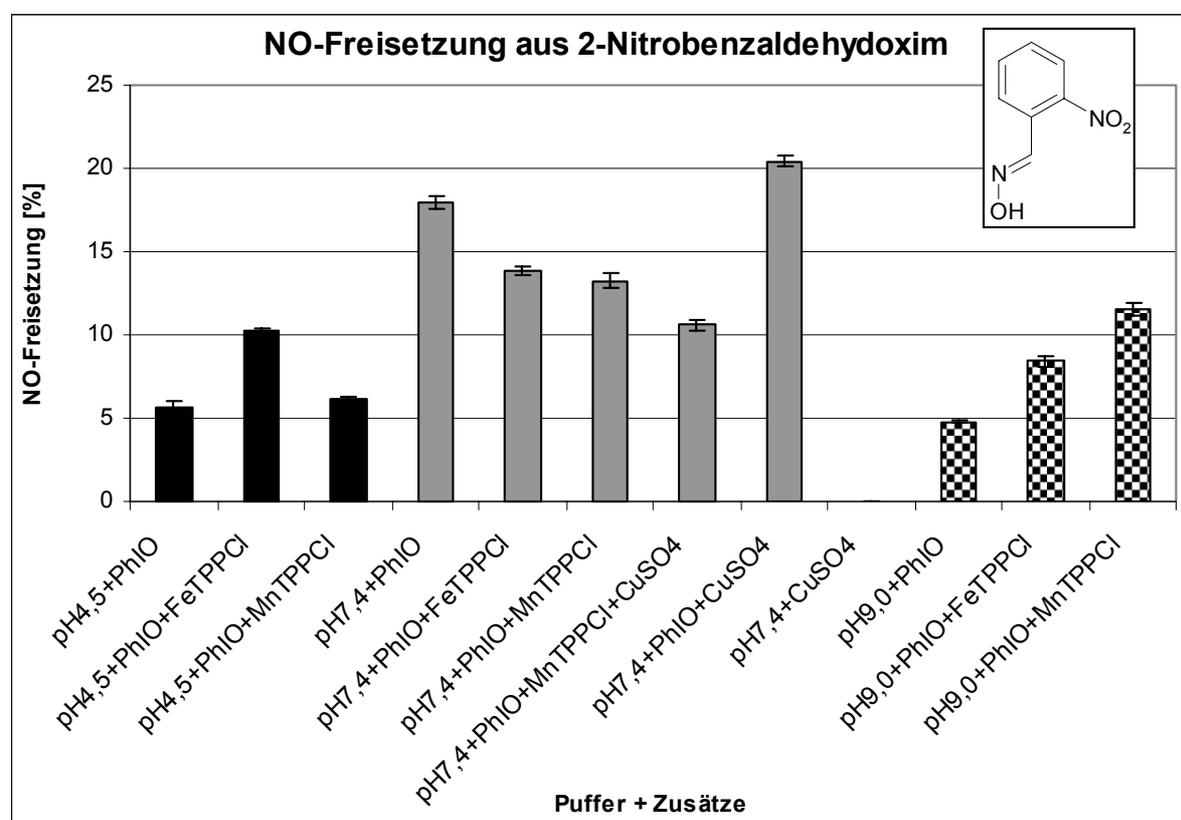


Abbildung 19: NO-Freisetzung aus 2-Nitrobenzaldehydoxim.

Nitrobenzaldehydoxim setzte bei pH 7,4 am meisten und pH 9,0 am wenigsten NO frei.

Die Zugabe von FeTPPCI brachte im sauren und alkalischen Milieu eine deutliche Verbesserung der NO-Ausbeute, jedoch nicht im neutralen, wo die NO-Freisetzung sogar erniedrigt war. Unter Verwendung von MnTPPCI wurde die Ausbeute lediglich

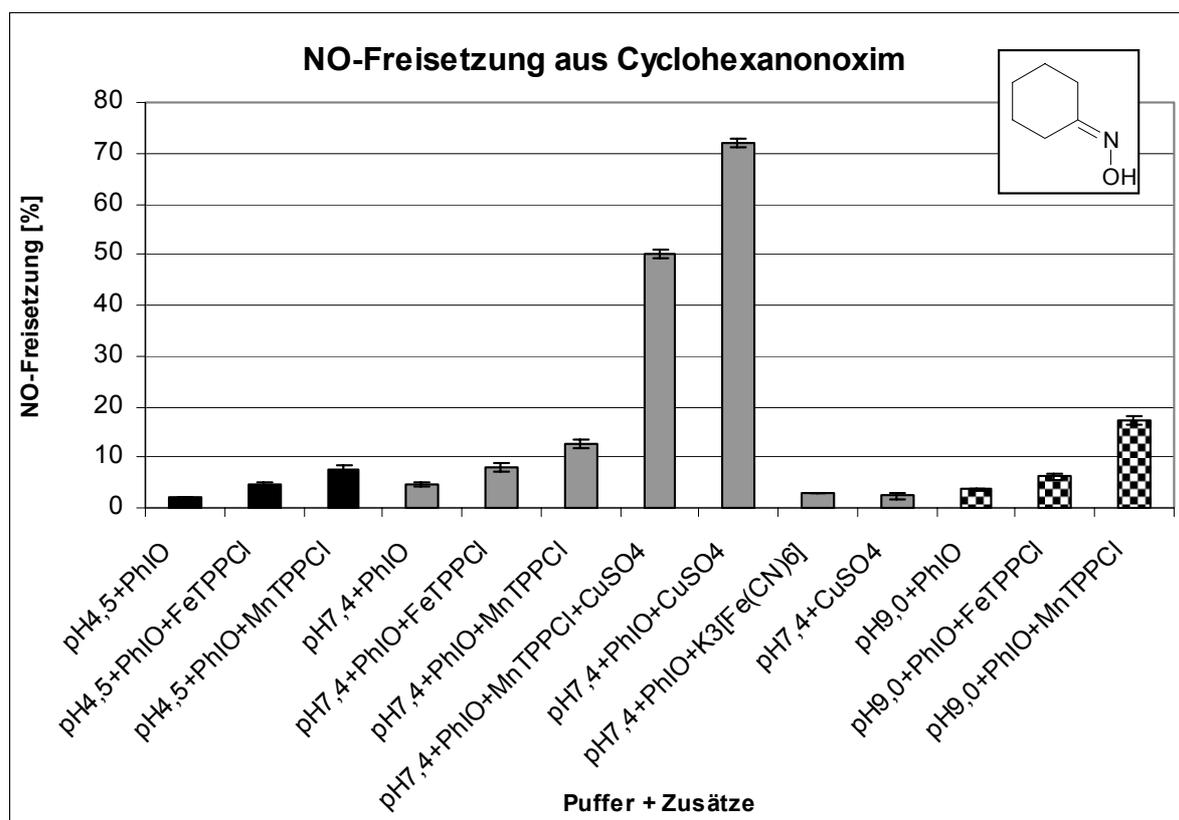
bei pH 9,0 erhöht, und zwar noch ausgeprägter als unter Eisen-Porphyrin; bei pH 4,5 gab es keinen Unterschied zwischen der NO-Freisetzung mit und ohne Porphyrinzugabe, bei pH 7,4 war der Mangan-Wert sogar etwas vermindert.

Unter Verwendung von Kupfer(II)-Ionen wurde mit 21 % der höchste Wert dieser Serie erhalten. Unter zusätzlicher MnTPPCI-Gabe war die NO-Freisetzung geringer als unter dem alleinigen Zusatz dieses Porphyrins. In Abwesenheit des Sauerstoffdonors Iodosobenzol war auch hier trotz Verwendung von  $\text{CuSO}_4$  kein NO messbar.

## 2.7.2 Ketoxime

### 2.7.2.1 Cyclohexanonoxim

(CHOX)



**Abbildung 20:** NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim.

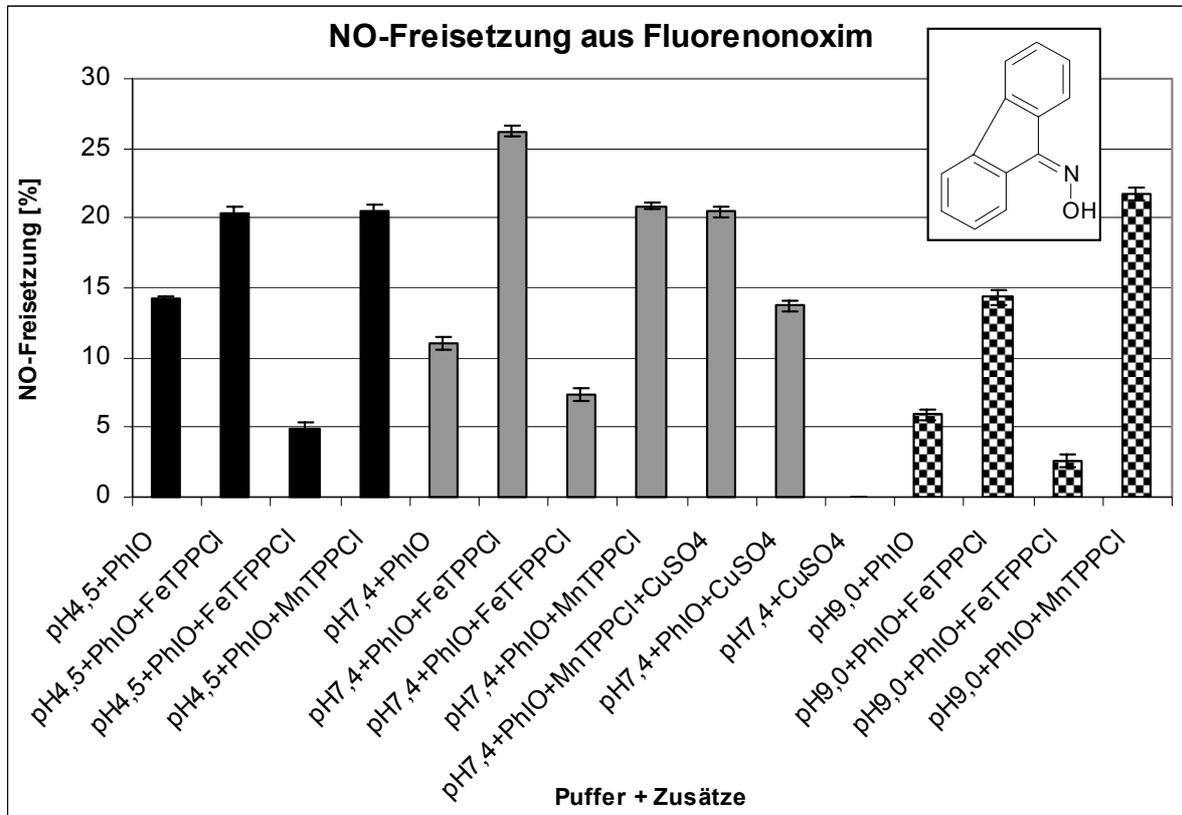
Cyclohexanonoxim setzte, wie schon bei DBOX beobachtet, im neutralen Milieu am meisten und im alkalischen am wenigsten NO frei.

Durch die Zugabe von Porphyrinen ist in allen untersuchten Medien eine Erhöhung der NO-Ausbeute zu verzeichnen; dabei war MnTPPCI dem FeTPPCI immer überlegen.

Die Erhöhung der NO-Ausbeute nach Zugabe von Kupfer(II)-Ionen ist sehr stark ausgeprägt. Unter Verwendung von MnTPPCI stieg die NO-Freisetzung mit 48 % um das dreifache im Vergleich zu der alleinigen Gabe von Porphyrin und Sauerstoffdonor; fehlte das Porphyrin, erreichten die Werte sogar knapp 72 %. Und auch ohne Iodosobenzol waren in Gegenwart von  $\text{CuSO}_4$  geringe NO-Mengen messbar. Jedoch wurde unter Zugabe des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat(III) und des Sauerstoffdonors eine so geringe NO-Freisetzung verzeichnet, dass sie kaum über dem vorigen Wert lag und sogar geringer ausfiel als unter alleiniger Iodosobenzol-Gabe.

### 2.7.2.2 Fluorennoxim

(FLOX)



**Abbildung 21:** NO-Freisetzung aus Fluorennoxim.

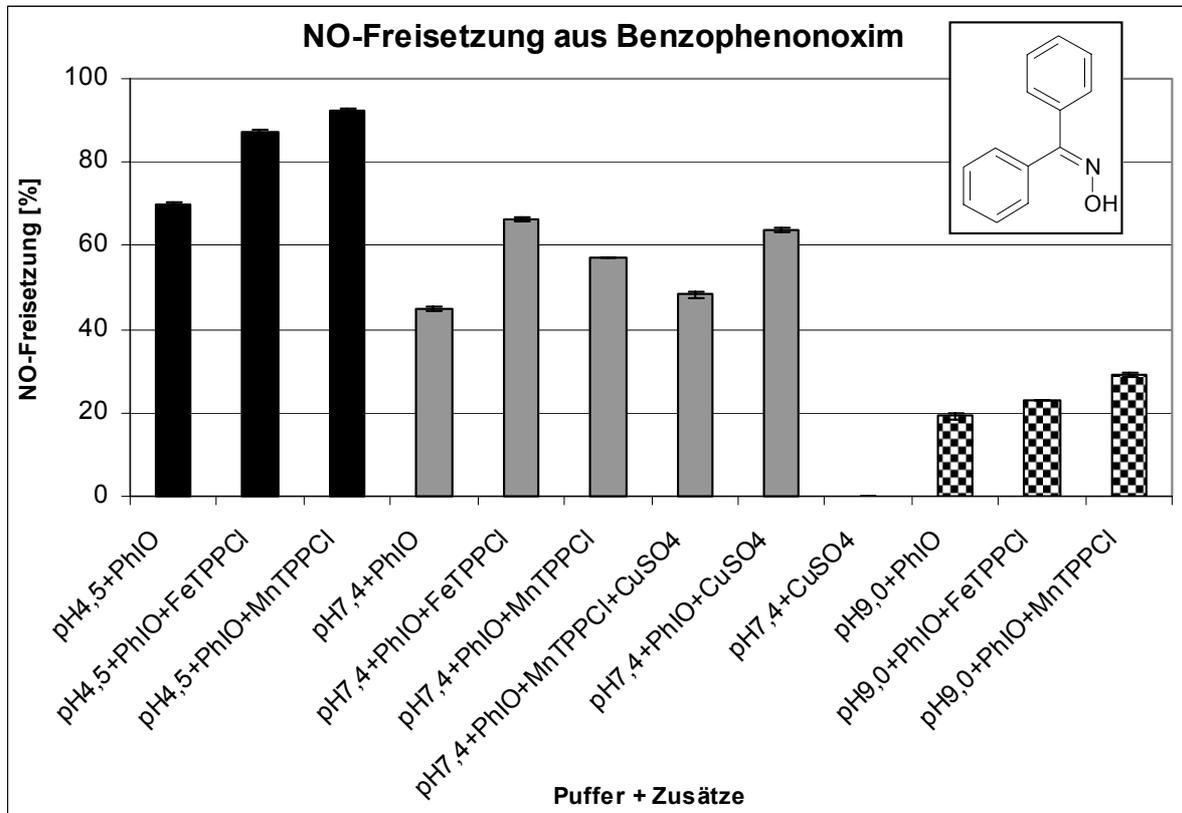
Die NO-Freisetzung von Fluorennoxim sank mit steigendem pH-Wert, was auch bei Benzaldehydoxim der Fall war.

Der Zusatz von Porphyrinen erbrachte in allen hier untersuchten Medien eine Erhöhung der NO-Ausbeute gegenüber den Porphyrin-freien Systemen. MnTPPCI war im alkalischen Milieu FeTPPCI überlegen, im neutralen war es umgekehrt. Im Sauren besitzen beide Porphyrine etwa die gleiche Leistungsfähigkeit. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten erbrachte FeTFPPCI bei diesen Untersuchungen in allen verwendeten Medien eine ausgeprägte Minderung der NO-Freisetzung gegenüber dem porphyrinfreien System.

Die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen vermochte die NO-Werte nur wenig zu erhöhen; ohne Iodosobenzol war gar kein NO messbar.

### 2.7.2.3 Benzophenonoxim

(BPOX)



**Abbildung 22:** NO-Freisetzung aus Benzophenonoxim.

Die NO-Freisetzung aus Benzophenonoxim sank mit steigendem pH-Wert, wie es auch bei Fluorenonoxim und Benzaldehydoxim der Fall war.

Die Verwendung von Porphyrinen brachte in allen untersuchten Medien eine Erhöhung der NO-Ausbeute. Dabei war das Mangan-Porphyrin sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu dem Eisen-Porphyrin überlegen. Im Neutralen war es umgekehrt. Die Erhöhung der Werte im alkalischen Milieu war unter FeTPPCL-Zusatz jedoch relativ gering.

Die zusätzliche Gabe von Kupfer(II)-sulfat zum Oxygenierungssystem brachte nur eine geringe Verbesserung der NO-Freisetzung. Dagegen konnte unter alleiniger Verwendung des CuSO<sub>4</sub> unter oxidativen Bedingungen eine Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Ausbeute beobachtet werden. Ohne Zusatz des Sauerstoffdonors war jedoch kein NO messbar.

### 2.7.3 Kinetische Betrachtung

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der NO-Bestimmung aus diesen sieben Oximen fällt unter anderem auf, dass allein die Ketoxime in allen gewählten Medien unter Verwendung von zumindest zwei der benutzten Porphyrine mit einer Erhöhung der NO-Freisetzung reagierten. Bei den Aldoximen jedoch scheint eine katalytische Wirkung zum einen von der Art der Substituenten am Aromaten abhängig zu sein und zum anderen vom pH-Wert des Lösungsmittels: Im physiologischen pH-Bereich reagierten alle Aldoxime bis auf CBOX mit einer Minderung der NO-Freisetzung. Das war überraschend, da in der Literatur durchaus von katalytischen Reaktionen zwischen Oximen und Porphyrinen berichtet wurde <sup>[44]</sup>. Allerdings handelt es sich bei allen hier abgebildeten Werten um Endpunkt-Ergebnisse, d.h. die NO-Bildung wurde bis zum Ende der Freisetzungs-Reaktion bestimmt. Diese Reaktionen dauerten unterschiedlich lang.

Die längsten Zeiten wurden hierbei mit 120 bis 180 Minuten meistens im alkalischen ermittelt. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die Reaktionszeiten bis zum Ende der NO-Freisetzung unter Berücksichtigung der einzelnen pH-Werte und Zusätze:

	<b>BOX</b> [min]	<b>DBOX</b> [min]	<b>CBOX</b> [min]	<b>NBOX</b> [min]	<b>CHOX</b> [min]	<b>FLOX</b> [min]	<b>BPOX</b> [min]
<b>pH 4,5 PhIO</b>	120	60	120	60	120	60	2
<b>pH 4,5 PhIO FeTPPCI</b>	120	60	180	60	120	60	2
<b>pH 4,5 PhIO FeTFPPCI</b>	--	--	--	--	--	30	--
<b>pH 4,5 PhIO MnTPPCI</b>	120	40	60	60	120	60	2
<b>pH 7,4 PhIO</b>	180	120	120	90	120	120	15
<b>pH 7,4 PhIO FeTPPCI</b>	180	40	60	85	120	120	10
<b>pH 7,4 PhIO FeTFPPCI</b>	--	--	--	--	--	30	--
<b>pH 7,4 PhIO MnTPPCI</b>	120	60	40	60	120	30	6
<b>pH 7,4 PhIO MnTPPCI +CuSO<sub>4</sub></b>	120	60	40	60	120	40	15
<b>pH 7,4 PhIO CuSO<sub>4</sub></b>	180	120	120	120	120	120	20
<b>pH 7,4 PhIO K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]</b>	--	--	--	--	60	--	--
<b>pH 9,0 PhIO</b>	120	180	120	60	120	120	60
<b>pH 9,0 PhIO FeTPPCI</b>	120	180	120	60	120	120	30
<b>pH 9,0 PhIO FeTFPPCI</b>	--	--	--	--	--	20	--
<b>pH 9,0 PhIO MnTPPCI</b>	120	120	60	60	120	20	15

**Tabelle 1:** Übersicht der Zeiten bis zur vollständigen NO-Freisetzung aus den hier untersuchten Oximen.

Die kürzesten Reaktionszeiten waren ganz eindeutig bei BPOX mit ca. 2 Minuten im sauren Milieu zu finden. Die längsten Zeiten wurden mit 180 min bei DBOX im Alkalischen erreicht, bei BOX im Neutralen und bei CBOX im Sauren.

Generell steigen die Reaktionszeiten mit dem pH-Wert. Die Ausnahme bildet hierbei CBOX, dessen Zersetzung im Sauren am längsten dauerte. Die Art der Zusätze hatte ebenfalls Einfluss auf die zeitliche Länge der Freisetzung.

Grundsätzlich waren die erhaltenen Freisetzungskurven unter Verwendung des Oxygenierungssystems höher, schmaler und erreichten früher die Basislinie als in den Porphyrin-freien Systemen. Dieses scheint ein Ausdruck für die katalytischen Effekte der Porphyrine auf die Oxim-Zersetzung sein. Um es besser darzustellen wurde bei den folgenden Messungen die Reaktion bereits nach 5 Minuten abgebrochen und der NO-Wert bestimmt. Diese Messmethode sollte einen Hinweis auf den kinetischen Verlauf ermöglichen, da man auf diese Weise erkennen kann, wieviel NO bereits in den ersten Minuten der Freisetzung gebildet wird. Bei einer Reaktion, die schnell verläuft ist die gebildete NO-Menge nach 5 Minuten sehr viel höher als bei einer langsamen NO-Freisetzungsreaktion. Die katalytische Wirkung der Porphyrine auf die NO-Bildung sollte dadurch deutlicher werden.

Der Vergleich der NO-Werte nach 5 Minuten mit den Endpunkt-Werten wurde nur im physiologischen Milieu durchgeführt, da lediglich dieser Bereich für die Untersuchung auf Enzyimbeteiligung interessant ist. Lediglich die Kombination Puffer und  $\text{CuSO}_4$  wurde nicht untersucht, da die NO-Freisetzung unter diesen Bedingungen bei fast allen gewählten Oximen ausblieb.

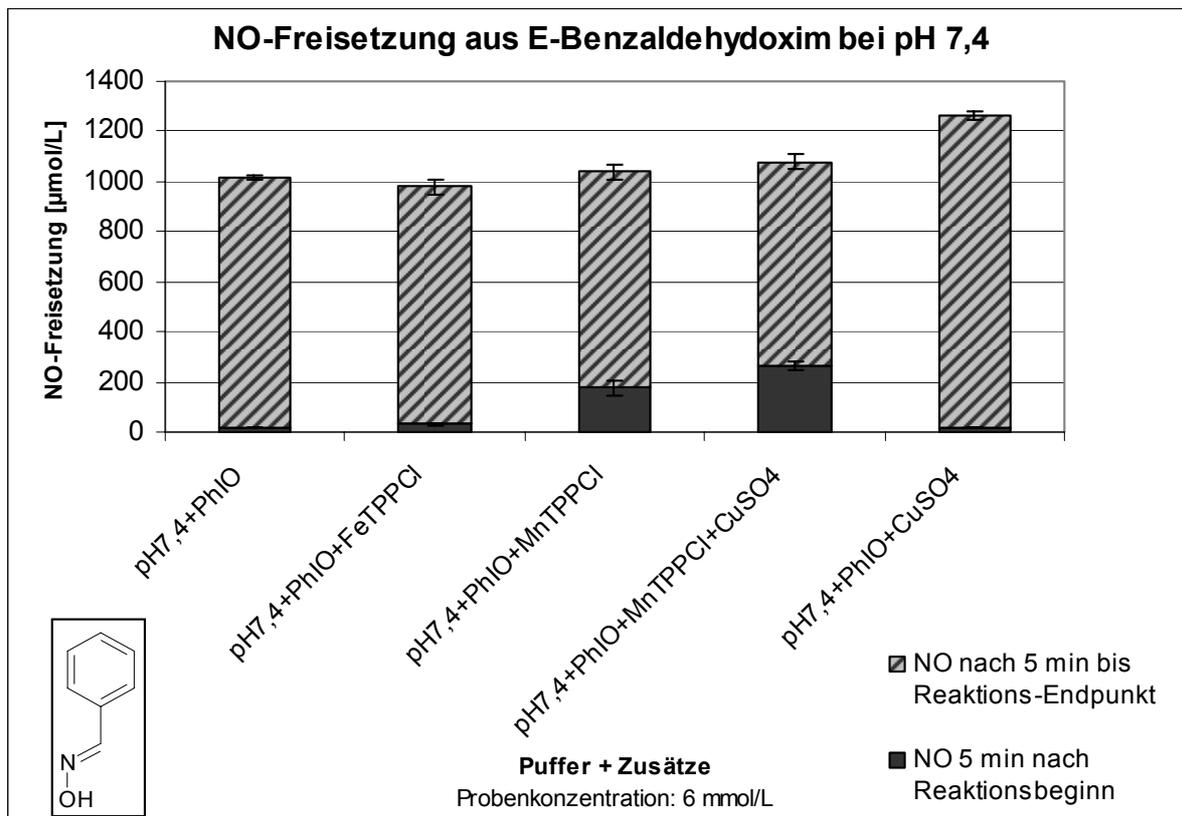
Die Prozentangaben in dem Text sind keine absoluten Werte. Sie sollen lediglich den NO-Anteil, der in den ersten 5 Minuten der Reaktion gebildet wird, im Vergleich zu der gesamten erhaltenen NO-Menge darstellen, und somit einen Hinweis auf die Freisetzungsgeschwindigkeit geben. Dabei wurde der Endpunkt-NO-Wert gleich 100 % gesetzt.

Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung verwendet. Die Probenanzahl  $n$  beträgt 5. Die Angaben wurden in  $\mu\text{mol/L}$  gemacht. Das jeweilige Ergebnis der Endpunktmessung wurde zum Vergleich ebenfalls in die Graphiken eingetragen. Dabei stellt jede Säule die gebildete NO-Menge bis zur Beendigung der Reaktion unter den jeweiligen Bedingungen dar. Der untere, schwarze Teil steht für das

gebildete NO nach 5 Minuten. Der gestreifte Säulenteil stellt diejenige NO-Menge dar, die ab dieser Zeit bis zur Beendigung der Reaktion freigesetzt wird.

### 2.7.3.1 Aldoxime:

#### *E*-Benzaldehydoxim (BOX)

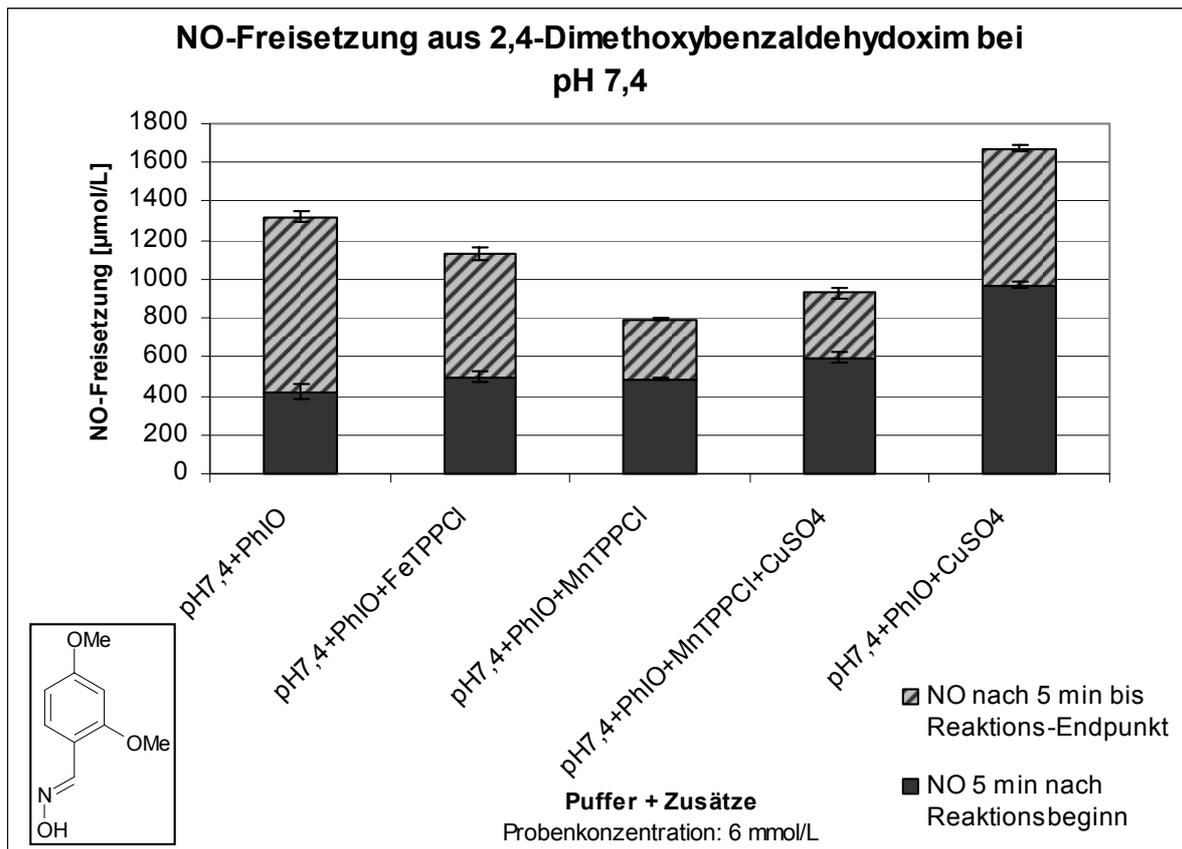


**Abbildung 23:** NO-Freisetzung aus *E*-Benzaldehydoxim.

Unter Verwendung des Oxygenierungssystems war nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten Menge bereits mehr NO frei geworden als in den Porphyrin-freien Systemen. Besonders stark ausgeprägt ist dieses Phänomen bei den MnTPPCl-Kombinationen. Dort konnten 17 bzw. 24 % der gesamten NO-Freisetzung bereits nach 5 Minuten gemessen werden. Gleichzeitig waren diese Werte die höchsten, die nach 5 Minuten erhalten wurden. Die zusätzliche Gabe von Kupfer(II)-Ionen beschleunigte die Freisetzung. Dagegen entspricht die NO-Bildung nach 5 Minuten ohne das Porphyrin in etwa der ersten Messung unter alleiniger Verwendung von

Iodosobenzol. Beide Kombinationen setzten nach 5 Minuten 2 % der gesamten NO-Menge frei.

### 2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim (DBOX)

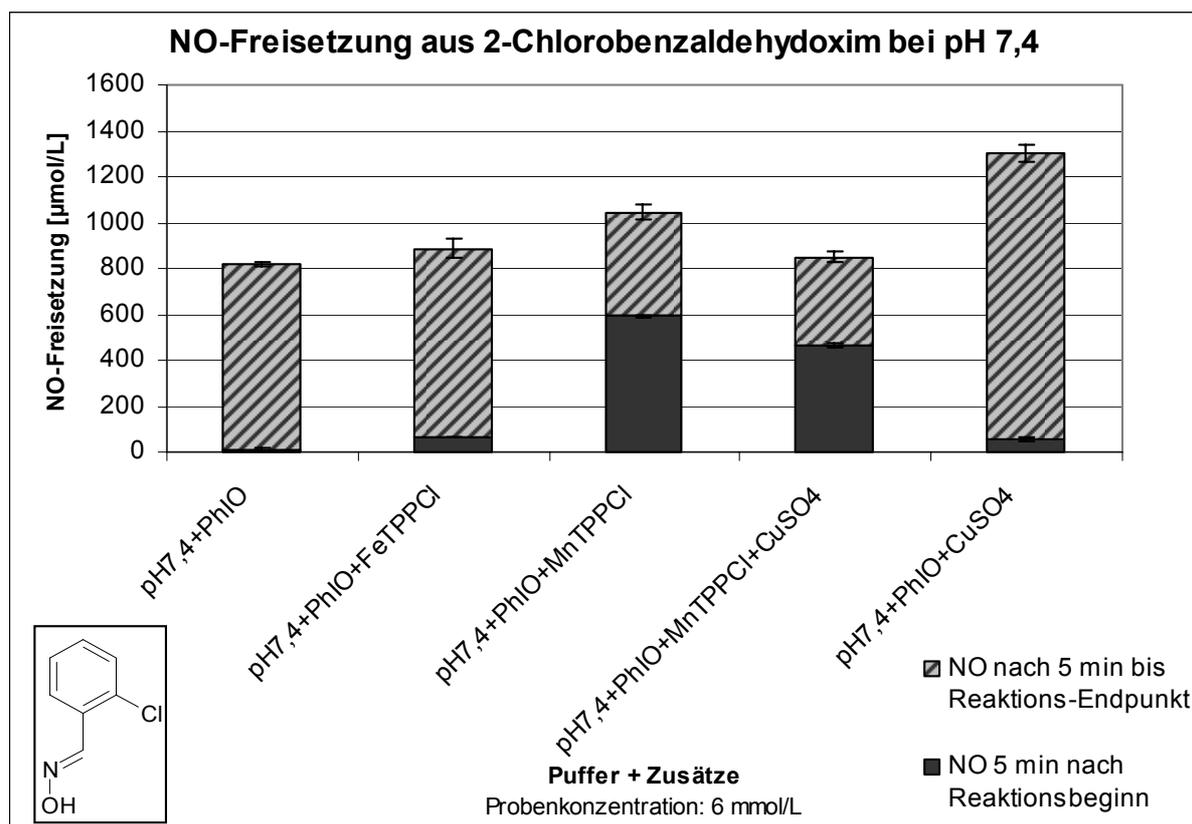


**Abbildung 24:** NO-Freisetzung aus 2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim.

Auch bei DBOX war in den Proben, in denen Porphyrine verwendet wurden, nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten Menge bereits mehr NO frei geworden, als in dem System in denen lediglich Iodosobenzol zugesetzt wurde. Der prozentuale Anteil der gebildeten NO-Menge nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten NO-Freisetzung beträgt bei der alleinigen Gabe des Sauerstoffdonors 31 %, und liegt damit unter den Werten, die unter Zugabe des Oxygenierungssystem erhalten wurden. Hier beträgt der prozentuale Anteil 44 % für FeTPPCI und 62 bzw. 64 % für die beiden Mangan-Werte (MnTPPCI/ MnTPPCI + CuSO<sub>4</sub>). Unter der Gabe von Kupfer(II)-Ionen und Iodosobenzol bildete sich bereits nach 5 Minuten 58 % der

gesamten NO-Menge. Das liegt über dem Wert der nach alleinigem Zusatz des Sauerstoffdonors erhalten wurde

### 2-Chlorobenzaldehydoxim (CBOX)

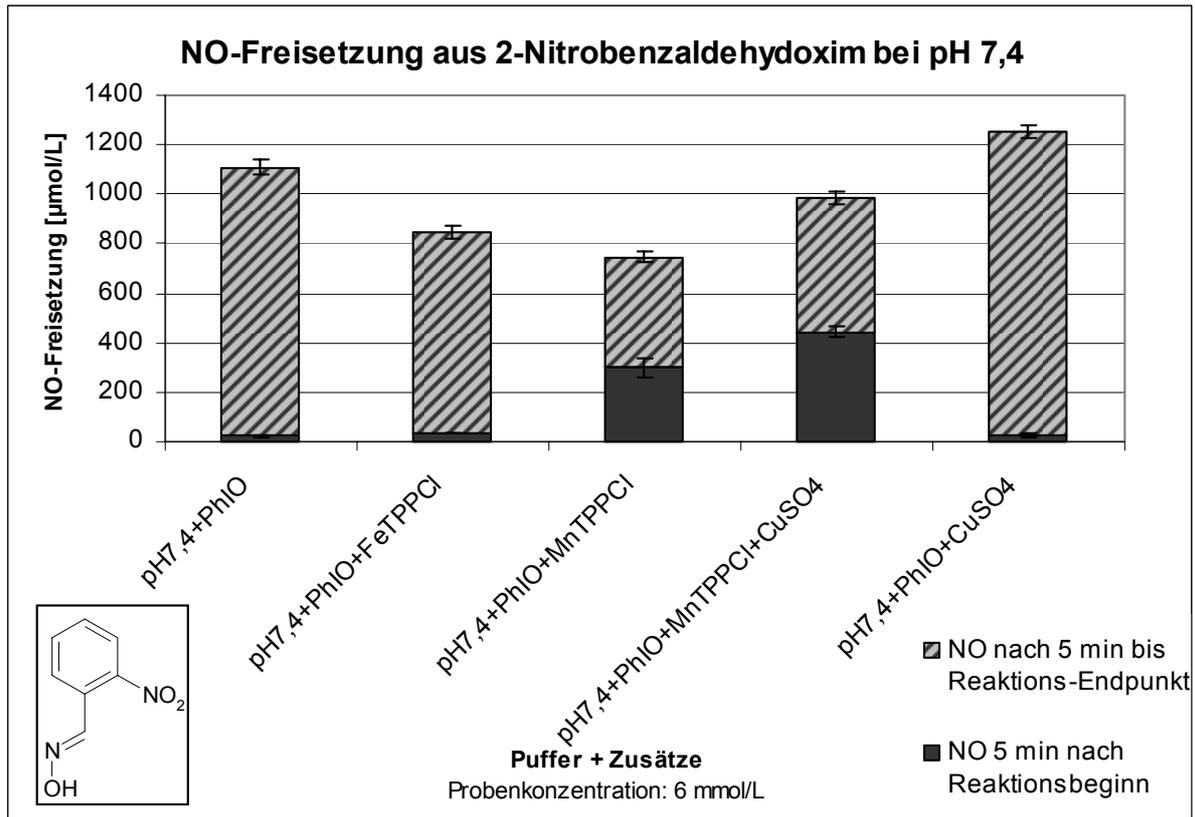


**Abbildung 25:** NO-Freisetzung aus 2-Chlorobenzaldehydoxim.

In den Medien, in denen das Oxygenierungssystem verwendet wurde, war nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten Menge bereits mehr NO frei geworden, als in den Porphyrin-freien Systemen. Unter der alleinigen Verwendung des Sauerstoffdonors wurde nach 5 Minuten lediglich 1 % der gesamten NO-Menge freigesetzt, unter Verwendung von FeTPPCI waren es 7 % und mit MnTPPCI konnten 57 % der Gesamtfreisetzung gemessen werden. Der letzte Wert stellt das höchste Ergebnis dar, das hier nach 5 Minuten Reaktionszeit erzielt wurde. Die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen zusammen mit MnTPPCI erbrachte im Gegensatz zu BOX keine zusätzliche Beschleunigung der Freisetzungsreaktion. Ohne das Porphyrin lag die NO-Bildung nach 5 Minuten mit 5 % der Gesamt-NO-Menge zwar

über der Messung unter alleinigem PhIO-Zusatz, jedoch war der Unterschied deutlich geringer als zwischen porphyrinhaltigen und porphyrinfreien Systemen.

### 2-Nitrobenzaldehydoxim (NBOX)



**Abbildung 26:** NO-Freisetzung aus 2-Nitrobenzaldehydoxim.

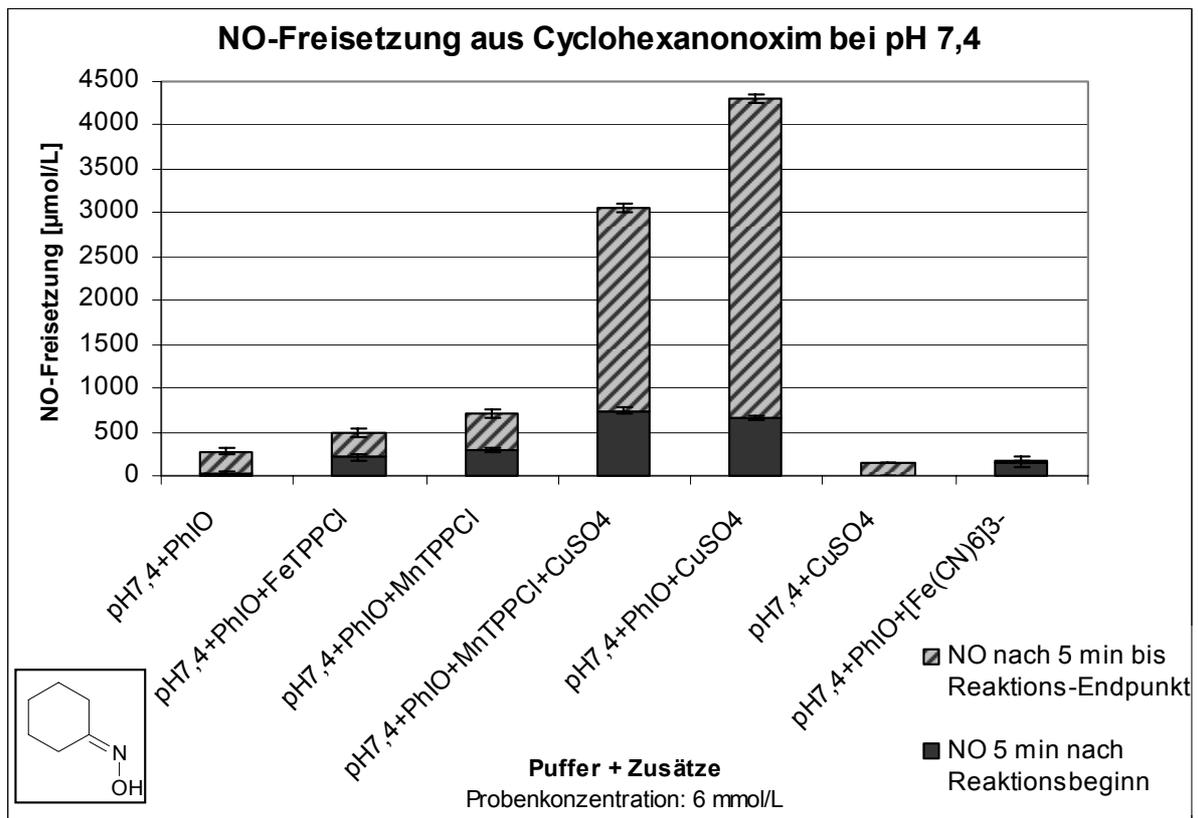
NBOX zeigte denselben Effekt, wie die bisher beschriebenen Benzaldehydoxim-Derivaten. In den Proben, in denen das Oxygenierungssystem verwendet wurde, war nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten Menge bereits mehr NO frei geworden, als in den porphyrinfreien Systemen. Bei alleiniger Verwendung des Sauerstoffdonors wurde nach 5 Minuten lediglich 2 % der gesamten NO-Menge freigesetzt, unter Verwendung von FeTPPCL waren es 4 % und mit MnTPPCL konnten 40 % der Gesamtfreisetzung nach 5 Minuten gemessen werden.

Die Zugabe von Kupfer(II)-Ionen zusammen mit MnTPPCL erbrachte wie bei CBOX und BOX eine leichte Beschleunigung der Freisetzungsreaktion. Ohne das Porphyrin war die NO-Bildung nach 5 Minuten mit 2 % der Gesamt-NO-Menge genau so hoch wie bei der alleinigen Zugabe von Iodosobenzol. Die Zugabe von MnTPPCL und

CuSO<sub>4</sub> lieferte mit 44 % der gesamten NO-Bildung den höchsten Wert nach 5 Minuten Reaktionsdauer.

### 2.7.3.2 Ketoxime

#### Cyclohexanonoxim (CHOX)



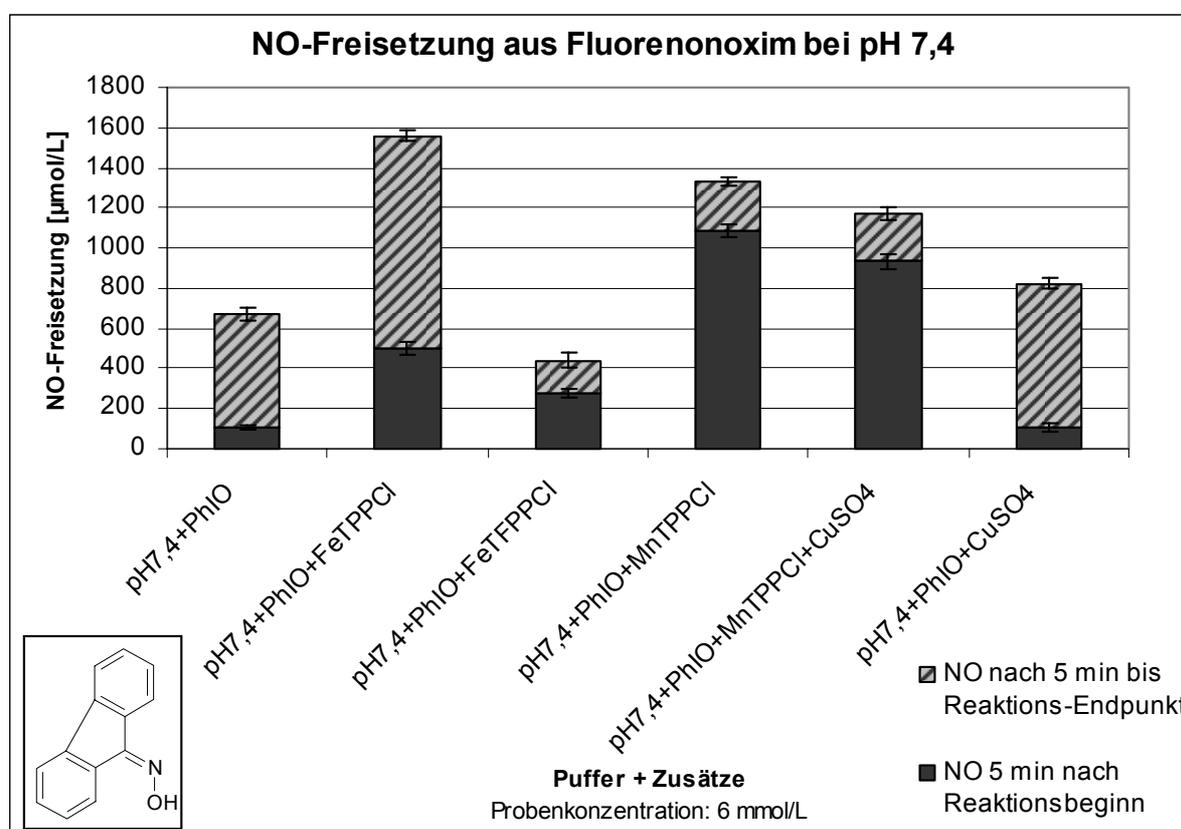
**Abbildung 27:** NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim.

Bei Cyclohexanonoxim wurde in den porphyrinhaltigen Systemen nach 5 Minuten im Vergleich zu der gesamten Menge bereits mehr NO freigesetzt, als in den porphyrinfreien. Dabei war FeTPPCI im Gegensatz zu den Endpunktmessungen dem Mangan-Porphyrin deutlich überlegen.

Unter der alleinigen Verwendung des Sauerstoffdonors wurde nach 5 Minuten 11 % der gesamten NO-Menge freigesetzt. Unter Verwendung von FeTPPCI waren es 44 %. Dieses Ergebnis stellt den höchsten Wert dar, der nach 5 Minuten ermittelt wurde. Mit MnTPPCI konnten 35 % der gesamten NO-Ausbeute nach 5 Minuten gemessen werden. Die zusätzliche Gabe von Kupfer(II)-Ionen zum

Oxygenierungssystem erbrachte mit 24 % des NO-Endwertes eine kleine Minderung. Ohne Porphyrin war die NO-Bildung nach 5 Minuten mit 16 % der Gesamt-NO-Menge etwa nur noch leicht gegenüber der alleinigen PhIO-Zugabe erhöht. Die Verwendung von  $\text{CuSO}_4$  ohne Sauerstoffdonor erzeugt nach 5 Minuten lediglich 1 % der gesamten Freisetzung. Unter dem Zusatz PhIO und Kaliumhexacyanoferrat(III) setzte CHOX nach dem definierten Zeitraum bereits 74 % der gesamten NO-Ausbeute frei.

### Fluorenonoxim (FLOX)

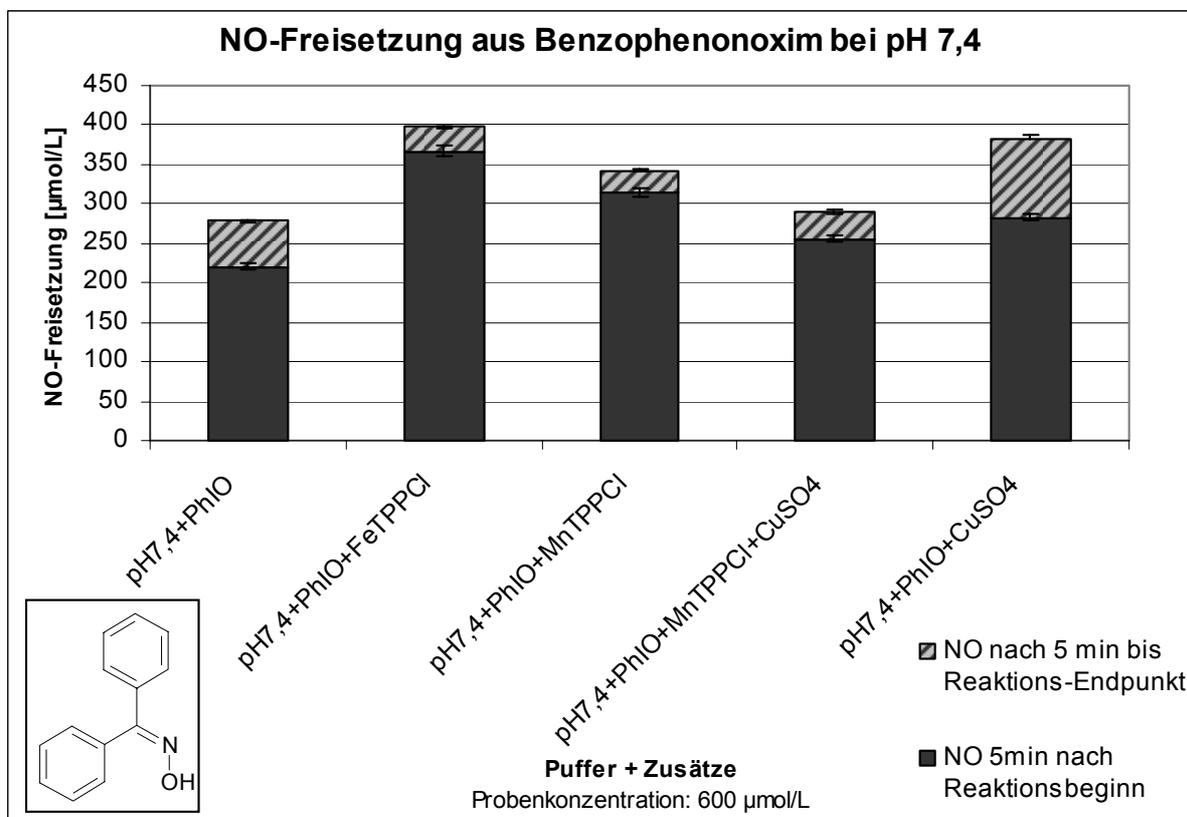


**Abbildung 28:** NO-Freisetzung aus Fluorenonoxim.

Fluorenonoxim lieferte nach 5 Minuten Reaktionszeit in beiden porphyrinfreien Systemen (Iodosobenzol allein und in Kombination mit  $\text{CuSO}_4$ ) deutlich weniger NO im Vergleich zu dem Ergebnis der Endpunkt-Messung, als unter Verwendung der Porphyrine. Dabei war das MnTPPCI auch hier im Gegensatz zu der Endpunkt-Messung etwas leistungsfähiger als die hier verwendeten Eisen-Porphyrine. Unter

Zusatz von FeTPPCI war nach 5 Minuten 32 % der gesamten NO-Menge gebildet worden, unter FeTFPPCI 63 % und unter MnTPPCI 82 % bzw. 79 % (letzteres bezieht sich auf die Kombination MnTPPCI mit CuSO<sub>4</sub>). Besonders interessant ist der 5-Minuten-Wert nach Zusatz von FeTFPPCI, da unter Verwendung dieses Porphyrins bei der Endpunkt-Messung die NO-Ergebnisse noch unter den Werten nach alleiniger Verwendung des Sauerstoffdonors lagen.

### Benzophenonoxim (BPOX)



**Abbildung 29:** NO-Freisetzung aus Benzophenonoxim.

Benzophenonoxim setzte ebenfalls unter Verwendung des Oxygenierungssystems nach 5 Minuten mit ca. 90 % im Mittel sehr viel mehr NO frei im Vergleich zur gesamten Menge als ohne Porphyrin-Gabe. Das Ergebnis unter alleinigem Einsatz des Sauerstoffdonors lag mit 79 % der gesamten NO-Freisetzung nach 5 Minuten deutlich darunter. Dasselbe gilt mit 74 % des Ergebnisses der Endpunkt-Bestimmung für die Kombination Iodosobenzol mit CuSO<sub>4</sub>.

Der Zusatz von Kupfer(II)-sulfat verringerte geringfügig die Ausbeute nach 5 Minuten gegenüber der alleinigen Gabe von MnTPPCI.

Hier wurden unter allen hier verwendeten Zusätzen nach 5 Minuten bereits relativ hohe NO-Werte erreicht, die z.T. nur noch wenig von den ermittelten Endpunktwerten abwichen, besonders nach Verwendung des Oxygenierungssystems (Porphyrin mit PhIO).

## **2.8 Ergebnisse der Nitrit-Messung am Beispiel von Fluorennoxim**

Die Bestimmung der Nitrit-Freisetzung war aus mehreren Gründen für diese Arbeit von Interesse:

1. Nitrit ist das wichtigste NO-Oxidationsprodukt in wässriger Lösung unter oxidativen Bedingungen.
2. In der Literatur ist vielfach neben der NO-Freisetzung auch von einer Nitrit-Bildung aus Oximen die Rede <sup>[41]</sup>.
3. Es wurden bei der Vermessung selten höhere Stickstoffmonoxid-Ausbeuten als 30 % gefunden. Eine Weiteroxidation von NO zu Nitrit durch Iodosobenzol oder das Oxygenierungssystem ist denkbar und könnte für niedrige Stickstoffmonoxid-Ausbeuten mit verantwortlich sein.

In unserem Arbeitskreis wurde bereits in früheren Studien die Freisetzung von Nitrit aus Oximen und anderen Hydroxyimino-Verbindungen gut untersucht <sup>[63, 73]</sup>. Daher sollte diese Stickstoffspezies nur beispielhaft anhand eines Oxims bei pH 7,4 vermessen werden. Die Wahl fiel hierbei auf FLOX, da die NO-Freisetzung aus dieser Verbindung durch das Oxygenierungssystem gesteigert werden konnte. Außerdem wurde das Oxim bereits erfolgreich als Modellsubstanz für die NO-Biosynthese verwendet <sup>[44]</sup>. Die Auswahl der Zusätze orientierte sich dabei an der Stickstoffmonoxid-Bestimmung.

Die Messung der Nitrit-Freisetzung konnte jedoch nicht wie bei der NO-Bestimmung direkt aus dem Reaktionsgefäß untersucht werden. Stattdessen mussten die Freisetzungsreaktionen in externen „Vials“ durchgeführt werden, aus denen die Proben nach Reaktionsabschluss in das Reaktionsgefäß gespritzt wurden. Das

bereitete jedoch einige Probleme. Es stellte sich heraus, dass die Nitrit-Freisetzung nicht proportional zur eingesetzten Oxim-Konzentration ist. Deswegen konnten die ermittelten Werte lediglich zu vergleichenden Aussagen herangezogen werden.

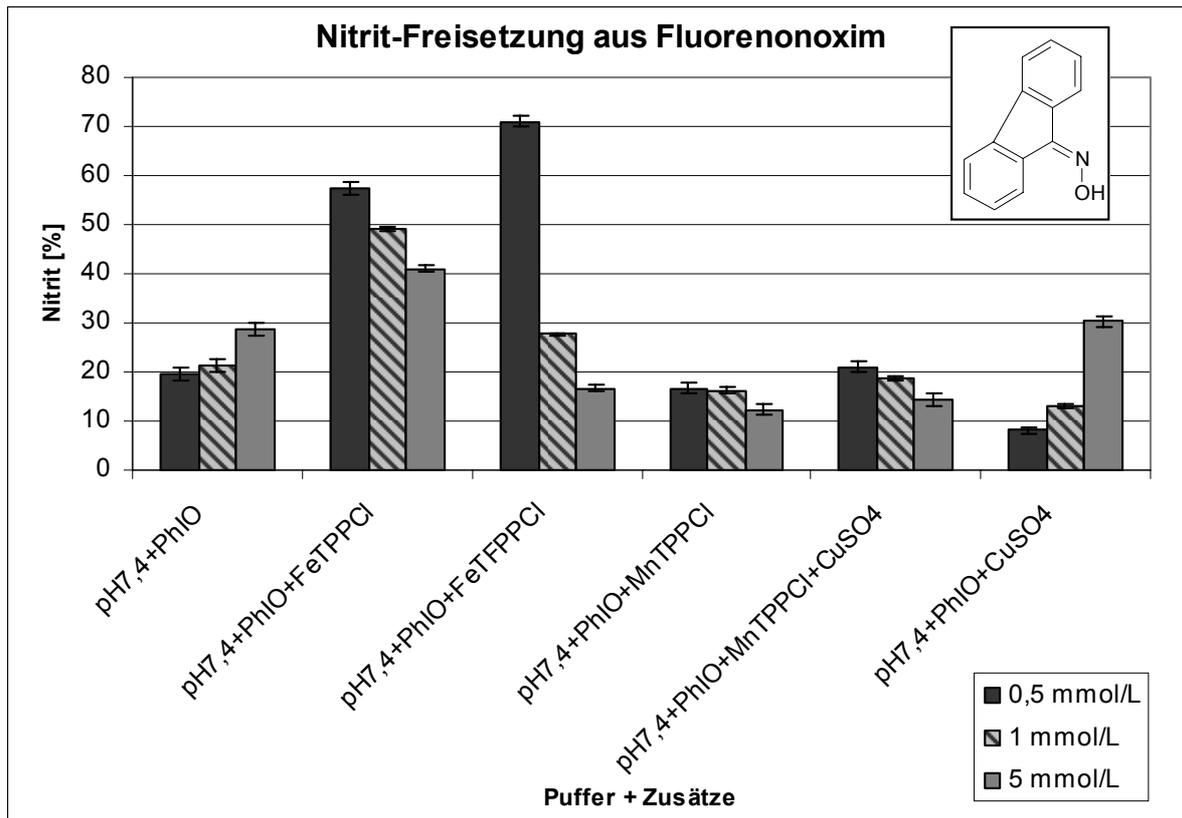
Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurde FLOX in drei verschiedenen Konzentrationen vermessen:

- 0,5 mmol/L
- 1 mmol/L
- 5 mmol/L

Die Werte sind in Prozent angegeben. Die Stichprobenanzahl  $n$  beträgt 5. Die Standardabweichung dient als Fehlerindikator ( $MW \pm SD$ ).

Es war keine Nitrit-Freisetzung aus FLOX nach alleinigem Zusatz von Kupfer(II)-sulfat messbar.

Das Ende der Reaktion bzw. die Maximum-Werte wurden wie folgt ermittelt: Die erste Messung erfolgte sofort nach der Zugabe der Probe zu den Reagenzien, die zweite 5 Minuten nach Inkubation bei 37°C. Dann wurde alle 2 Minuten gemessen bis die Werte ein Maximum erreichten. Zur Überprüfung ob die Freisetzungsreaktion beendet worden war, erfolgte nach 2 Stunden bei 37°C eine Kontroll-Messung.



**Abbildung 30:** Nitrit-Freisetzung aus Fluorenonoxim.

Außer bei alleiniger Gabe von Iodosobenzol und unter Verwendung von Sauerstoffdonor mit MnTPPCCI bei den Konzentrationen 0,5 mmol/L und 1 mmol/L lieferten alle Konzentrationen bei gleichen Zusätzen unterschiedliche Werte.

Die Nitrit-Freisetzung verhielt sich in den porphyrinfreien Systemen proportional zur eingesetzten Oxim-Konzentration. Unter Verwendung des Oxigenierungssystems war es umgekehrt. Dabei ist dieses Phänomen umso ausgeprägter je höher die Konzentration ist. Der höchste Nitrit-Wert wurde mit 71 % unter Verwendung von FeTFPPCCI bei einer Probenkonzentration von 0,5 mmol/L ermittelt. Der Einsatz von FeTPPCCI erbrachte in den übrigen Probenkonzentrationen mit 49 % für 1 mmol/L und 41 % für 5 mmol/L die zweit- bzw. dritthöchsten Werte. Die Werte der Konzentrationen 0,5 mmol/L- und die 1 mmol/L unterschieden sich im Freisetzungsprofil bis auf jene mit FeTFPPCCI nicht. Während der höchste Nitrit-Wert bei 0,5 mmol/L unter Zusatz von FeTFPPCCI erlangt wurde, geschieht dies bei 1 mmol/L nach Verwendung von FeTPPCCI. Der zweithöchste Wert war der, welcher unter Zusatz von FeTFPPCCI erhalten wurde. Die niedrigste Ausbeute wurde unter der Kombination PhIO mit CuSO<sub>4</sub> erhalten. Unter Verwendung des Mangan-Porphyrins konnte im Gegensatz zu der NO-Messung keine Erhöhung der Nitrit-Ausbeute

gemessen werden. Die Werte waren unter der Gabe von MnTPPCI sogar leicht vermindert. Die zusätzliche Verwendung von Kupfer(II)-Ionen konnte bei der Konzentration 0,5 mmol/L das Ergebnis auf das Niveau der ersten Messung anheben, in der nur der Sauerstoffdonor verwendet wurde. Bei der Konzentration 1 mmol/L blieb die Nitrit-Bildung dennoch unter diesem Wert.

Die Zusatz-abhängigen Freisetzungsprofile waren zwischen den drei eingesetzten Konzentrationen z.T. sehr unterschiedlich. Dies zeigte sich unter anderem in dem Vergleich des Ergebnisses nach alleiniger Zugabe von Iodosobenzol mit dem nach Zusatz von FeTFPCI: Bei der Verwendung von 0,5 mmol/L war der Wert nach Porphyrin-Zugabe sehr viel höher. Bei 1 mmol/L lag der Wert nur wenig darüber. Bei 5 mmol/L konnte sogar eine Erniedrigung der Ausbeute gegenüber dem porphyrinfreien Wert verzeichnet werden. Das Verhalten der Nitrit-Freisetzung unter Verwendung von Kupfer(II)-sulfat im Vergleich zu dem alleinigen Einsatz des Sauerstoffdonors ist ein weiteres Beispiel die Abhängigkeit des Freisetzungsprofils. FLOX setzte in beiden Fällen etwa gleich viel Nitrit frei. Da die Nitrit-Werte mit steigender Oxim-Konzentration unter Verwendung von Porphyrin sanken und ohne angehoben wurden, war auch die Erhöhung des Ergebnisses unter Einsatz von FeTPPCI mit 10 % bei 5 mmol/L nicht mehr so stark wie bei den anderen Konzentrationen. Bei Einsatz von 0,5 mmol/L konnte die Nitrit-Freisetzung um ca. 40 % gesteigert werden. Bei 1 mmol/L waren es noch 30 %.

Die Reaktionszeiten, die je nach Zusatz und Oxim-Konzentration variieren konnten, sind aus Abbildung 28 nicht entnehmbar.

Tabelle 2 stellt die Zeiten dar, nach denen die Maximal-Werte ermittelt wurden.

	PhIO	PhIO + FeTPPCI	PhIO + FeTFPPCI	PhIO + MnTPPCI	PhIO + MnTPPCI + CuSO <sub>4</sub>	PhIO + CuSO <sub>4</sub>
	[min]	[min]	[min]	[min]	[min]	[min]
<b>0,5 mmol/L</b>	120	120	30	120	120	120
<b>1 mmol/L</b>	120	120	15	9	120	120
<b>5 mmol/L</b>	120	120	5	0,5	0,5	120

**Tabelle 2:** *Abhängigkeit der Reaktionszeit von der eingesetzten Oxim-Konzentration bei Freisetzung von Nitrit aus FLOX in neutralem Milieu. Die Zeitangaben entsprechen der Messung der Maximal-Werte.*

In Abwesenheit des Oxygenierungssystems konnte in allen untersuchten Konzentrationen eine kontinuierliche Erhöhung der Nitrit-Bildung mit steigender Inkubationszeit gemessen werden. Dabei wurde das Maximum nach 2 Stunden erreicht. Bei der Zugabe von FeTPPCI verlief die Reaktion ähnlich, nur wurden hier bereits nach wenigen Minuten relativ hohe Ergebnisse erzielt, welche nur noch sehr wenig anstiegen.

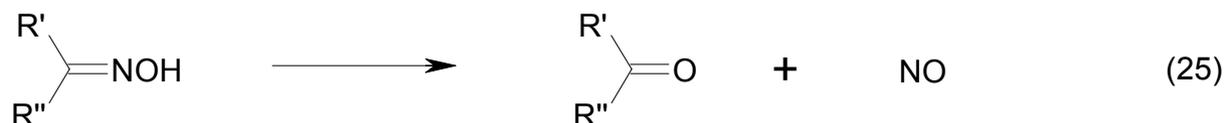
Anders verliefen die Reaktionen unter Verwendung von FeTFPPCI, da hier die Reaktionszeit von der eingesetzten Oxim-Konzentration abhängig war. Bei einer Probenkonzentration von 0,5 mmol/L dauerte die Freisetzung von Nitrit mit 30 min am längsten; danach blieben die freigesetzten Mengen erhalten. Bei einer Oxim-Konzentration von 1 mmol/L war die Reaktion nach 15 min vorbei, und bei 5 mmol/L konnten bereits nach ca. 5 min die höchsten Ausbeuten ermittelt werden. Im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen begannen die Werte bei 5 mmol/L rasch wieder zu sinken.

Ähnliches konnte unter Einsatz von MnTPPCI beobachtet werden: Bei 0,5 mmol/L Oxim-Konzentration stiegen die Werte wieder langsam an bis nach 2 Stunden ein Maximum erreicht werden konnte. Bei 1 mmol/L FLOX verhielt sich die Freisetzung wie unter Verwendung von FeTPPCI, nur dass die Werte hier nach ca. 9 Minuten wieder leicht begannen abzusinken. Bei der Vermessung von 5 mmol/L FLOX jedoch wurden die höchsten Werte sofort nach der Zugabe der Probe in das Reaktionsgefäß ermittelt; danach fielen diese sehr rasch wieder ab. Genauso verhielt es sich auch bei der Reaktion von 5 mmol/L FLOX unter Zusatz von MnTPPCI und CuSO<sub>4</sub>. Die

Verwendung der Konzentrationen 1 mmol/L und 0,5 mmol/L erzielte ein Freisetzungsverhalten wie es schon unter alleinigem Zusatz von Iodosobenzol beobachtet werden konnte. Selbiges gilt für alle eingesetzten Konzentrationen unter Zugabe der Kombination CuSO<sub>4</sub> mit PhIO.

## **2.9 Nachweis der Carbonylverbindung mittels Dünnschichtchromatographie**

Oxime entstehen durch die Reaktion der entsprechenden Carbonylverbindung mit Hydroxylamin (s. 2.1, Gleichung (15)). Wie bei dem physiologischen NO-Donor N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin nimmt man auch für die Oxime an, dass bei der Freisetzung von Stickstoffmonoxid diese Carbonylverbindung regeneriert wird:



Diese Rückbildung nach einer NO-Freisetzung konnte in unserem Arbeitskreis unter Verwendung des biomimetischen Modellsystems aus Hydroxyimino-Verbindungen bereits gezeigt werden <sup>[73]</sup>. Über Oxime wurden in der Vergangenheit zu diesem Thema ebenfalls sehr genaue Untersuchungen durchgeführt. 1999 konnte die Bildung von Fluorenon aus Fluorenonoxim während der NO-Freisetzung unter Porphyrin-Zusatz gezeigt werden <sup>[44]</sup>. Ein Jahr zuvor wurde in einer Studie die milde Regeneration von Carbonyl-Verbindungen aus BPOX, FLOX, DBOX und anderen Oximen unter Verwendung von Mangan-Porphyrinen untersucht <sup>[64]</sup>. Zwei Arbeiten aus den Jahren 1998 und 1999 weisen darauf hin, dass bei der NO-Freisetzung aus CHOX Cyclohexanon als Nebenprodukt gebildet wird <sup>[42, 62]</sup>.

Diese Ergebnisse sollten durch DC-Versuche noch einmal bestätigt werden. Ein weiteres Ziel war es auch, einen Einblick in die Stabilität des Oxims in Anwesenheit des Oxygenierungssystems zu gewinnen. Als Beispiel-Substanz diene FLOX, dessen Rückbildung zu Fluorenon in Anwesenheit von Porphyrinen in der Literatur bereits belegt worden war <sup>[44]</sup>.

### 2.9.1 Durchführung

Die Substanz wurde vor dem Auftragen auf die DC-Platte in folgenden Medien bei 37°C inkubiert:

- Puffer pH 4,5 + PhIO + FeTPPCI
- Puffer pH 7,4 + PhIO + FeTPPCI
- Puffer pH 9,0 + PhIO + FeTPPCI

Es wurden die gleichen Puffer wie für die Chemilumineszenz-Messungen verwendet, um eine etwaige Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenen Mediums zu untersuchen. Zur Kontrolle wurden Lösungen von Fluorenonoxim und dem erwarteten Zerfallsprodukt Fluorenon sowie von dem Sauerstoffdonor und dem Porphyrin eingesetzt. Die Probelösungen wurden vor dem Auftragen auf die DC-Platte sowohl 1, 10, 30, 60 und 180 Minuten, als auch drei Tage inkubiert.

### 2.9.2 Ergebnisse

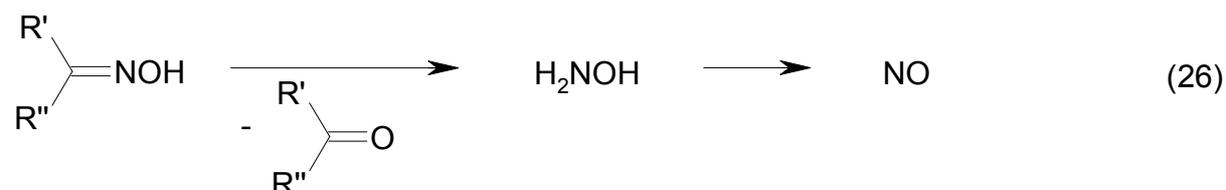
Die korrespondierende Carbonyl-Verbindung Fluorenon konnte nachgewiesen werden. Es war dabei abhängig von dem pH-Wert des verwendeten Puffers wie lang die Inkubationszeit sein musste, bis das Zerfallsprodukt auf der DC-Platte erschien. Diese Zeitspanne verkürzte sich mit zunehmender Basizität des Milieus. Dabei dauerte es im Sauren mit 10 Minuten am längsten bis das Keton auf der Platte nachweisbar war.

Während im sauren und neutralen Milieu nach wenigen Minuten das Oxim noch nachweisbar ist, kann es bei pH 9,0 bereits nach 10 Minuten nicht mehr detektiert werden. Im physiologischen Milieu ist dieses erst nach 30 Minuten der Fall. Im Sauren jedoch findet man auch nach mehrtägiger Inkubation immer noch kleine FLOX-Mengen.

Bei pH 7,4 und 9,0 werden nach wenigen Minuten nicht identifizierbare Substanz-Flecken sichtbar, die spätestens nach 30 Minuten nicht mehr zu beobachten waren.

## 2.10 Nachweis von Hydroxylamin

Die intermediäre Bildung des NO-Donors Hydroxylamin ( $\text{H}_2\text{NOH}$ )<sup>[81]</sup> wird oft als Mechanismus der Stickstoffmonoxid-Freisetzung aus Hydroxyimino-Verbindungen vorgeschlagen. Letzteres entsteht bei der Hydrolyse der  $\text{C}=\text{NOH}$ -Gruppierung. Dabei wird die entsprechende Oxo-Verbindung erhalten:

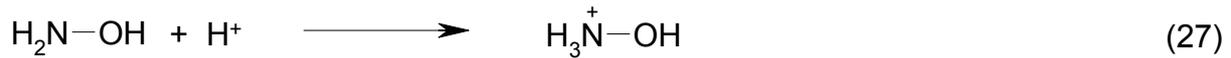


Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Entstehung der Substanz unter den Bedingungen der NO-Messung nachgewiesen werden.

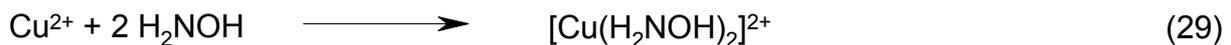
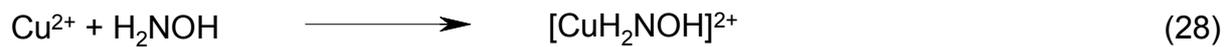
### 2.10.1 Eigenschaften von Hydroxylamin

Hydroxylamin bildet geruchsfreie, farblose, hygroskopische Kristalle. Die Substanz ist thermisch instabil (Explosionsgefahr) und wird darum meist in Form ihrer Salze, insbesondere als Sulfat oder Hydrochlorid verwendet. In stark alkalischer Lösung disproportioniert Hydroxylamin langsam zu Ammoniak, Stickstoff und Distickstoffoxid. Bei der Bildung des letzteren entsteht wahrscheinlich intermediär  $\text{NO}^-$ <sup>[10]</sup>.

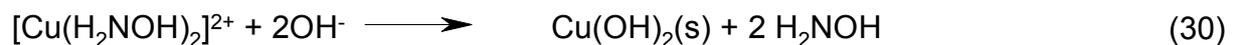
In Lösung im pH-Bereich sechs bis neun ist die Substanz in Abwesenheit von Sauerstoff und Metallionen relativ stabil. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff kommt es jedoch zur Autoxidation. Diese verläuft umso schneller und einfacher je höher der pH-Wert der Lösung ist. Sie wird durch Metallionen katalysiert, insbesondere durch Kupfer(II)-Ionen<sup>[9]</sup>. Das führt soweit, dass es im Alkalischen sogar unter anaeroben Bedingungen zu dieser Reaktion kommt wenn Kupfer(II)-Ionen anwesend sind. Aerobe Lösungen unterhalb pH 4 sind jedoch auch in Gegenwart von Kupfer relativ stabil, da Hydroxylamin aufgrund seiner leichten Basizität gemäß Gleichung (27) dissoziiert. Die durch Kupfer katalysierte Reaktion gelingt jedoch nur aus der unprotonierten Form<sup>[82]</sup>.



Des Weiteren gibt es Hinweise auf intermediär gebildete Kupfer(II)-Hydroxylamin-Komplexe, die sich ab pH 4 ausbilden und unter Umständen an der kupferkatalysierten Autoxidation von Hydroxylamin beteiligt sind <sup>[80, 83, 84]</sup>.



Unterhalb von pH 4 sind diese Reaktionen durch die Protonierung des Hydroxylamin-Stickstoffs gemäß Gleichung (27) behindert. Oberhalb von pH 8 ist die Hydroxylionenkonzentration ausreichend hoch, dass Kupferhydroxid ausfällt. Durch die Bildung dieses Niederschlages können die Kupfer-Hydroxylamin-Komplexe wieder zerstört werden:

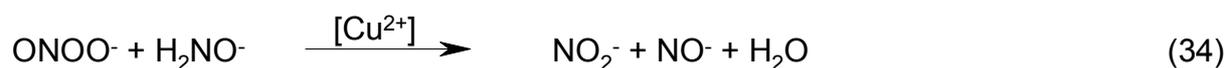
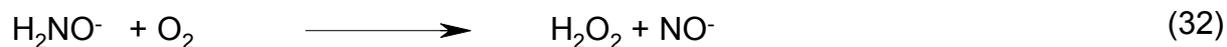


Die Endprodukte der Autoxidation von Hydroxylamin sind Nitrit, Distickstoffoxid, elementarer Stickstoff und wenig Nitrat. Welches der Zerfallsprodukte davon überwiegt, ist von dem umgebenden Milieu abhängig. Dabei spielen vor allem der pH-Wert und die Anwesenheit von Sauerstoff und Kupfer(II)-Ionen eine Rolle. Die gebildete Nitrit-Menge steigt z.B. mit dem pH-Wert und sinkender  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration. Dafür erhöht sich die Ausbildung von Distickstoffoxid mit steigender Kupfer(II)-Menge <sup>[80, 82]</sup>.

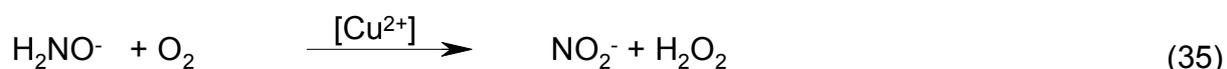
Der genaue Reaktionsmechanismus, der dem zugrunde liegt, ist unklar. Es werden jedoch zwei Wege hierfür vorgeschlagen:

1. ionischer Mechanismus der Hydroxylamin-Autoxidation
2. radikalischer Mechanismus der Hydroxylamin-Autoxidation

Der Verlauf des ionischen Mechanismus wird wie folgt postuliert <sup>[9]</sup>:

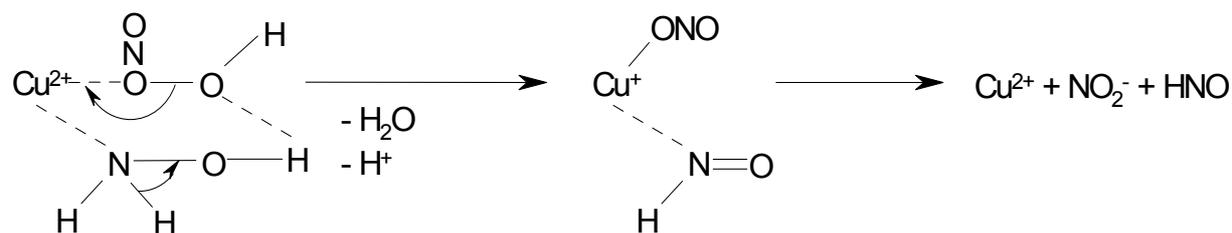


Die daraus resultierende Gesamtreaktion lässt sich demnach wie folgt formulieren:



Die zwischenzeitliche Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) hat hierbei wahrscheinlich einen katalytischen Einfluss.  $\text{ONOO}^-$  kann auch unter Bildung von Nitrat, oder stöchiometrischen Mengen von Nitrit und Sauerstoff zerfallen. Dabei findet ersteres bei pH-Werten von unter 7 statt, letzteres bei höheren pH-Werten ( $< \text{pH } 8$ ) <sup>[85]</sup>.

Die Reaktion aus Gleichung (34) verläuft ohne weitere Zusätze langsam, in Gegenwart katalytisch wirkender Kupfer(II)-Ionen jedoch sehr schnell. Dabei wird angenommen, dass  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und danach in Anwesenheit von Sauerstoff zu  $\text{Cu}^{2+}$  zurückgebildet wird <sup>[82]</sup>. Für diese Reaktion wurde bei pH 4,5 folgender Verlauf postuliert <sup>[80]</sup>:



**Abbildung 31:** Kupfer-katalysierte Reaktion zwischen Hydroxylamin und Peroxynitrit

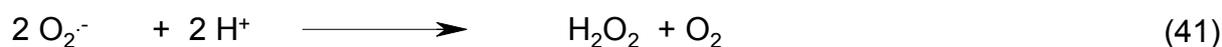
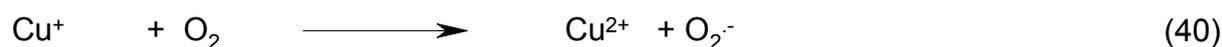
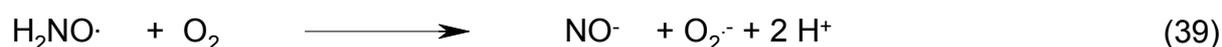
Anstelle der Weiterreaktion zu Peroxynitrit können Nitroxyl-Anionen auch zu Distickstoffoxid unter Wasserabspaltung reagieren:



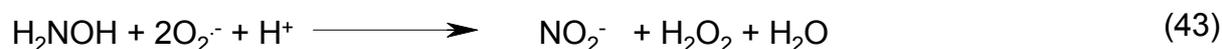
Diese Reaktion findet vornehmlich im sauren Milieu statt. Kleine Mengen an Sauerstoff können diese Reaktion katalysieren, dennoch sind anaerobe Bedingungen hierfür besser. Die Dimerisierung steht aber auch noch in Konkurrenz zur Reduktion von Nitroxyl-Anionen zu Stickstoff:



Die Reaktion in Gleichung (37) ist in Anwesenheit von Sauerstoff behindert, denn hier müssen sich zwei gleichwertig geladene Ionen annähern. Es kommt dagegen leichter zu einer Reaktion gemäß Gleichung (36) oder zu der Verbindung mit einem neutralen Molekül [s. Gleichung (33)]. Aus diesem Grund ist die Gleichung (33) unter aeroben und Gleichung (37) vorwiegend unter anaeroben Bedingungen bevorzugt. Die Reaktion (36) verläuft am ehesten unter Sauerstoffabwesenheit oder in Gegenwart geringer Sauerstoffkonzentration. Die Reaktion der Gleichung (37) läuft leichter bei höheren pH-Werten ab, die der Gleichung (36) leichter bei niedrigeren. Für den Verlauf des radikalischen Mechanismus wird folgender Reaktionsweg vorgeschlagen <sup>[86]</sup>:

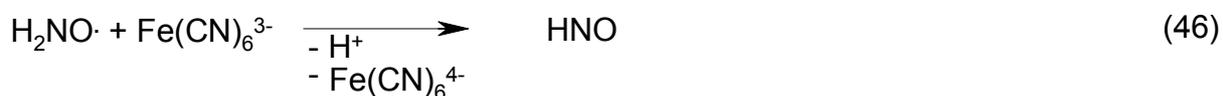
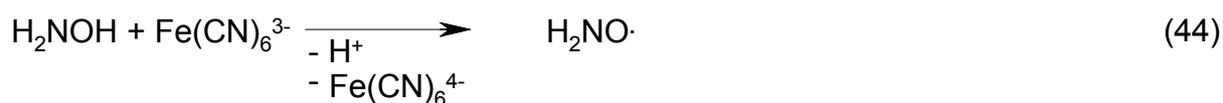


Peroxynitrit wird gemäß Gleichung (33) durch die Reaktion von Nitroxylanionen mit Sauerstoff gebildet. Nitrit kann hier zum einen aus dem intermediär gebildeten Peroxynitrit entstehen oder im neutralen durch die Reaktion eines Superoxidradikals mit Hydroxylamin <sup>[87, 88]</sup>:



Sowohl der ionische als auch der radikalische Mechanismus bevorzugt ein leicht alkalisches, oxidatives Milieu und die Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen.

Andere Übergangsmetall-Ionen katalysieren zwar ebenfalls den oxidativen Zerfall von Hydroxylamin, allerdings sind diese nicht ganz so potent. Es wurde dabei die Reihenfolge  $\text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{3+}$  ermittelt <sup>[9]</sup>. Bei Verwendung von Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) stellte sich heraus, dass das Zentralatom nicht wie Kupfer durch Sauerstoff zurückgebildet werden kann. Des Weiteren führt der Einsatz von rotem Blutlaugensalz zu vermehrter Stickstoffbildung, während es in Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen unter gleichen Bedingungen vermehrt zur Bildung von Distickstoffoxid kommt <sup>[82, 89]</sup>. Auch in Gegenwart von Kaliumhexacyanoferrat(III) sind Hydroxylamin-Lösungen im Sauren etwas stabiler. Im Gegensatz zu Kupfer(II)-Ionen geht dem vorgeschlagenen Autoxidationsmechanismus von Hydroxylamin in Gegenwart von  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  keine Deprotonierung voraus:



Da bei diesen Reaktionen Protonen frei werden, laufen sie bei höheren pH-Werten besser ab als bei niedrigeren.

Das nach Deprotonierung gebildete Nitroxyl-Anion kann zu NO oxidiert werden, z.B. durch den Sauerstoffdonor Iodosobenzol oder durch  $\text{Cu}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$ .



Hydroxylamin reagiert in Gegenwart von NO zu Stickstoff und Distickstoffoxid <sup>[90]</sup>:



Hydroxylamin kann sowohl als Oxidationsmittel als auch als Reduktionsmittel reagieren <sup>[47]</sup>, wird jedoch gewöhnlich als letzteres eingesetzt, wie z.B. bei der Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen für die Trocknung von Acrylfasern. Wie bereits erwähnt bildet es Oxime nach der Reaktion mit den entsprechenden Aldehyden und Ketonen, wobei hierfür meist das Hydroxylammoniumsulfat verwendet wird.

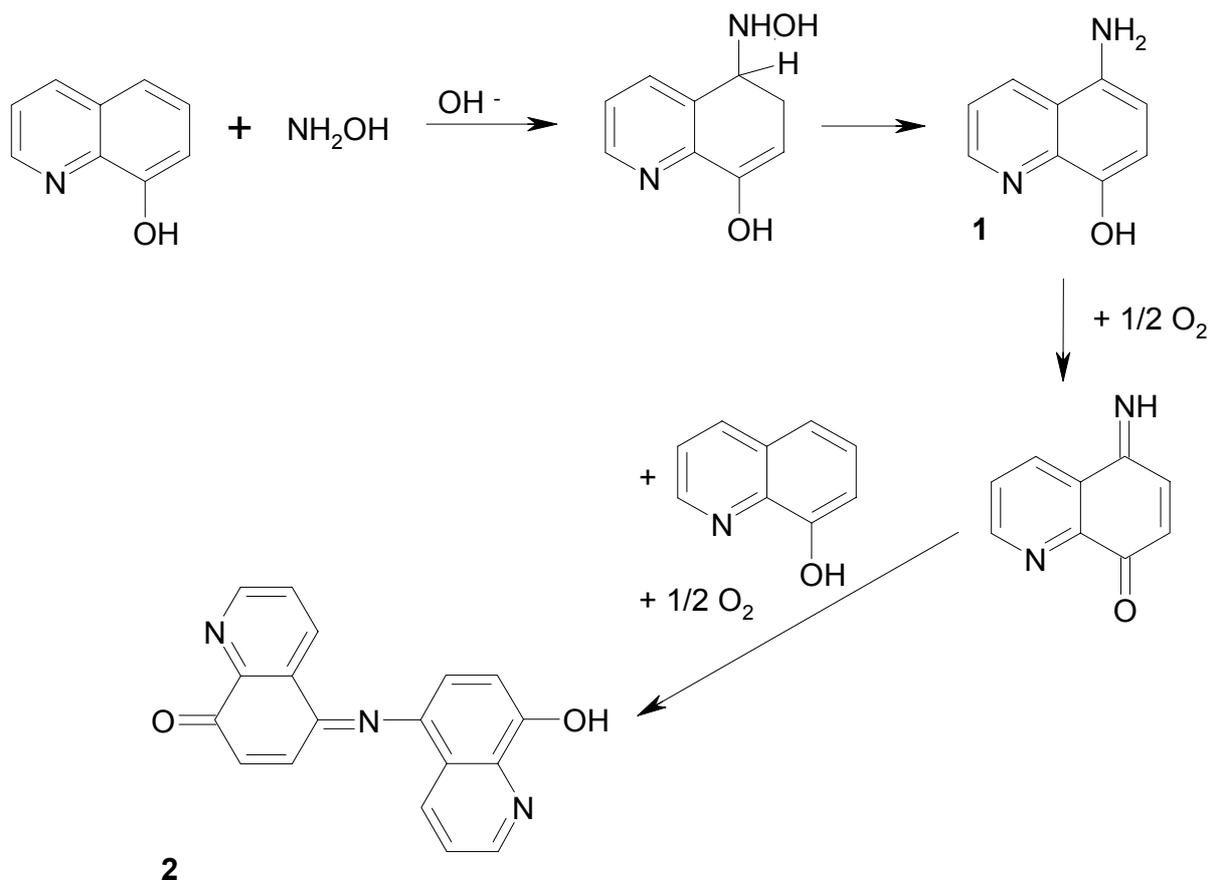
Hydroxylamin wird als Intermediat im Zellstoffwechsel gebildet. Es stammt vermutlich aus dem Zerfall des Adduktes von HNO-RSH und kann durch Gluthation entgiftet werden (s. 2.2.2) <sup>[8]</sup>. Wenn letzteres jedoch vermindert ist, kommt es zur Intoxitation. Außerdem wird eine metabolische Oxidation zu Nitrit und Nitrat vermutet. Hydroxylamin und seine Abbauprodukte reagieren leicht mit vielen körpereigenen Stoffen, wie z.B. Proteinen und Nukleinsäuren. Seine Toxizität wirkt sich hauptsächlich durch die Oxidierung von Hämoglobin zu Methämoglobin aus. Daraus folgt die Ausbildung einer hämolytischen Anämie und Methämoglobinämie mit deren Folgen (s. 2.2.2). Bei einem Methämoglobingehalt des Blutes von 60-70 % kommt es zu Kollaps und Tod <sup>[79]</sup>.

Hydroxylamin ist mutagen und wirkt virusinaktivierend, wobei es vorwiegend am Cytosin angreift. Darum steht es im Verdacht eine krebserzeugende Wirkung zu haben, was bis jetzt nur *in vitro* jedoch nicht *in vivo* gezeigt werden konnte <sup>[10]</sup>.

Hydroxylamin ist als Vasodilatator und NO-Donor bekannt <sup>[81]</sup>. Jedoch scheinen die hämhaltige Katalase und Wasserstoffperoxid für die NO-Freisetzung *in vitro* notwendig zu sein. Interessanterweise verschwindet die Fähigkeit NO freizusetzen und auch der vasorelaxierende Effekt von Hydroxylamin, wenn der Sauerstoff alkyliert vorliegt <sup>[10, 48]</sup>.

### 2.10.2 Versuchsprinzip und Durchführung

Hydroxylamin bindet in alkalischer Lösung an 8-Hydroxychinolin unter Bildung eines 5-Amino-8-hydroxy-chinolins (Indooxin) (1). Dieses bildet in Gegenwart von Luftsauerstoff und eines Überschusses an 8-Hydroxychinolin ein grünes Chinonimin (2), welches bei 700 nm kolorimetrisch erfasst werden kann <sup>[91]</sup>. Abbildung 32 beschreibt den Reaktionsmechanismus:



**Abbildung 32:** Kolorimetrischer Nachweis von Hydroxylamin.

Dieser Assay sollte möglichst unter den gleichen Voraussetzungen durchgeführt werden wie die NO-Messungen. Allerdings beinhaltet dieses gewisse Schwierigkeiten in der praktischen Durchführung, da für die oben beschriebene Farbreaktion Luftsauerstoff benötigt wird. Für die NO-Messung sind jedoch anaerobe Bedingungen erwünscht. Des Weiteren erwies sich das Lösungsverhalten der Oxime als problematisch: Für diese Bestimmung werden relativ große Konzentrationen an Probensubstanz gebraucht, während Oxime als organische Moleküle in einer wässrigen Lösung eine relativ schlechte Löslichkeit aufweisen. Das Gleiche gilt für die Verwendung von Iodosobenzol. Aus diesem Grunde musste ein Kompromiss gewählt werden zwischen genügend hoher Probenkonzentration und ausreichender Lösung der Proben im Versuchsansatz. Teilweise wurde letzteres durch vorsichtiges Anwärmen der zu messenden Lösung kurz vor der spektroskopischen Untersuchung erreicht.

Aus vorangegangenen Messungen war bereits bekannt, das Iodosobenzol nur in äquimolarer Probenkonzentration verwendet werden darf und nicht im Überschuss, wie bei der NO-Messung geschehen. Es würde sonst aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit von Hydroxylamin und einer Weiteroxidation des Chinonimins zum Ausbleiben der Farbreaktion kommen <sup>[73]</sup>. Um den Gegebenheiten der NO-Messung dennoch relativ nahe zu kommen wurden alle Oxime in denselben pH-Milieus vermessen, wobei der Schwerpunkt der Untersuchungen im Neutralen lag. Um die Oxidationsempfindlichkeiten in die Messungen einzubeziehen und um die Maximal-Werte zu ermitteln, wurde jeder Proben-Ansatz bis zu drei Tagen inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte die Zugabe des Farbreagens (8-Hydroxychinolin und Natriumcarbonat). Danach wurde der Ansatz entweder sofort vermessen, oder es erfolgte eine erneute Inkubation von ½, 2 und 4 Stunden, sowie 24, 48 und 72 Stunden.

Die Zugabe der Farbreagenzien noch am selben Tag der Proben-Herstellung sollte verhindern, dass bereits gebildetes Hydroxylamin nicht erfasst wird. Der Analyt weist in wässriger, aerober Lösung eine hohe Instabilität auf. Das gleiche sollte durch das Begasen der Probelösungen erreicht werden.

Die Zugabe der Farbreagenzien einen Tag später sollte der Reaktion die nötige Zeit gewähren, damit auch das gesamte gebildete Hydroxylamin erfasst wird.

Die Farbreaktion ist sehr träge und ihre Kinetik korreliert unter anderem mit der vorhandenen Hydroxylamin-Menge <sup>[91]</sup>. Aus diesem Grunde sind Aussagen über die Hydroxylamin-Freisetzungskinetik nur bedingt möglich.

Die Kalibrierung erfolgte mit einer Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung in fünf verschiedenen Konzentrationen. Das Hydrochlorid zeichnet sich gegenüber der freien Base durch eine erhöhte Lagerstabilität und bessere Wasserlöslichkeit aus. Es zeigt jedoch eine dem Hydroxylamin vergleichbare Reaktionskinetik <sup>[90]</sup>.

Bei dem Nachweis von Hydroxylamin handelt es sich um eine Konventionsmethode, bei welcher die Versuchsbedingungen exakt eingehalten werden müssen, damit vergleichende Aussagen getroffen werden können. Hierfür gibt es folgende Gründe:

- Die leichte Oxidierbarkeit des Analyten und des grünen Farbproduktes hat Einfluss auf das Ergebnis, und

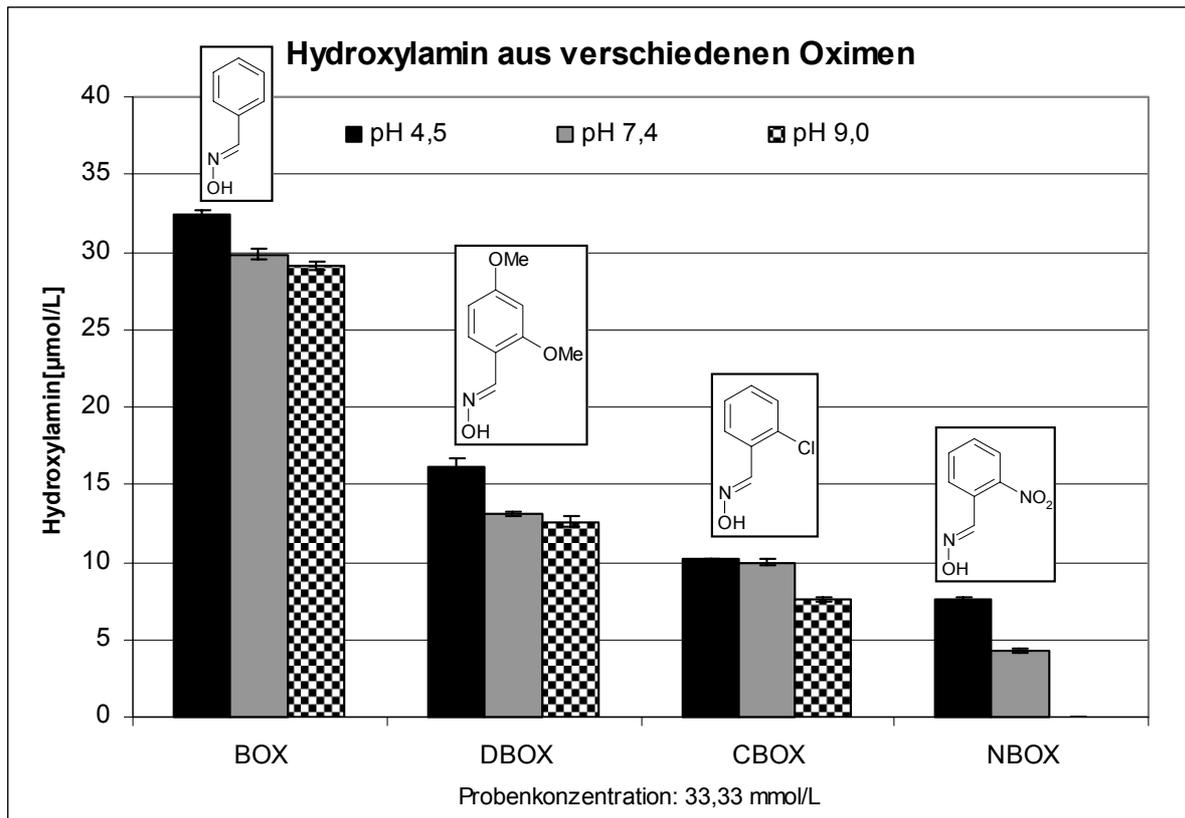
- die Zersetzung der Oxime ist in einem geschlossenen System auch von deren eingesetzter Konzentration abhängig. Daher korrelieren die Ergebnisse nicht immer mit der Oxim-Konzentration, wie es bei der Nitrit-Bestimmung aus FLOX deutlich wurde.

### 2.10.3 UV-Vis-Spektroskopie: Oxime

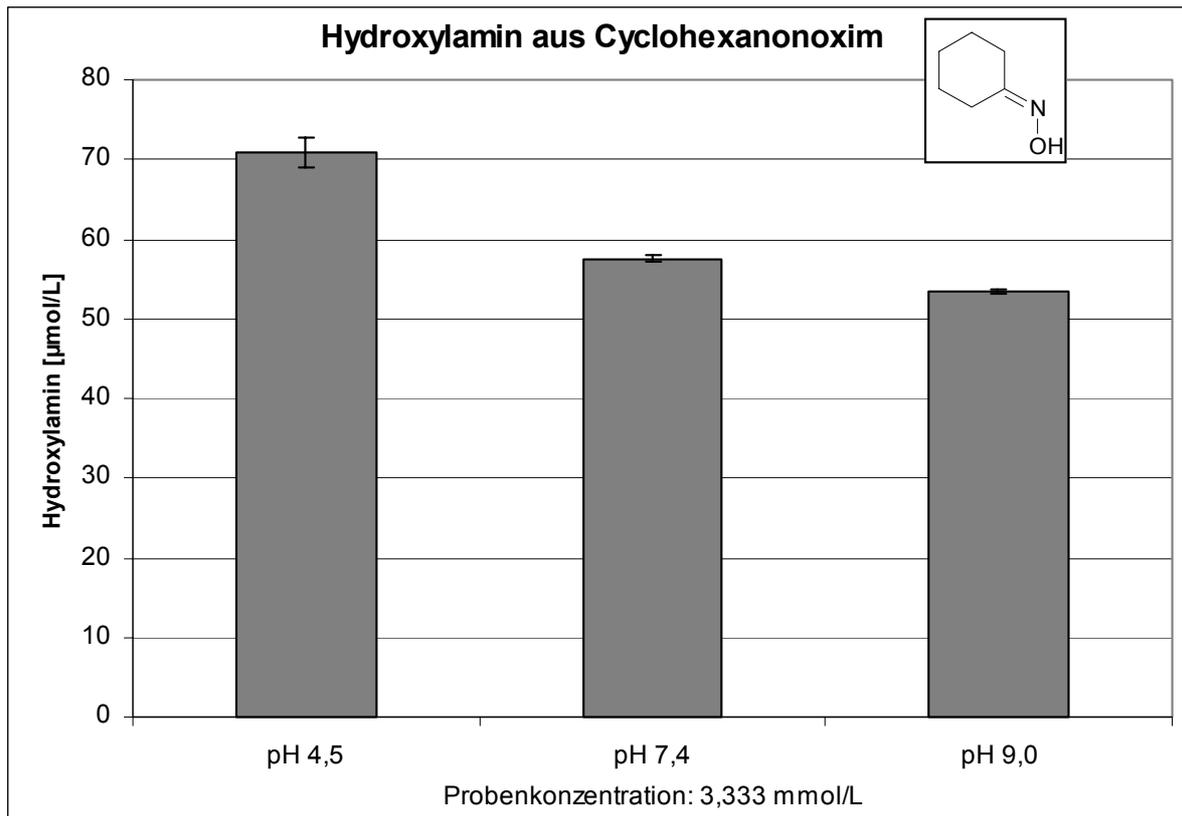
Für die folgenden UV/Vis-Bestimmungen wurde als Fehlerindikator die Standardabweichung verwendet. Die Stichprobenanzahl  $n$  ist 5 ( $MW \pm SD$ ). Die Angaben sind in  $\mu\text{mol/L}$ .

CHOX war das einzige Oxim, aus welchem bereits nach 30-minütiger Inkubation und 30 Minuten nach Farbreagenzienzunahme eine wenn auch schwache Hydroxylamin-Bildung nachweisbar war. Alle anderen Oxime benötigten für beide Phasen mindestens 24 Stunden, oft auch länger.

Für die Betrachtung der Oxime bei unterschiedlichen pH-Werten wurde jedes Oxim in derselben Konzentration vermessen, da bei einem geschlossenen System die gebildete Produktmenge von der eingesetzten Edukt-Menge abhängen kann. Es war nicht möglich CHOX in der Konzentration der anderen Oxime zu vermessen, weil das Ketoxim sehr viel mehr Hydroxylamin bildet als die anderen hier untersuchten Vertreter. Es wurden dabei Absorptionen ermittelt, die in einem Bereich lagen, in dem das Lambert-Beersche Gesetz nicht mehr aussagekräftig ist. Darum wurde CHOX bei einer geringeren Konzentration vermessen. Es wurde jedoch aufgrund der eventuell fehlenden Relation (s. oben) in eine separate Graphik eingetragen.



**Abbildung 33:** *Hydroxylamin-Nachweis aus verschiedenen Oximen bei unterschiedlichen pH-Werten.*



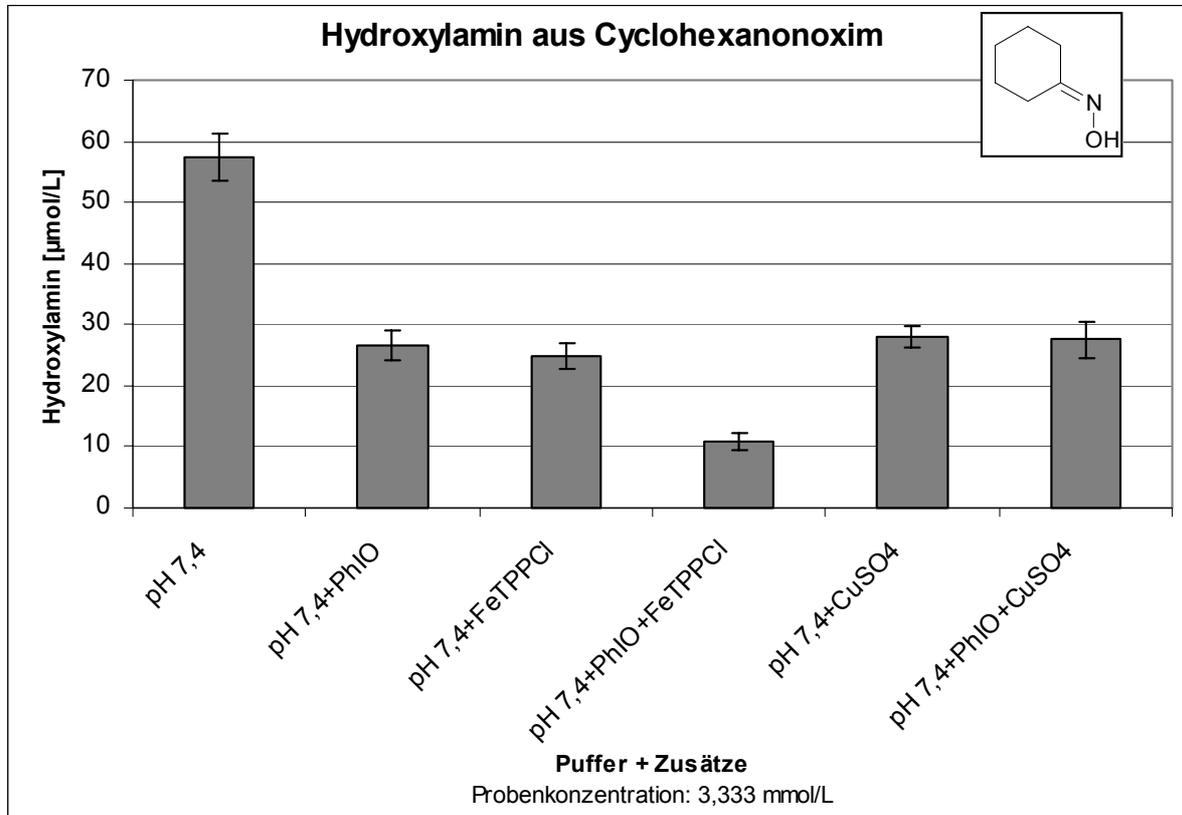
**Abbildung 34:** *Hydroxylamin-Nachweis aus Cyclohexanonoxim bei verschiedenen pH-Werten.*

CHOX bildete mit 70  $\mu\text{mol/L}$  im sauren Milieu bei geringerer eingesetzter Probenkonzentration absolut gesehen mehr Hydroxylamin als die anderen Oxime. Den zweithöchsten Wert lieferte mit 32  $\mu\text{mol/L}$  bei pH 7,4 BOX. Aus DBOX ließ sich die Hälfte nachweisen. CBOX bildete mit 10  $\mu\text{mol/L}$  noch weniger Hydroxylamin. NBOX lieferte die niedrigsten Werte, wobei die Ausbeute im Sauerem etwas höher lag als im Neutralen. Im Alkalischen war keine Hydroxylamin-Bildung mehr messbar. CHOX, BOX, DBOX und NBOX bildeten bei pH 4,5 am meisten Hydroxylamin. CBOX bildete bezüglich des Produktes im Sauerem und im Neutralen etwa gleich hohe Mengen, nur im Basischen ist der Wert niedriger. Ebenfalls gleich hohe Werte lieferte BOX und DBOX sowohl im neutralen als auch im basischen Milieu.

Bei den verbliebenen Oximen BPOX und FLOX war in keinem der oben verwendeten Medien Hydroxylamin kolorimetrisch erfassbar. Lediglich bei den Vorversuchen in verdünnter Salzsäure konnten kleine Mengen gemessen werden, allerdings erst nach 24- bzw. 96-stündiger Inkubationszeit (Werte nicht gezeigt).

Nach der Betrachtung der Hydroxylamin-Bildung unter Variation des pH-Wertes sollte die Auswirkung unterschiedlicher Zusätze, wie sie bei den Chemilumineszenz-

Messungen verwendet wurden, untersucht werden. Dieses wurde am Beispiel von Cyclohexanonoxim bei pH 7,4 durchgeführt:

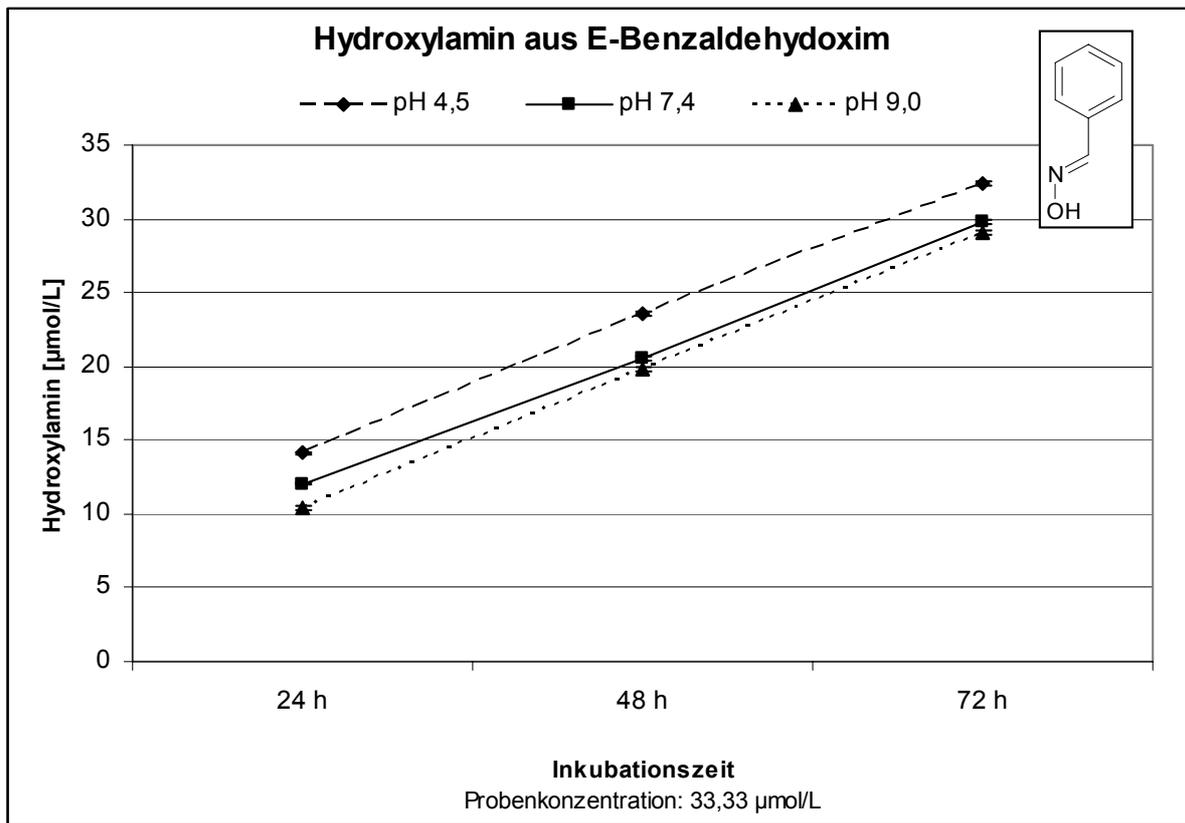


**Abbildung 35:** Hydroxylamin-Nachweis aus Cyclohexanonoxim unter Verwendung verschiedener Zusätze. Die Auswahl dieser Zusätze orientierte sich an denen der Chemilumineszenz-Messungen.

Die alleinige Verwendung des Puffers bewirkte eine deutlich verstärkte Hydroxylamin-Bildung im Gegensatz zu den Messungen, in denen noch weitere Zusätze zugefügt wurden. Diese Zusätze erzielten keine nennenswerten Unterschiede in den Ergebnissen. Lediglich die Verwendung des Oxygenierungssystems bewirkte eine zusätzliche Minderung der Hydroxylamin-Ausbeute.

Der Einfluss des Sauerstoffdonors wurde bei anderen pH-Werten und bei den anderen Oximen getestet. Jedoch war außer bei CHOX unter diesen Bedingungen kein Hydroxylamin nachweisbar.

Als nächstes sollte die Empfindlichkeit des gebildeten Chinonimins gegenüber Luftsauerstoff untersucht werden. Dies geschah am Beispiel von BOX bei unterschiedlichen pH-Werten. Dabei wurde der Puffer-Ansatz die gleiche Zeit stehengelassen und dann das Farbreagens zugefügt. Nach der Reagenzienzugabe wurde die Probe nach 24, 48 und nach 72 Stunden vermessen.



**Abbildung 36:** *Hydroxylamin-Nachweis aus Benzaldehydoxim. Untersuchung der Substanz bei verschiedenen pH-Werten und Inkubationszeiten nach der Zugabe des Farbreagens.*

Die Werte stiegen mit der Inkubationszeit, und zwar unabhängig von dem verwendeten Medium. Im sauren Milieu findet man zu allen Zeiten die höchsten Werte, die zweithöchsten bei pH 7,4 und die niedrigsten bei pH 9,0.

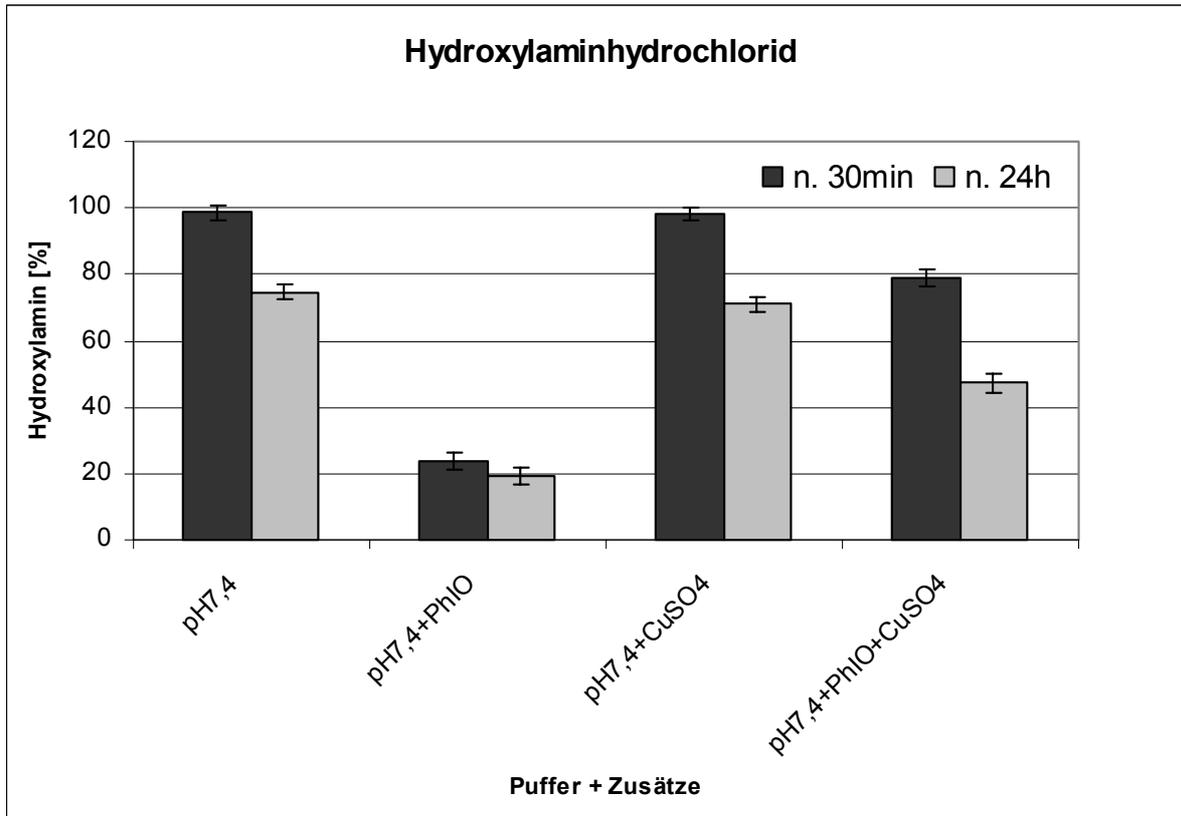
#### **2.10.4 UV/Vis-Spektroskopie: Hydroxylaminhydrochlorid**

Die Vermessung des Hydroxylamins unter den Bedingungen der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen der Oxime sollte aufklären, wie sich der Analyt in dieser Umgebung verhält. Der Einfluss der oxidativ wirksamen Zusätze Iodosobenzol und Kupfer(II)-sulfat auf Hydroxylamin sollte dabei genauer untersucht werden. Diese könnten gebildetes Nitroxyl-Anion zu NO weiteroxidieren und somit das Substrat dem System entziehen. Dieses würde ebenso wie die Weiteroxidation des Farbproduktes zu einer Absenkung der Ausbeuten führen.

##### **2.10.4.1 Durchführung**

Die Zugabe der Farbreagenzien zu der Hydroxylamin-Lösung erfolgte zunächst wie bei den Oximen nach einer Inkubation im Puffer für 24 h. Allerdings bewirkte die Instabilität des Analyten falsch niedrige Werte: Nach 24-stündiger Inkubation war nur noch in der zusatzfreien Lösung eine geringe Hydroxylamin-Menge nachweisbar. Deshalb wurde der Versuch wiederholt, wobei die Farbreagenzien, wie auch bei der Kalibrierung, sofort nach der Herstellung der Analysenlösung zugegeben wurden. Die Oxime lieferten nach dieser Behandlung allesamt negative Werte. Die Messungen erfolgten zum einen 30 Minuten nach Zugabe der Farbreagenzien, in denen ein Maximum der Grünfärbung zu erwarten war, und 24 Stunden nach Reagenzienzugabe, um zu untersuchen wie lange das Chinonimin beständig ist.

### 2.10.4.2 Ergebnisse



**Abbildung 37:** Untersuchung von Hydroxylamin mittels UV/Vis-Spektroskopie. Die Angaben sind in %. Die schwarzen Balken stellen die Ergebnisse dar, die nach 30 Minuten Inkubation erhalten wurden. Die nach 24 Stunden gemessenen Ergebnisse sind als graue Balken abgebildet.

Alle Ergebnisse waren höher, wenn die Untersuchungslösungen 30 Minuten anstatt 24 h nach Farbreagenzienzugabe vermessen wurden. Dabei sanken die Ergebnisse überall ungefähr um denselben Wert, außer bei der alleinigen Verwendung von Iodosobenzol. Hier war zwischen dem ersten und dem zweiten Wert nur ein geringer Unterschied zu verzeichnen.

Bei Vermessung der reinen Pufferlösung, aber auch unter Verwendung von Kupfersulfat wurden 100 % Hydroxylaminhydrochlorid erreicht.

In Anwesenheit von Iodosobenzol sanken die Werte jedoch, und zwar unter alleiniger Verwendung des Sauerstoffdonors auf 23 %. Damit war diese Minderung stärker als unter zusätzlicher Gabe von Kupfer(II)-Ionen. Dort wurden wo immerhin noch 79 % des Analyten gemessen.

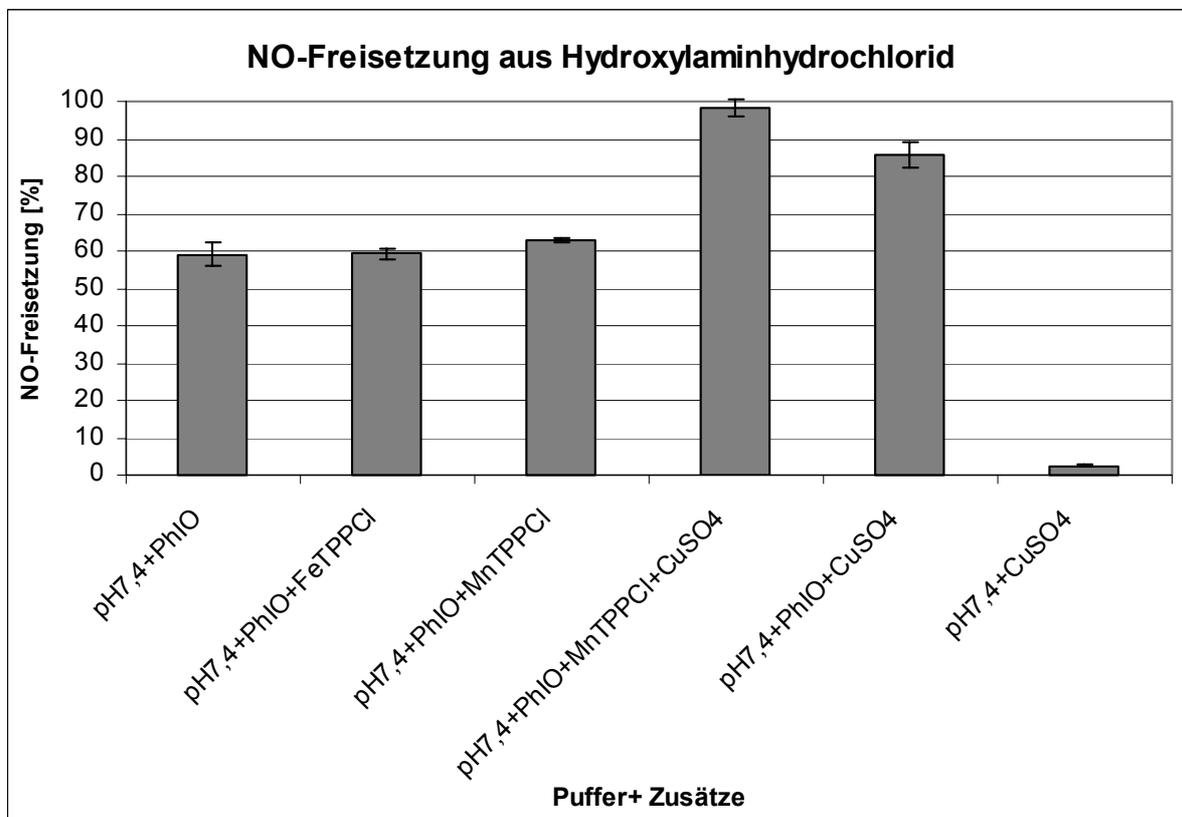
## 2.11 Untersuchung von Hydroxylamin mittels der Chemilumineszenz-Methode

Für die Chemilumineszenz-Messungen wurde erneut aus praktischen Gründen mit Hydroxylaminhydrochlorid gearbeitet. Die Bestimmungen erfolgten bei pH 7,4.

Die Auswahl der Zusätze richtete sich dabei nach den Vermessungen der Oxime.

Die Angaben sind in %. Die Stichprobenanzahl  $n$  ist 5. Die Standardabweichung wurde zur Darstellung des Fehlerindikators verwendet ( $MW \pm SD$ ).

### 2.11.1 NO-Messung aus Hydroxylaminhydrochlorid



**Abbildung 38:** Freisetzung von NO aus Hydroxylaminhydrochlorid.

Hydroxylaminhydrochlorid setzte sowohl mit FeTPPCI als auch nach alleinigem Zusatz des Sauerstoffdonors 59 % NO frei. Der Austausch des Porphyrins gegen MnTPPCI bewirkte eine leichte Erhöhung der NO-Ausbeute. Noch stärker wird dieser Effekt unter Verwendung der Kombination MnTPPCI + CuSO<sub>4</sub>: Unter diesen Bedingungen erzielte Hydroxylaminhydrochlorid mit 98 % den höchsten Wert dieser Serie. Wenn nur Kupfer(II)-Ionen und Iodosobenzol verwendet wurden, sank die NO-

Bildung wieder leicht ab auf 85 %. Nach alleiniger Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  konnte ebenfalls eine geringe Menge NO detektiert werden.

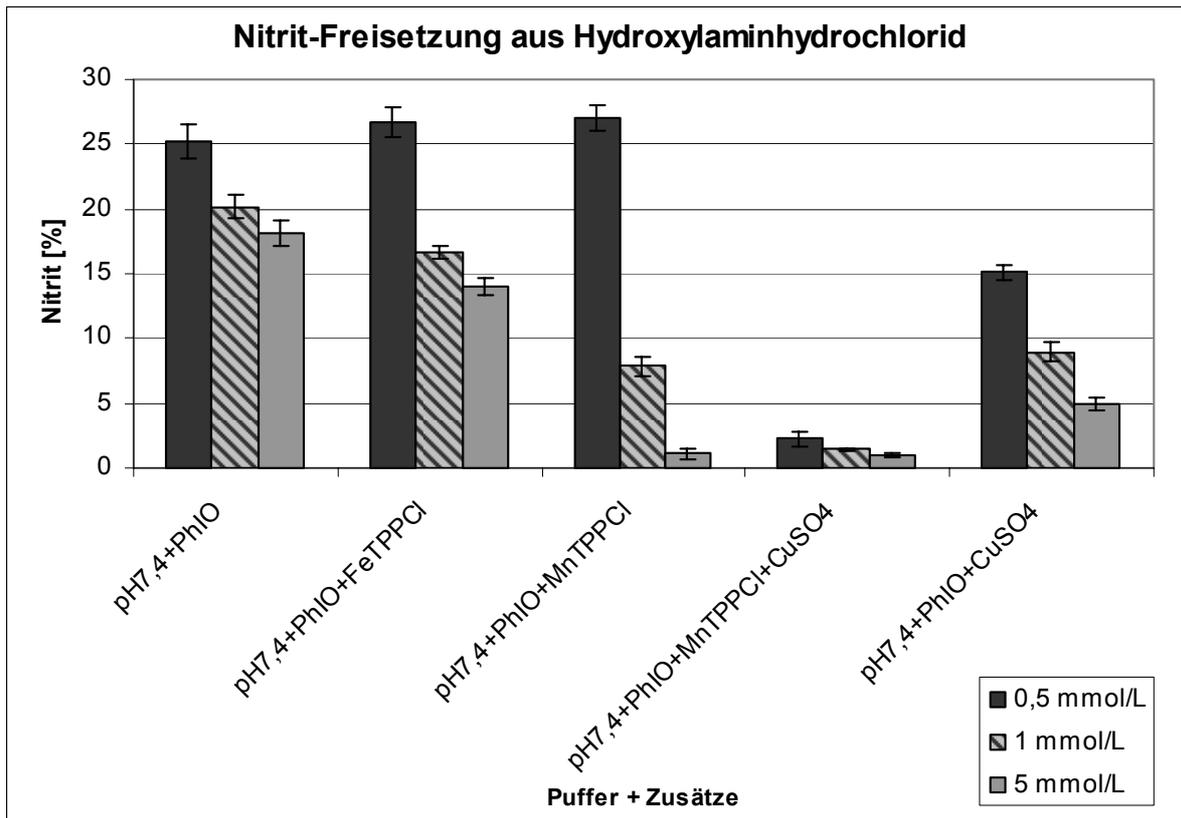
Alle Freisetzungsreaktionen waren bereits nach wenigen Minuten beendet. Aus diesem Grund musste ein Abbruch der Freisetzung nach 5 Minuten, wie es bei den Oximen vorgenommen wurde, um einen Hinweis auf die Kinetik zu erhalten, an dieser Stelle nicht durchgeführt werden.

### **2.11.2 Nitrit-Messung aus Hydroxylaminhydrochlorid**

Die Nitrit-Freisetzung aus Hydroxylaminhydrochlorid wurde ebenfalls untersucht. Die Zusätze entsprachen denen der NO-Messung. Aufgrund der konzentrationsabhängigen Unterschiede bei der Nitrit-Messung aus FLOX, erfolgte die Untersuchung der Substanz bei den gleichen Konzentrationen:

- 0,5 mmol/l
- 1 mmol/L
- 5 mmol/L

Die Angaben sind in %. Die Stichprobenanzahl  $n$  ist 5. Der Fehlerindikator ist durch die Standardabweichung dargestellt ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ).



**Abbildung 39:** Freisetzung von Nitrit aus Hydroxylaminhydrochlorid; verwendete Konzentrationen: 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 5 mmol/L .

Die Abhängigkeit der Nitrit-Freisetzung von der eingesetzten Konzentration der zu untersuchenden Substanz ist relativ auffällig. Dabei sanken die Ergebnisse mit steigender Hydroxylaminkonzentration.

Das Freisetzungsprofil war ebenfalls davon abhängig. Die Verhältnisse der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zusätzen waren innerhalb der drei Konzentrationsgruppen z. T. recht unterschiedlich. Der Vergleich der Kombinationen MnTPPCI + PhIO und CuSO<sub>4</sub> + PhIO zeigt, dass in der 0,5 mmol/L-Gruppe der Wert nach Zusatz des Oxygenierungssystems höher ausfiel als der unter Verwendung von Kupfer. In der nächst höheren Konzentrationsgruppe waren beide Ergebnisse etwa gleich hoch. Bei der Verwendung von 5 mmol/L erzielte die Kombination mit CuSO<sub>4</sub> eine höhere Ausbeute als das porphyrinhaltige System.

Die Zugabe des Oxygenierungssystems bewirkte bei der Konzentration 0,5 mmol/L im Vergleich zu der alleinigen Verwendung des Sauerstoffdonors keine Erhöhung der Nitrit-Ausbeute, jedoch waren dies die höchsten gemessenen Werte. Bei dem Einsatz der anderen beiden Konzentrationen kam es durch Zusatz des Oxygenierungssystems zu einer Minderung der Ergebnisse.

Die höchsten Ausbeuten konnten bei 1 mmol/L mit 20 % und 5 mmol/L mit 18 % unter alleiniger Verwendung des Iodosobenzols erreicht werden. Unter Einsatz der Kombination MnTPPCI und Kupfer(II)-Ionen sank die Nitrit-Bildung sehr stark ab, nämlich auf 2 %, 1,4 % und 0,9 %. Der Ausschluss des Porphyrins ließ die Ausbeuten in allen verwendeten Konzentrationen in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat wieder etwas ansteigen.

Ohne den Sauerstoffdonor war auch in Gegenwart von Kupfer(II)-Ionen kein Nitrit messbar (nicht gezeigt).

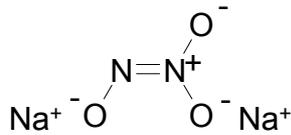
Es konnten im Gegensatz zu der Nitrit-Messung aus FLOX keine konzentrationsbedingten Zeitabhängigkeiten festgestellt werden.

## **2.12 Angeli`s Salz**

Einige Autoren stellten die These auf, dass die NOS-vermittelte NO-Biosynthese aus L-Arginin über das NO-Reduktionsprodukt Nitroxyl-Anion ( $\text{NO}^-$ ) verläuft. Ferner wird angenommen, dass letzteres sogar einen Teil der Effekte des EDRF (Endothelium-derived-factor) ausmachen soll. Man vermutet dabei, dass intermediär gebildetes  $\text{NO}^-$  über SOD zu NO oxidiert wird<sup>[92]</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die NO-Menge aus iNOS und nNOS durch die Anwesenheit von SOD erhöht wird. Dieser Effekt war nicht durch den verminderten Verbrauch von NO durch Superoxidradikal zu erklären<sup>[93]</sup>. Außerdem besitzen Substanzen, die Nitroxyl-Anion freisetzen eine vasodilatierende Wirkung<sup>[94]</sup>.

Da Oxime bereits als Modell-Substanz für die NOS-vermittelte NO-Biosynthese verwendet wurden, und auch hier eine NO-Freisetzung über Nitroxyl-Anion als Intermediat denkbar ist, war die Untersuchung eines  $\text{NO}^-$ -Donors unter den Bedingungen der Oxim-Analysen von besonderem Interesse. Die Wahl fiel hierbei auf das anorganische Angeli`s Salz, dass sowohl NO als auch  $\text{NO}^-$  freisetzt.

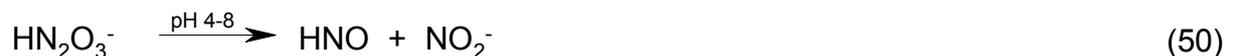
### 2.12.1 Chemische Eigenschaften



Angeli's Salz ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) wird auch als Dinatrium Trioxodinitrat, oder Dinatrium *N*-nitrohydroxylamat bezeichnet. Es ist das Dinatriumsalz der oxohyposalpetrigen Säure ( $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ; früher Nitrohydroxylaminsäure) und wurde im späten 19. Jahrhundert zum ersten Mal von Angelo Angeli <sup>[95]</sup> dargestellt. In fester Form ist die leicht lösliche, hygroskopische Substanz relativ stabil und kann unter Inertgas mehrere Monate trocken gelagert werden. In wässriger Lösung hingegen zerfällt sie ziemlich rasch, wobei die Zerfallsgeschwindigkeit sowohl temperatur- als auch pH-abhängig ist. Es werden dabei verschiedene Stickstoffoxid-Spezies freigesetzt. Die Art dieser Verbindungen ist jedoch von den äußeren Umständen abhängig <sup>[96]</sup>. Auf letzteres wird später noch genauer eingegangen.

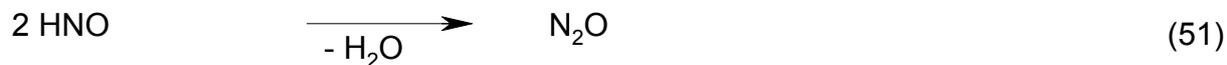
Ab pH 9 liegt die Substanz vollständig deprotoniert ( $\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$ ) vor <sup>[8, 96, 97]</sup>. In dieser Form ist das Salz unter anaeroben Bedingungen relativ stabil. In Lösung bei pH 10 kann es unter Kühlung und Sauerstoffausschluss sogar einige Stunden gelagert werden <sup>[10]</sup>.

Zwischen pH 8 und 4 dominiert das Mono-Anion  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$ . In Sauerstoffabwesenheit ist die Geschwindigkeitsrate der Zersetzung innerhalb dieses Bereiches relativ unabhängig von dem pH-Wert der umgebenden Lösung. Dieses ändert sich jedoch unter aeroben Bedingungen <sup>[8, 96, 98]</sup>. In beiden Fällen bildet sich zunächst aus dem Mono-Anion HNO (Nitroxyl, Nitrosylhydrid) und Nitrit [s. Gleichung (50) + Abb. 42]:



Die Bildung von Nitroxyl wurde bereits 1978 aus Hydroxylamin ( $\text{H}_2\text{NOH}$ ) beschrieben. Bei einem direkten Vergleich zwischen Angeli's Salz und  $\text{H}_2\text{NOH}$  stellte sich jedoch heraus, dass beide Substanzen verschiedene Nitroxyl-Arten hervorbrachten <sup>[99]</sup>. In dieser Studie, in der das chemische Verhalten von Angeli's Salz in Gegenwart von Hydroxylamin bei pH 8 untersucht wurde, machte man

folgende Beobachtungen: Aus  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  gebildetes HNO reagierte weniger mit sich selbst in Form einer Dimerisierung zu Distickstoffoxid als mit einem Molekül Hydroxylamin zu elementarem Stickstoff [s. Gleichung (51) und (52)]:



Im Gegensatz dazu dimerisierte aus Hydroxylamin gebildetes HNO im selben pH-Bereich eher, als dass es mit einem weiteren Molekül Hydroxylamin reagierte. Diese Beobachtungen, sowie nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass beide Nitroxyl-Arten sich in ihrem Elektronen-Zustand unterscheiden: Angeli's Salz bildet zwischen dem Bereich pH 4 bis 8, Singulett-HNO ( $^1\text{HNO}$ , Grundzustand <sup>[98, 100]</sup>), während das Produkt aus Hydroxylamin im Triplett-Zustand ( $^3\text{HNO}$  oder  $^3\text{NOH}$ , angeregter Zustand <sup>[98]</sup>) vorliegt. Letzteres ist somit isoelektronisch zu Luftsauerstoff. Daraus resultieren einige Besonderheiten, wodurch sich das chemische Verhalten von Angeli's Salz und des Hydroxylamins unterscheidet <sup>[8, 96, 99]</sup>.

Der Zersetzungsmechanismus des  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  in Anwesenheit von Sauerstoff ist trotz mehrfacher Aufklärungsversuche weiterhin nicht vollständig geklärt.

Kürzlich veröffentlichte Arbeiten konnten zeigen, dass HNO im physiologischen Milieu mit Sauerstoff ein starkes Oxidanz bildet <sup>[8]</sup>. Normalerweise bildet das Nitroxyl-Anion mit Sauerstoff das stark oxidierend wirkende Peroxynitrit:



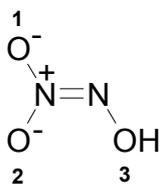
Jedoch scheint dieser Mechanismus im Falle des Angeli's Salz behindert zu sein: Untersuchungen bei dem physiologischem pH-Wert von pH 7,4 haben ergeben, dass synthetisch generiertes Peroxynitrit und das Oxidationsprodukt von Nitroxyl unterschiedliche chemische Eigenschaften haben. Außerdem konnte Nitrat als Isomerisierungsprodukt des Peroxynitrits unter diesen Bedingungen nicht gefunden werden <sup>[8]</sup>. Beide Beobachtungen ergaben, dass die Reaktion in Gleichung (53) unter Verwendung von Angeli's Salz im physiologischen Milieu keine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren konnte man zeigen, dass Nitroxyl, dessen  $\text{pK}_a$  in früheren Arbeiten bei 4,7 festgelegt wurde <sup>[101]</sup>, tatsächlich bei über 11 liegt <sup>[100]</sup>. Das bedeutet, dass bei

pH 7,4 nicht  $\text{NO}^-$  sondern praktisch nur  $\text{HNO}$  vorkommt. Dieser hohe  $\text{pK}_a$ -Wert ist eine Funktion der Grundzustände des Säure/ Base-Paares  ${}^1\text{HNO}/{}^3\text{NO}^-$ :



Aufgrund des Spin-Verbotes läuft diese Reaktion nur sehr langsam ab und ist damit zumindest in niedrigeren pH-Bereichen vielen Konkurrenzreaktionen ausgesetzt, wie z.B. der raschen Wasserabspaltung von  $\text{HNO}$  [s. Gleichung (51)]. Gleichung (54) zeigt, dass Nitroxyl-Anionen nur in alkalischer Lösung in größeren Mengen vorkommen können. Dieses stimmt mit der Beobachtung überein, dass im basischen Milieu eine quantitative Zersetzung von Angeli's Salz zu Peroxynitrit stattfindet, während bei pH 7,4 nur sehr geringe Mengen gefunden wurden <sup>[8]</sup>.

Die Bildung von  $\text{HNO}$  und Nitrit gemäß Gleichung (50) verläuft unter Spaltung der N-N-Bindung. Normalerweise liegt das Mono-Anion  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$  in wässriger Lösung aus thermodynamischen Gründen mit einer Protonierung dem Sauerstoff **3** vor:



**Abbildung 40:** *Thermodynamisch begünstigtes Tautomer von Angeli's Salz in wässriger Lösung.*

Eine Spaltung der N=N-Doppelbindung würde jedoch zu einem Triplett-Produkt führen. Darum muss für die Bindungsspaltung die Substanz zu einem Molekül mit einer N-N-Einfachbindung tautomerisieren, aus der  ${}^1\text{HNO}$  entstehen kann. Diese Tautomerisierung verläuft jedoch langsam (Abb. 41).

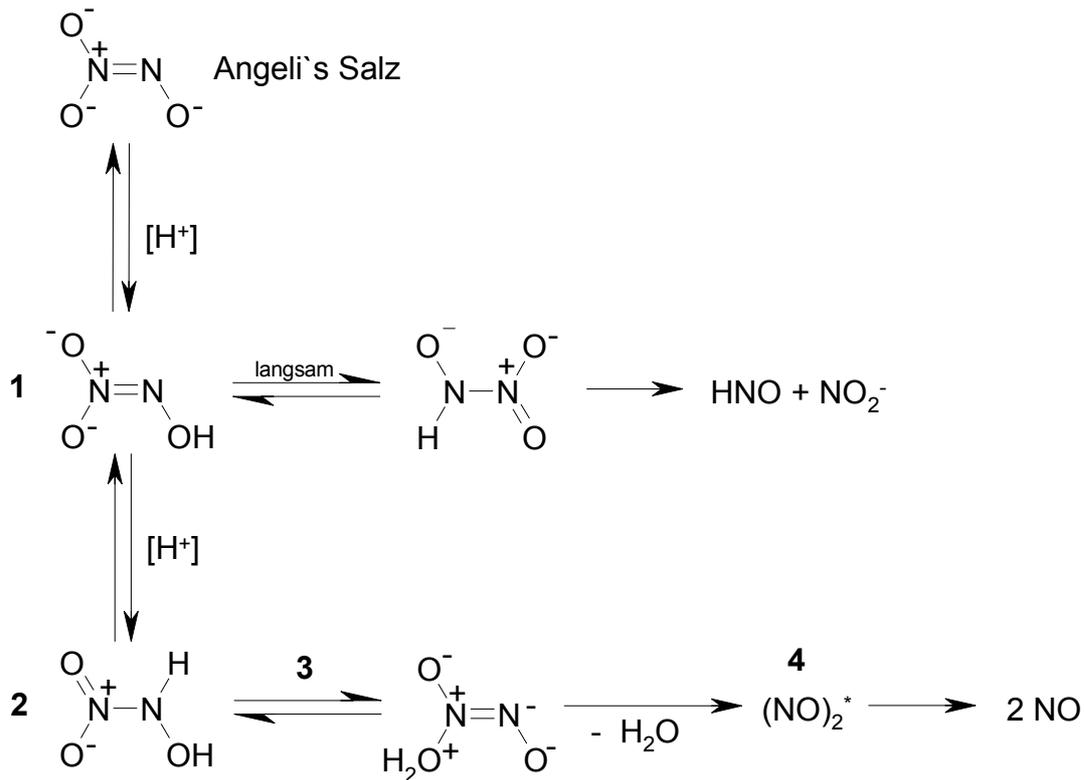


**Abbildung 41:** *Zersetzung von Angeli's Salz in wässriger Lösung, pH 4-8.*

Die Zersetzungsrates der Substanz steigt unterhalb von pH 4 drastisch an. Ab diesem pH-Wert tritt auch vermehrt die oxohyposalpetrige Säure ( $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) auf. Die Produktzusammensetzung verändert sich, es wird nun auch NO gebildet. Bei der NO-Freisetzung zwischen pH 3 und 4 geht man davon aus, dass gebildetes Nitrit zu salpetriger Säure ( $\text{HNO}_2$ ) protoniert wird und in dieser Form die NO-Freisetzung aus Angeli's Salz katalysiert. Der genaue Mechanismus ist jedoch zurzeit noch unklar. Eine Vermutung wäre die Reaktion des Mono-Anions ( $\text{HN}_2\text{O}_3^-$ ) mit salpetriger Säure<sup>[98]</sup>. Eine komplexe Kettenreaktion zwischen einer von HNO hervorgebrachten Spezies und Nitrit könnte ebenfalls ablaufen<sup>[10]</sup>. <sup>15</sup>N-Markierungsversuche wurden für die Darstellung einer Reaktion zwischen  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$  und Nitrit herangezogen<sup>[102]</sup>.

Unterhalb von pH 3 zerfällt die Substanz extrem schnell zu zwei Mol NO. Auch hier wirft der Freisetzungsmechanismus noch einige Fragen auf. Ein Erklärungsmodell (s. Abb. 42) geht von der vermehrten Bildung der oxohyposalpetrigen Säure [ $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (**2**)] in einem stark sauren Milieu aus. Die Abhängigkeit der NO-Freisetzungsmenge von einer sauren Umgebung lässt dieses vermuten<sup>[10, 96, 98]</sup>. Dabei wird nach einer Tautomerisierung (**3**) des  $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (**2**) intermediär ein angeregtes NO-Dimer (**4**) gebildet, welches zu zwei mol NO zerfällt. Dieser Weg ist auch im sauren Milieu oberhalb von pH 3 denkbar, wenn auch im verminderten Maße.

Die Zerfallsgeschwindigkeit und Produktzusammensetzung hängt stark vom pH-Wert der umgebenden Lösung ab (s. oben). Abbildung 42 fasst dieses zusammen. Hier wird ebenso deutlich, dass in einem weniger stark sauren Milieu die NO-Freisetzung aus der oxohyposalpetrigen Säure (**2**) in Konkurrenz zu der Bildung von HNO und Nitrit aus dem Mono-Anion (**1**) tritt, da beide Verbindungen miteinander im Gleichgewicht stehen.



**Abbildung 42:** Zusammenfassendes Zersetzungsschema von Angeli's Salz in wässriger Lösung bei verschiedenen pH-Werten.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Zersetzung von Angeli's Salz mehrere Wege parallel ablaufen.

In Gegenwart von oxidativ wirkenden Metallsalzen, insbesondere von Kupfer(II)-sulfat und Kaliumhexacyanoferrat(III) wird die NO-Freisetzung auch im neutralen Milieu erhöht<sup>[103]</sup>. Dieses wird ebenso durch Eisen(III)-Häm-Moleküle wie das Enzym Cytochrom c bewirkt. Die NO-Bildung vollzieht sich dabei über intermediär gebildete instabile Nitrosyl-Komplexe und hat im Gegensatz zu dem in Abbildung 42 gezeigten Mechanismus biologische Relevanz<sup>[8, 97, 100, 104]</sup>.

Hierzu lassen sich folgende Punkte zusammenfassen:

- Zerfallsgeschwindigkeit und Zersetzungsprodukte von Angeli's Salz sind abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung<sup>[96]</sup>.
- Zwischen pH 4 und 8 verläuft die Zersetzungsgeschwindigkeit unter anaeroben Bedingungen von Angeli's Salz pH-unabhängig und geht von dem in diesem

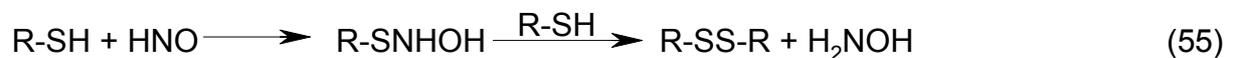
Milieu dominierenden Mono-Anion  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$  aus. Es bildet sich dabei Singulett-Nitroxyl ( $^1\text{HNO}$ ) und Nitrit [s. Gleichung (50) und Abb. 42] <sup>[8, 10]</sup>.

- Die NO-Bildung beginnt in ausreichend saurem Milieu; der höchste pH-Wert den man in der Literatur findet beträgt 4,9 <sup>[102]</sup>. Verschiedene Wege werden hierfür postuliert. Unter anderem geht man von der Bildung der oxohyposalpetrigen Säure ( $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) aus. Auch eine Katalyse durch salpetrige Säure wird diskutiert <sup>[10, 96, 98]</sup>.
- Unterhalb von pH 3 bildet die Substanz zwei Mol NO <sup>[102]</sup>. Auch hier existieren mehrere Freisetzungstheorien. NO-Bildung aus der oxohyposalpetrigen Säure ist möglich.
- Im neutralen Milieu setzt Angeli's Salz kein Nitroxyl-Anion ( $\text{NO}^-$ ) frei, sondern nur  $^1\text{HNO}$ . Die Begründung ist in den  $\text{pK}_a$ -Werten der verschiedenen Spezies zu finden, welche aus den unterschiedlichen Elektronen-Zuständen resultieren.  $^1\text{NO}^-$  hat vermutlich einen noch höheren  $\text{pK}_a$ -Wert als  $^3\text{NO}^-$  ( $\text{pK}_a$  23 zu 11) und wird sich erst bei viel höheren pH-Werten ausbilden als das Triplett-Nitroxyl-Anion. Das bedeutet, dass es bei der Deprotonierung zu einem Spin-Verbot kommt, was die Reaktion verlangsamt und pH-Werte von weit über 7 verlangt <sup>[8]</sup>.
- Die NO-Bildung aus Angeli's Salz wird im neutralen Milieu durch anorganische, oxidativ wirksame Metall-Salze wie Kupfer(II)-sulfat oder Kaliumhexacyanoferrat(III) erhöht. Dabei entstehen intermediär instabile Nitrosyl-Komplexe <sup>[103]</sup>.
- Physiologisch bedeutsam ist wahrscheinlich nur die NO-Bildung aus HNO durch die Einwirkung von Ein-Elektron-Oxidanzien, wie die kupferhaltige Superoxiddismutase (SOD) oder Eisen(III)-hämhaltige Enzyme wie die Oxidase Cytochrom c <sup>[97, 104, 105]</sup>.
- Ab pH 9 liegt das Salz vollständig deprotoniert als  $\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$  vor und ist unter anaeroben Bedingungen relativ stabil. Alkalische wässrige Lösungen von Angeli's Salz können unter Kühlung und Inertgas einige Zeit gelagert werden <sup>[10]</sup>.
- Unter oxidativen Bedingungen zerfällt  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  im Basischen vollständig zu Peroxynitrit <sup>[8, 97]</sup>. Im Neutralen hingegen wurden nur sehr geringe Mengen an  $\text{ONOO}^-$  gefunden.

### 2.12.2 Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften

Erst kürzlich erlangte Angeli's Salz erneut Bedeutung als klinisch relevanter NO-Donor bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. dem Herzinfarkt. Ebenso rückte die Aufklärung des Zersetzungsmechanismus unter physiologischen Bedingungen in den Mittelpunkt des Interesses. Neben seiner vasodilatatorischen Wirkung scheint Angeli's Salz in Verbindung mit Sauerstoff im physiologischen Milieu ein starkes Oxidanz zu bilden. Dieses ist in der Lage Doppelstrangbrüche in der DNA herbei zu führen. Seine Struktur ist zurzeit noch unklar, jedoch handelt es sich dabei nicht um Peroxynitrit<sup>[8]</sup>.

Obwohl es formal zu den Diazeniumdiolaten (NONOaten) zählt, haben diese und Angeli's Salz unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. Als Begründung wird hierfür vermutet, dass NONOate ausschließlich NO bilden, während  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  neben NO auch HNO freisetzt. Die direkte Reduktion von HNO zu NO findet unter physiologischen Bedingungen anscheinend nicht durch einfache Redox-Prozesse statt. Des Weiteren bleibt bei pH 7,4 Nitroxyl sehr viel länger erhalten als bisher angenommen. Darum kann es durchaus pharmakologische Effekte entwickeln, die sich allerdings von denen des Stickstoffmonoxids unterscheiden. Dieses zeigt sich besonders deutlich in dem Verhalten der beiden Spezies gegenüber Häm-Proteinen und Thiolen: NO reagiert eher mit cytosolischen Eisen(II)-haltigen Varianten (z.B. Aktivierung der Guanylylcyclase), während HNO die membranständigen Eisen(III)-Proteine bevorzugt. NO hat eine deutlich niedrigere Affinität zu Thiolen als HNO. Letzteres bildet durch Reaktion mit SH-Gruppen Hydroxylamin:



Die Umwandlung von HNO zu NO wird unter physiologischen Bedingungen durch Enzyme wie die kupferhaltige SOD oder das Eisen(III)-Häm-Molekül Cytochrom c katalysiert. Beide bewirken eine Reduktion über intermediär gebildete instabile Nitrosyl-Komplexe. Dazu konkurrieren jedoch Reaktionen von Nitroxyl mit anderen Biomolekülen oder mit Sauerstoff. Es ist darum von dem umgebenden Zellkompartiment abhängig bzw. von dessen Inhaltsstoffen, was aus diesem Zersetzungsprodukt wird: In GSH-reichen Kompartimenten wie Cytosol und

Mitochondrien wird die oben beschriebene Reaktion zwischen HNO und Thiolen dominieren, da diese noch schneller abläuft als die NO-Bildung durch SOD. Die katalysierten Oxidationen hingegen spielen eher in den enzymreichen Zellmembranen eine Rolle. Hier erlangt auch die Autoxidation von HNO durch Sauerstoff größere Bedeutung<sup>[8]</sup>.

Die Reaktion von zwei Nitroxyl-Molekülen zu Distickstoffoxid ( $N_2O$ ) ist physiologisch nicht so bedeutsam, wie ihre hohe Geschwindigkeit vermuten lässt. Eine Reduktion des Stickstoffmonoxids zu Nitroxyl ist in diesem Milieu nämlich thermodynamisch benachteiligt und findet auch nicht unter den Bedingungen statt, unter denen Sauerstoff reduziert wird<sup>[8]</sup>.

### **2.12.3 Chemilumineszenzbestimmungen**

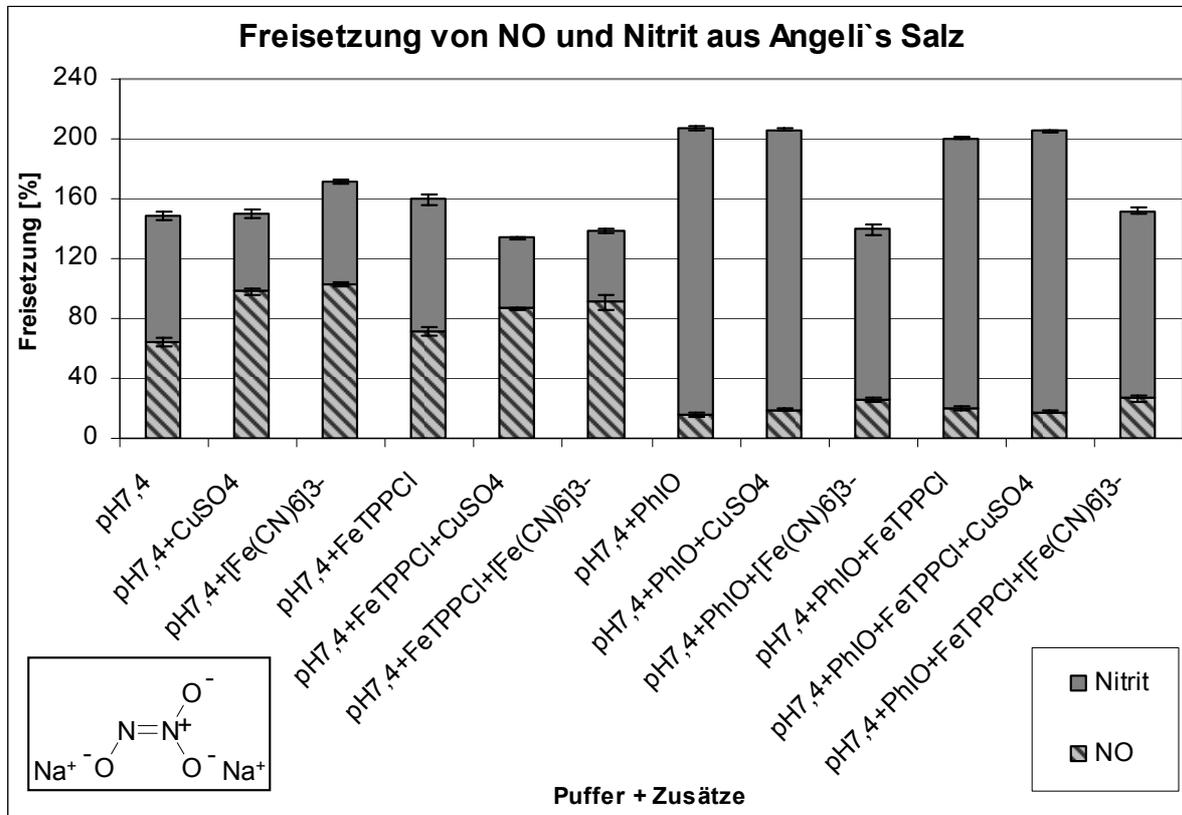
Die NO-Freisetzung aus Angeli's Salz unter physiologischen Bedingungen wirft noch immer Fragen auf. Über die gebildete NO-Menge in diesem Milieu gibt es derzeit ebenfalls keine konkreten Informationen.

Aus diesem Grund sollte die NO-Freisetzung des Salzes unter den Bedingungen der Chemilumineszenzbestimmungen der Oxime untersucht werden. Die Oxidationsprodukte des Stickstoffmonoxids Nitrit und Nitrat wurden ebenfalls bestimmt. Wir konzentrierten uns bei allen Chemilumineszenzmessungen lediglich auf den physiologischen pH-Bereich von 7,4.

#### **2.12.3.1 Ergebnisse**

Die folgende Graphik zeigt die Ergebnisse der NO- und Nitrit-Messungen aus Angeli's Salz. Auf der y-Achse sind die Werte in % aufgetragen. Auf der x-Achse befinden sich die Angaben zu den Lösemittel-Zusätzen. Alle Messungen wurden bei pH 7,4 durchgeführt. Der untere, gestreifte Bereich der Balken zeigt die gemessenen Stickstoffmonoxid-, der einheitliche, graue Bereich darüber die Nitrit-Werte. Eine Nitrat-Bestimmung unter den aufgeführten Bedingungen erfolgte ebenfalls, nur konnte hierbei kein  $NO_3^-$  gefunden werden.

Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichung. Die Stichprobenanzahl  $n$  beträgt 5.



**Abbildung 43:** NO- und Nitrit-Freisetzung aus Angeli's Salz.

Es fällt auf, dass unter Verwendung von Iodosobenzol generell weniger NO, aber dafür mehr Nitrit erhalten wurde.

Ergebnisse bis zu 200 % Stickstoffspezies sind bei Angeli's Salz durchaus möglich, da die Substanz zwei Stickstoff- und drei Sauerstoffatome aufweist.

#### NO-Messung: Ohne Sauerstoffdonor

Die NO-Freisetzung aus der reinen Puffer-Lösung ergab 64 %. Das entspricht 0,64 mol pro mol eingesetzter Substanz. Der alleinige Zusatz von Porphyrin bewirkte mit 71 % nur eine sehr geringe Erhöhung. Die Verwendung der beiden Metall-Salze Kupfer(II)-sulfat und Kaliumhexacyanoferrat(III) bewirkten mit einem Ergebnis von 98 % bzw. 103 % eine deutliche Steigerung, welche jedoch wieder abfiel sobald FeTPPCL dazugegeben wurde. Letztere betragen 87 % bzw. 91 % und waren damit immer noch höher als die Werte, die ohne Zusätze erzielt wurde.

*NO-Messung: Mit Sauerstoffdonor*

Alle Werte sind deutlich niedriger als unter Verwendung des Sauerstoffdonors.

Der alleinige Zusatz von Iodosobenzol lieferte mit 15 % die niedrigsten Werte. Die Ergebnisse unter zusätzlicher Gabe von Kupfer(II)-sulfat bzw. Porphyrin und  $\text{CuSO}_4$  lagen mit 18 bzw. 17 % knapp darüber. Noch etwas höher wurden die Werte nach Zugabe der Kombination  $\text{FeTPPCI}$  + Sauerstoffdonor. In Anwesenheit des Eisen(III)salzes wurden mit 27 %, sowohl mit als auch ohne Porphyrinzugabe, die höchsten NO-Werte erhalten und.

Was die Graphik nicht zeigt, sind die extrem stark verkürzten Halbwertszeiten in Anwesenheit des Sauerstoffdonors. Normalerweise beträgt die Halbwertszeit von Angeli's Salz bei pH 7,4 und  $37^\circ\text{C}$  2-4 Minuten <sup>[106]</sup>. Unter Verwendung von Iodosobenzol war die NO-Freisetzung jedoch bereits nach einer halben Minute beendet.

*Nitrit-Messung: Ohne Sauerstoffdonor*

Die Nitrit-Freisetzung der reinen Pufferlösung beträgt 84 %. Nach Zugabe von  $\text{FeTPPCI}$  wird praktisch der gleiche Wert erhalten. Etwas erniedrigt sind die Ergebnisse unter Verwendung der Kombination Porphyrin und Metallsalz, wobei sowohl bei Kupfer(II)-sulfat als auch bei Kaliumhexacyanoferrat(III) in beiden Fällen 47 % erhalten wurden. Praktisch identisch ist das Ergebnis unter der alleinigen Verwendung des Kupfersalzes (52 %).

Lediglich der Einsatz von Kaliumhexacyanoferrat(III) im porphyrinfreien System brachte eine leichte Erhöhung, die mit 69 % jedoch unter dem Wert der reinen Pufferlösung lag. Hier waren Unterschiede zu dem Verhalten der NO-Freisetzung gegenüber den Zusätzen zu beobachten. Die Zugabe der beiden anorganischen Salze bewirkte im Gegensatz zu der NO-Bildung eine Senkung der Nitrit-Freisetzung, welches sich noch verstärkte wenn Porphyrin zusätzlich verwendet wurde.

*Nitrit-Messung: Mit Sauerstoffdonor*

Unter Verwendung des Iodosobenzols stieg die Nitrit-Freisetzung unter allen hier untersuchten Bedingungen deutlich an. Der Einsatz von Kaliumhexacyanoferrat(III)

bewirkt dabei mit 113 % allein und 125 % in Kombination mit Porphyrin noch die niedrigsten Werte. Dabei erzielte die Verwendung von FeTPPCI ein etwas höheres Ergebnis. Alle anderen Kombinationen erbrachten noch höhere Werte. Die höchsten Ergebnisse lieferte die alleinige Verwendung des Sauerstoffdonors mit 190 %. Knapp darunter lagen die beiden Werte die nach Zusatz von Kupfer(II)-sulfat erhalten wurden, und zwar betrugen diese 186 % (sowohl mit als auch ohne Porphyrin). Noch etwas niedriger war mit 180 % die gemessene Nitrit-Menge in Anwesenheit des Oxygenierungssystems.

Alle Kombinationen des Iodosobenzols, mit Ausnahme der von Kaliumhexacyanoferrat(III), lieferten nach Addition der erhaltenen NO- und Nitrit-Mengen 200 % Ausbeute an freigesetzter Stickstoffspezies. Die Ergebnisse lassen sich sehr gut in die Gruppen mit und ohne Zusatz von Sauerstoffdonatoren einteilen. Im Falle der ersten Gruppe lag das Verhältnis der Freisetzung von NO zu Nitrit auf der Seite des Stickstoffmonoxids. Ausnahme bildeten die reine Puffer-Lösung und der alleinige Zusatz von Porphyrin; hier wurde etwas mehr  $\text{NO}_2^-$  gebildet. Nach Zugabe des Sauerstoffdonors änderte sich das Verhältnis zugunsten des Nitrits.

#### 2.12.4 Fluorimetrische Bestimmungen

Die Autoxidation des aus Angeli's Salz gebildeten Mono-Anions unter physiologischen Bedingungen ist nach wie vor nicht vollständig geklärt <sup>[8]</sup>. Es ist lediglich bekannt, dass diese langsam und Spin-verboten gemäß Gleichung (56) über Elektronen-Transfer abläuft. Dabei reagiert ein aus dem Mono-Anion  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$  gebildetes Zwischenprodukt zu einem starken Oxidanz. Letzteres ist in der Lage Strangbrüche in der DNA zu verursachen:



Es wird angenommen, dass es sich bei dem Intermediat um Nitroxyl handelt. Das Nitroxyl-Anion kann mit Sauerstoff zu Peroxynitrit reagieren:



Das Oxidanz aus Gleichung (56) ist jedoch kein Peroxynitrit. Zum einen hat es andere Eigenschaften als synthetisch hergestelltes  $\text{ONOO}^-$ , zum anderen wird Peroxynitrit aus Angeli's Salz im neutralen Milieu kaum gebildet (lediglich zu 25 % <sup>[8]</sup>). Dass es sich so verhält, ist unter anderem darin zu begründen, dass  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$   $^1\text{HNO}$  freisetzt. Durch die Deprotonierung entsteht jedoch  $^3\text{NO}^-$ . Spin-verbotene Reaktionen verlaufen immer langsam und in relativ geringen Maßen. Darum ist die Reaktion aus Gleichung (57) bei pH 7,4 thermodynamisch benachteiligt und ebnet dadurch den Weg für Konkurrenzreaktionen [s. 2.12.1, Gleichung (51) und Abb. 42].

Der fluorimetrische Nachweis von Peroxynitrit durch den Fluoreszenzindikator Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF) <sup>[98, 107]</sup> schien aus folgende Gründen geeignet, die Verhältnisse der Autoxidation von Angeli's Salz unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen:

1. Die Bildung des Dichlororfluoresceins (DCF) aus dem Fluoreszenzindikator durch die Einwirkung von Angeli's Salz wurde in der Literatur beschrieben. Kern dieser biochemischen Arbeit war Aufklärung der möglichen SOD-Reaktionen in Gegenwart von  $\text{NO}^-$  <sup>[107]</sup>.
2. Es ist mit diesem Assay möglich,  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen, sowie unter Verwendung verschiedener Zusätze zu vermessen.
3. Fluorimetrische Bestimmungsmethoden zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, denn mit ihnen sind Messungen bis in den ppb-Bereich ( $10^{-9} \text{ g x g}^{-1}$ ) möglich.

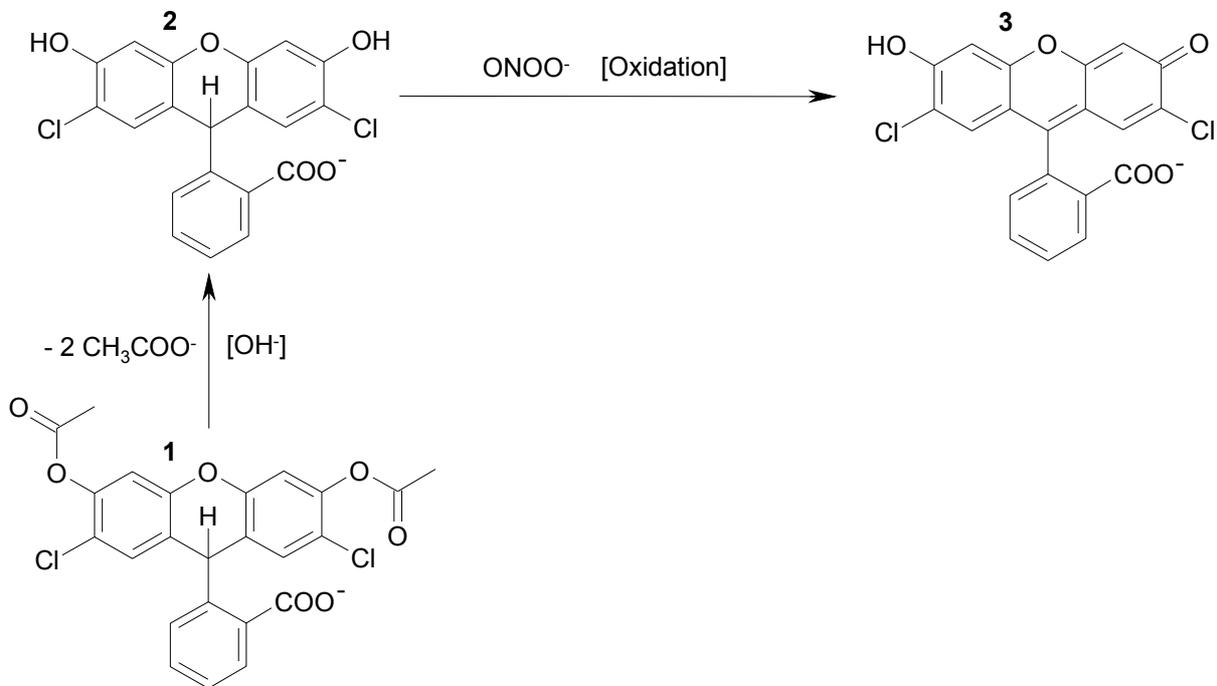
#### **2.12.4.1 Versuchsprinzip**

Der Einsatz eines Fluoreszenzindikators empfiehlt sich immer dann, wenn die zu untersuchende Substanz keine Eigenfluoreszenz aufweist. In dem Fall lässt man

diese mit einer anderen Verbindung reagieren, woraus die Bildung eines fluoreszierenden Produktes resultiert.

Abbildung 44 zeigt die Indikatorreaktion des 2,7-Dichlorodihydrofluorescein <sup>[108]</sup> [DCDHF, (2)] mit Peroxynitrit\*. DCDHF kann von Peroxynitrit zu dem grün fluoreszierenden Dichlorfluorescein (3) oxidiert werden. Letzteres emittiert während einer Anregung von 500 nm bei einer Wellenlänge von 523 nm. Vor der Reaktion mit Peroxynitrit wird DCDHF durch alkalische Hydrolyse der Esterfunktion aus 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (1) erhalten.

Sowohl das aus Angeli<sup>1</sup> Salz gebildete  $\text{NO}^-$  als auch das unbekannte Oxidanz sind vermutlich ebenfalls in der Lage DCDHF zu DCF zu oxidieren <sup>[107]</sup>.



**Abbildung 44:** Fluorimetrischer Nachweis von Peroxynitrit durch Oxidation von 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF) nach alkalischer Hydrolyse der Esterfunktion.

DCDHF kann auch durch  $\text{NO}^{**}$  und Luftsauerstoff oxidiert werden. Allerdings verläuft diese Reaktion nur in sehr geringem Maße.

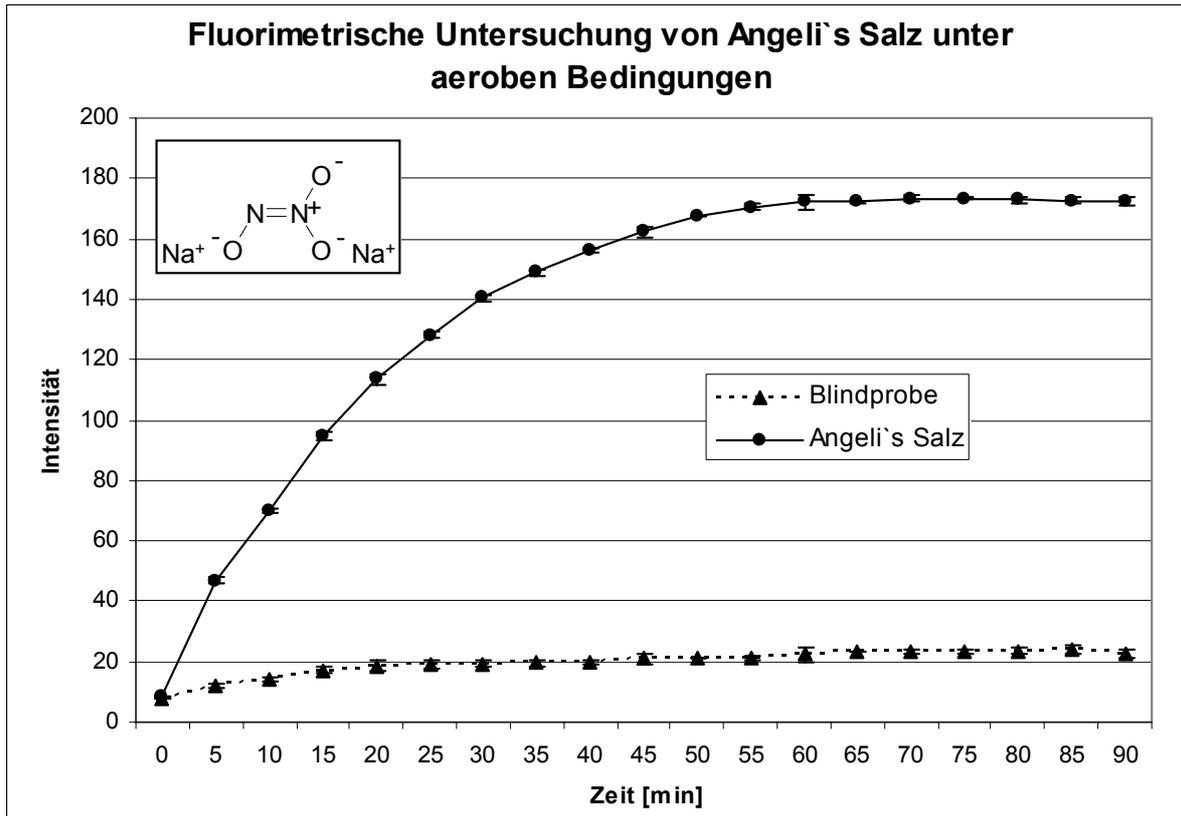
\*Dieser Nachweis wird häufig zur Darstellung von  $\text{ONOO}^-$  in Zellkulturen angewandt.

\*\*Es wird vermutet, dass nicht  $\text{NO}$  direkt mit DCDHF reagiert, sondern dessen Oxidationsprodukt  $\text{NO}_2$  <sup>[109]</sup>. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

#### **2.12.4.2 Versuchsdurchführung und Ergebnisse**

In der folgenden Graphik (s. Abb. 45) wurden anstelle von Konzentrationen Fluoreszenzintensitäten angegeben, weil die Versuchsergebnisse lediglich qualitativen Aussagen dienen sollten.

Da die Oxidation von DCDHF zu dem fluoreszierenden DCF durch Angeli's Salz bereits beschrieben worden war <sup>[107]</sup>, sollte diese Reaktion unter den Bedingungen aller in dieser Arbeit durchgeführten Chemilumineszenz-Messungen überprüft werden. Die Ermittlung der bis zur Beendigung der Reaktion benötigten Zeitspanne war ebenfalls von Interesse. Dazu wurde das Salz gemeinsam mit dem Indikator in einer Pufferlösung mit pH 7,4 unter aeroben Bedingungen gelöst und sofort fluorimetrisch vermessen. Die Inkubationen wurden sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37°C durchgeführt. Die folgende Graphik enthält die Ergebnisse bei Raumtemperatur. Als Blindprobe wurde die reine Indikator-Puffer-Lösung verwendet. Die Intensität wurde alle fünf Minuten über 1,5 Stunden erfasst. Die Stichprobenzahl n beträgt 5. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichung.

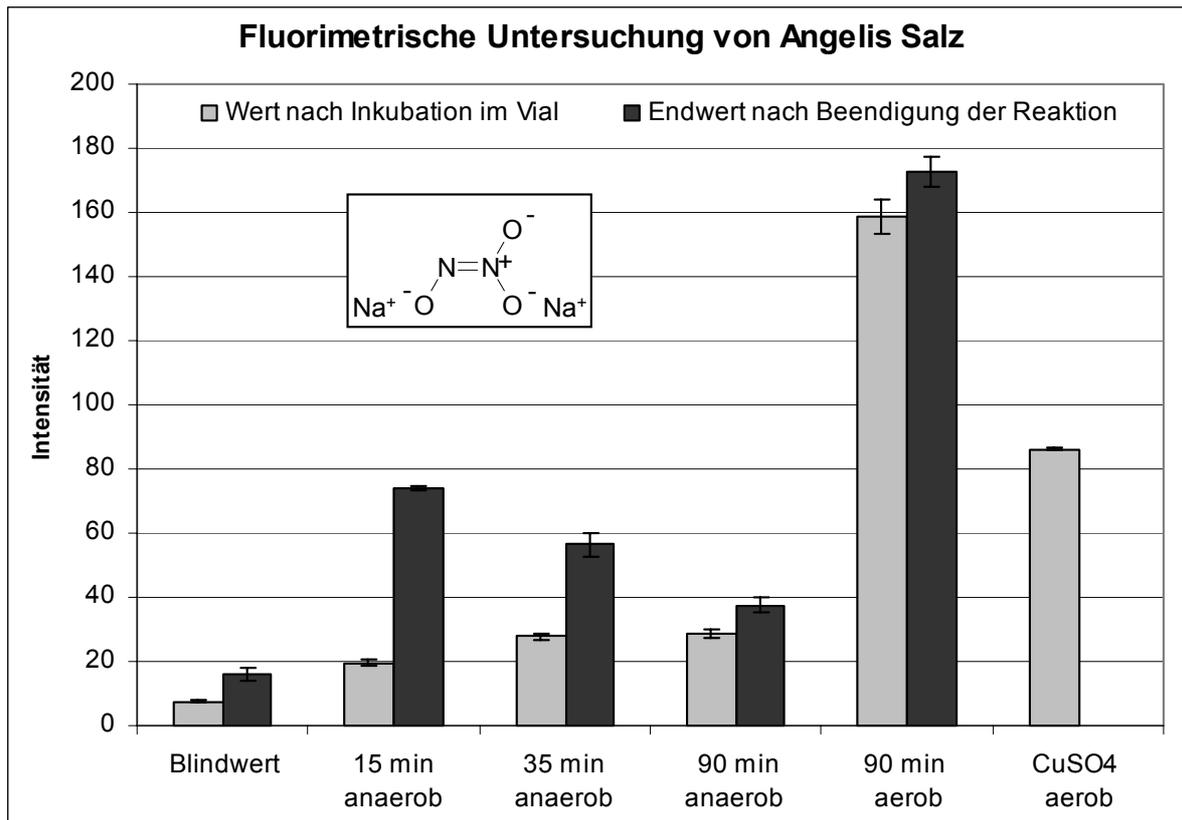


**Abbildung 45:** Fluorimetrische Vermessung von Angeli's Salz unter aeroben Bedingungen, bei pH 7,4 und Raumtemperatur.

Die Intensität der Salzlösung beträgt fast das 9 fache der Intensität der Blindprobe. Der Fluoreszenzindikator wurde in Gegenwart des Salzes oxidiert und die Literatur-Angaben <sup>[107, 110]</sup> unter den hier vorhandenen Bedingungen bestätigt. Die Zeitspanne, die Angeli's Salz für die vollständige Zersetzung benötigt, beträgt hier 90 Minuten bei Raumtemperatur (Abb. 45).

Um den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus in Gleichung (56) näher zu beleuchten, mussten verschiedene Dinge bei der Versuchsplanung und deren Durchführung beachtet werden. Da sowohl Peroxynitrit als auch Nitroxyl-Anionen in der Lage sind den Fluoreszenzindikator zu oxidieren <sup>[107]</sup>, mussten die Versuche sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Es konnten im Neutralen nur sehr geringe Mengen an Peroxynitrit nach oxidativer Zersetzung von Angeli's Salz gefunden werden <sup>[8]</sup>. Diese Reaktion benötigt jedoch Sauerstoff, weswegen unter anaeroben Bedingungen die Oxidation des DCDHF zu dem fluoreszierenden DCF ausbleiben sollte. Die Reaktion über das Nitroxyl-Anion ist dagegen sauerstoffunabhängig.

Die Inkubationszeit von 90 Minuten bei Raumtemperatur wurde aus dem ersten fluorimetrischen Versuch übernommen (Abb. 45). Nach dieser Zeitspanne wurde der Indikator zugefügt und die Untersuchungslösung sofort fluorimetrisch vermessen. Weder bei dem aeroben noch bei dem anaeroben Reaktionsansatz konnte eine Fluoreszenz erhalten werden. Aus diesem Grunde wurde der Versuch wiederholt, indem der Indikator zusammen mit Angeli's Salz inkubiert wurde. Die Abdunklung der Ansätze bis zu deren fluorimetrischen Untersuchung sollte Fluoreszenzlöschung durch Licht vermeiden. Lösungen, die für die Herstellung der anaerobisierten Proben bestimmt waren, wurden vor dem Inkubieren 20 Minuten mit Argon begast. Um den Verlauf während der Inkubation zu beobachten, erfolgte die Vermessung mancher Ansätze vor der Beendigung der Reaktion, und zwar nach 15 und 35 Minuten. Alle Proben wurden im Fluorimeter so lange weiter untersucht, bis keine Veränderung der Intensität mehr zu verzeichnen bzw. die Oxidationsreaktion beendet war. Einem Ansatz wurde Kupfer(II)-sulfat als Nitroxyl-Fänger zugefügt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Graphik (Abb. 46) dargestellt. Dabei sind die Versuchsbedingungen gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Stichprobenanzahl  $n$  beträgt 5 ( $MW \pm SD$ ).



**Abbildung 46:** Ergebnisse der fluorimetrischen Untersuchung von Angelis Salz bei Raumtemperatur unter verschiedenen Bedingungen. Die hellen Balken stellen die Werte sofort nach Beendigung der Inkubation dar. Die dunklen Balken zeigen die Ergebnisse nach Beendigung der Intensitätsänderung bzw. der Reaktion.

Alle Ergebnisse, sowohl aerob als auch anaerob, lagen über dem Wert der Blindprobe. Wie zu erwarten war, stiegen die Werte mit Zunahme der Inkubationszeit im abgedunkelten Reaktionsgefäß. Dabei war jedoch zwischen 35 und 90 Minuten keine Erhöhung mehr zu verzeichnen. Jedoch wurden deutliche Unterschiede bei der Fluoreszenzmessung bis zur Beendigung der Reaktion beobachtet: Nicht nur dass die erhaltenen Endwerte mit zunehmender Inkubation abfielen, auch der Unterschied zwischen beiden Ergebnissen wurde immer geringer. Ein Abbruch der Inkubation nach 15 Minuten und die sofortige fluorimetrische Vermessung führten zu einer Intensität die 4-mal niedriger war als der Endwert. Nach 35 Minuten war der Endwert nur noch doppelt so hoch wie direkt nach der Inkubation und nach 90 Minuten war zwischen den beiden Ergebnissen lediglich ein sehr kleiner, wenn auch signifikanter Unterschied zu beobachten, der dem der Blindprobe entsprach.

Sowohl die Endwerte als auch die Werte der Messungen direkt im Anschluss an die Inkubation waren unter anaeroben Bedingungen sehr viel niedriger als in

Sauerstoffanwesenheit. Auch bei den aeroben Ansätzen war der Endwert etwas höher als der kurz nach Beendigung der Inkubation. Dieser Unterschied fiel zwar geringer aus als unter anaeroben Bedingungen nach 15 bzw. 35 Minuten, lag allerdings über dem der Blindprobe.

Durch die Zugabe von Kupfer(II)-sulfat wurde in Sauerstoffanwesenheit die Fluoreszenz fast halbiert.

## **2.13 Diskussion der Ergebnisse**

### **2.13.1 Dünnschichtchromatographie**

Mit diesem Versuch konnte die Entstehung von Fluorenon unter den Bedingungen der Chemilumineszenz-Messungen bestätigt werden.

Die Tatsache, dass die Geschwindigkeit der Umwandlung des Oxims in die entsprechende Carbonyl-Verbindung mit der Basizität des Milieus zunimmt, ist erstaunlich wenn man dies mit den Ergebnissen der NO-Messung vergleicht (s. 2.7, Abb. 21). Hier scheint sich die Stabilität der Substanz mit steigendem pH-Wert eher zu erhöhen, was durch die wachsenden Reaktionszeiten der NO-Freisetzung von FLOX angezeigt wird. Nicht zu erklären sind die ersten 10 Minuten der Reaktion im Sauren, in denen auf der DC-Platte noch kein Zerfallsprodukt erscheint, aber bei der NO-Messung 31 % der Gesamt-NO-Menge bereits gebildet wurde. Eine mögliche Erklärung wären die äußeren Gegebenheiten des DC-Versuches, die sich von denen der NO-Messung in folgender Weise unterscheiden: Es handelt sich hierbei um ein geschlossenes System, da die Ansätze in einem „Vial“ inkubiert wurden. Deshalb kann die Zersetzungsreaktion lediglich bis zur Ausbildung eines chemischen Gleichgewichtes stattfinden. Dagegen liegt bei der NO-Messung ein offenes System vor, da hier eines der Reaktionsprodukte (NO) mit Hilfe des Trägergases Argon ständig entzogen wird. Dadurch kommt es zu einer permanenten Verschiebung und somit zu einer starken Beeinflussung des chemischen Gleichgewichtes. Dieses könnte dazuführen, dass die kinetischen Verhältnisse beider Versuche in diesem Falle nicht 1:1 übertragbar sind und so zu diesem Zeitphänomen geführt haben.

Dieser Sachverhalt könnte auch erklären, warum es bei pH 4,5 niemals zu einer vollständigen Umwandlung des Oxims zur Carbonylverbindung kommt. Zum anderen

ist es durchaus denkbar, dass der Rest des ehemaligen Oxim-Moleküls nach der NO-Freisetzung eventuell noch weitere Intermediate oder Assoziate bildet, die unter den gewählten Bedingungen nicht detektierbar sind. Auch Nebenprodukte sind denkbar. Zu geringe Laufzeiten könnten bewirken, dass die Substanz am Start verbleibt, wo sie von den Flecken der Zusätze überdeckt wird. Kinetische Gründe könnten dafür verantwortlich sein, dass ein solches Intermediat bei den höheren pH-Werten nicht entsteht.

Der Substanzfleck, der kurz nach Beginn der Inkubation 20 Minuten lang detektiert und weder der Ausgangssubstanz noch Fluorenon zugeordnet werden konnte, stammt möglicherweise von dem Fluorenyliminoxy-Radikal oder dem daraus resultierenden organischen dimerähnlichen Moleküls (s. Abb. 11).

## **2.13.2 Nachweis von Hydroxylamin**

### **2.13.2.1 Vermessung von Hydroxylamin**

Die UV/Vis-Untersuchung von Hydroxylamin hat gezeigt, dass das gebildete Chinonimin wie in früheren Arbeiten bereits angegeben eine gewisse Oxidationsempfindlichkeit besitzt. Ihr Einfluss auf die erhaltenen Werte ist allerdings von den äußeren Gegebenheiten abhängig wie der Vergleich der Ergebnisse der Hydroxylamin-Messung unter verschiedenen Zusätzen in Abbildung 37 gezeigt hat. Iodosobenzol bewirkt eine starke Oxidation des Farbproduktes, wenn auch nicht vollständig.

Neben der Oxidationsempfindlichkeit des grünen Farbproduktes ist die Zerstörung des Analyten durch das oxidativ wirksame Iodosobenzol eine weitere mögliche Begründung für die starke Absenkung der Chinonimin-Konzentration und den geringen Unterschied der Werte 30 Minuten und 24 Stunden nach Reagenzien-Zugabe. Der Vergleich dieser beiden Werte zeigt eine sehr schnelle Zerstörung des Hydroxylamins in Gegenwart von Iodosobenzol innerhalb von 30 Minuten. Deswegen kann danach nur noch eine geringe Absenkung der Absorption im Laufe der nächsten 24 Stunden beobachtet werden. Die Zersetzung von Hydroxylamin durch den Sauerstoffdonor kann unter anderem durch die Weiteroxidation von intermediär gebildetem Nitroxyl-Anion zu NO stattfinden. Dieses reagiert in sauerstoffhaltiger

wässriger Lösung sofort weiter zum Nitrit. Die Mechanismen der Hydroxylamin-Oxidation sind in Kapitel 2.10.1 ausführlich dargelegt. Unabhängig von der Art der Zerstörung dieser Substanz unter den gegebenen Umständen, durch den Entzug des Analyten kommt es zu einer langsamen Auflösung des Chinonimins, wodurch die Absorptionen ebenfalls absinken.

Die Ergebnisse der reinen Pufferlösung ähneln sehr denen, die nach alleinigem Zusatz von Kupfer(II)-sulfat erhalten wurden. Aufgrund zahlreicher Literaturangaben, in denen die katalytische Wirkung von Kupfer(II)-Ionen auf die Autoxidation von Hydroxylamin in wässriger Lösung betont wird <sup>[9, 80, 82, 86]</sup>, sollte man zumindest eine leichte Absenkung der Absorptionen gegenüber der Pufferlösung erwarten. Da auch in Kombination mit Iodosobenzol die Minderung des grünen Farbproduktes nicht sehr verstärkt wird, kann man eine gegenüber dem Sauerstoffdonor verlangsamte Oxidation durch  $\text{Cu}^{2+}$  annehmen. Dieses liegt unter anderem an dem neutralen pH-Wert der Pufferlösung. Die Kupfer-katalysierte Reaktion ist durch niedrigere pH-Bereiche gehemmt, zum einen weil es immer stärker zur Protonierung des Stickstoffs kommt, die Katalyse funktioniert jedoch nur mit der unprotonierten Form <sup>[82, 111]</sup>. Zum anderen bilden sich die für die katalytische Wirkung notwendigen Kupfer-Hydroxylamin-Komplexe umso schlechter je niedriger der pH-Wert ist <sup>[83]</sup>. Zwar handelt es sich hierbei nicht um ein saures Milieu, jedoch kann die fehlende Basizität bereits für eine Verlangsamung der Oxidations-Reaktion sorgen, sodass die 30 Minuten Inkubationszeit nicht ausreichend sind.

Der schützende Effekt vor dem oxidativen Einfluss des Iodosobenzols kann ebenfalls auf die Ausbildung von Kupfer-Hydroxylamin-Komplexen zurückgeführt werden.

### **2.13.2.2 Vermessung der Oxime**

Die bisherigen Ergebnisse veranschaulichen, dass es einen deutlichen Unterschied macht, ob der Indooxin-Nachweis aus einer Hydroxylamin- oder einer Oxim-Lösung durchgeführt wird. Im Gegensatz zur ersteren, konnte bei den Oxim-Lösungen, außer bei Cyclohexanonoxim, 30 Minuten nach Farbreagenzien-Zugabe keine Farbentwicklung beobachtet werden. Auch CHOX lieferte nach so kurzer Zeit nur eine sehr geringe Grünfärbung. Nur durch mindestens 24-stündiges Inkubieren sowohl der Puffer- als auch der Messlösungen (d.h. nach Zugabe des

Farbreagenzes) konnte Hydroxylamin detektiert werden. Abbildung 36 zeigt, dass sich die Ausbildung des Chinonimins nach Ablauf dieser Zeitspanne sogar noch erhöhen kann. Unter diesen Bedingungen konnte aus einer Hydroxylamin-Lösung kein grünes Farbprodukt mehr gefunden werden. Das Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass die Oxime Hydroxylamin erst generieren müssen und dieser Prozess stark zeitabhängig ist. Außerdem hängt die Geschwindigkeit der Farbreaktion auch von der Menge des vorhandenen Hydroxylamins ab und ist umso geringer, je weniger Analyt sich im System befindet <sup>[91]</sup>. Die aus den Oximen gemessenen Hydroxylamin-Mengen waren mit maximal 2 % tatsächlich um einiges niedriger als die aus der Hydroxylamin-Lösung.

Jedoch belegen die Ergebnisse von Abbildung 36 das Dominieren der Hydroxylamin-Generierung gegenüber dessen Zerstörung durch Oxidation. Auch die Oxidationsempfindlichkeit des Chinonimins lässt die Absorptionen lange Zeit nicht absinken.

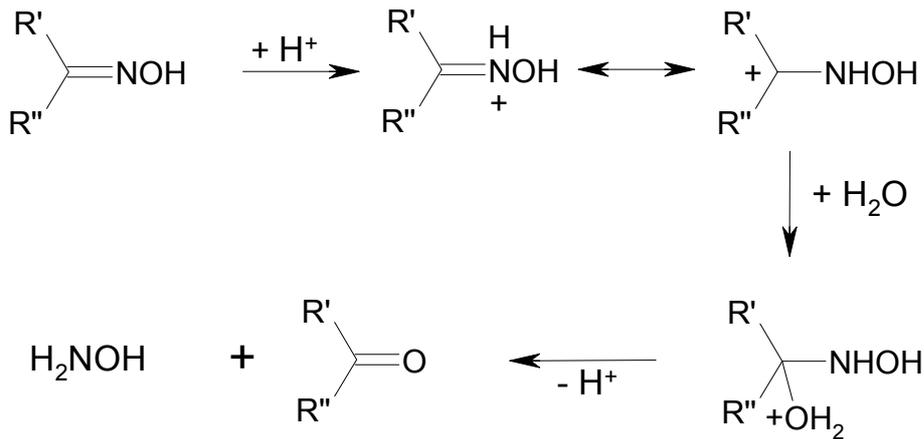
Eine mögliche Begründung für die sehr niedrigen Hydroxylamin-Ausbeuten aus den Oxim-Lösungen ist neben einer geringen Hydrolyse sicher auch in der Instabilität sowohl des Analyten selber als auch des Chinonimins unter den hier vorherrschenden oxidativen Bedingungen zu finden. Aus diesem Grunde stehen vergleichende Aussagen über die Ergebnisse bei dieser Konventionmethode im Vordergrund.

Die Ausbeuten waren unter Zusatz des Iodosobenzols deutlich niedriger als in Abwesenheit des Sauerstoffdonors; außer bei CHOX war gar kein Hydroxylamin nachweisbar. Auch hier ist wieder die Begründung in den beschriebenen Oxidationsempfindlichkeiten zu finden.

Die Unterschiede, die unter der Verwendung der verschiedenen Zusätze in den Ergebnissen bei der Vermessung von Hydroxylamin gefunden wurden (Abb. 37), sind bei der Untersuchung von CHOX nicht in derselben Form aufgetreten (Abb. 35). Zwar wurden bei der Vermessung der reinen Pufferlösung in beiden Fällen die höchsten Werte dieser Serie gefunden. Jedoch führte nur die Zugabe des Oxygenierungssystems zu der Oxim-Lösung zu einer sehr starken Verminderung der Hydroxylamin-Menge. Bei Verwendung der anderen Zusätze bewirkten vermutlich Oxidationsprozesse seitens des Sauerstoffdonors sowie des  $\text{CuSO}_4$  eine schwächere Absenkung der Chinonimin-Menge. Komplexierung des Oxims durch

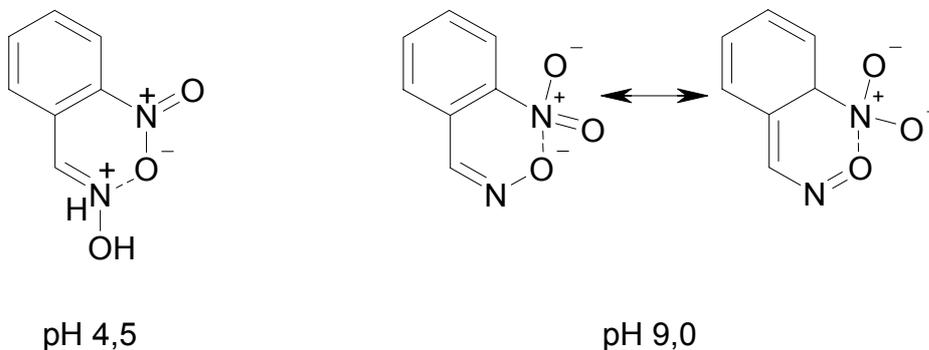
das Porphyrin könnte eine Hydrolyse von CHOX behindert und somit zu verminderter Absorption geführt haben. Auch eine Komplexierung, sowohl des Oxim-Moleküls selbst als auch des intermediär gebildeten Hydroxylamins durch Kupfer(II)-Ionen ist denkbar. Diese Prozesse haben offensichtlich einen etwa gleich stark absenkenden Effekt auf die erhaltene Chinonimin-Menge. Im Gegensatz dazu ist die Farbproduktentwicklung unter Zusatz des Oxygenierungssystem stark vermindert. Hier wurde am wenigsten detektierbares Hydroxylamin gebildet, was zum einen bedeuten kann, dass sich der Analyt sehr schnell unter diesen Bedingungen zersetzt. Hinweise in der Literatur, die von einer erhöhten Oxidation der Substanz in Gegenwart von Fe(V)=O-Spezies berichten, sprechen für diese Annahme [63, 73, 81]. Zum anderen kann es aber auch bedeuten, dass unter Verwendung des Enzym-Imitationssystem gar kein Hydroxylamin entsteht und das hier gefundene lediglich aus einer Nebenreaktion resultiert. Außerdem konnten bei der UV/Vis-Bestimmung nur äquimolare Mengen an Iodosobenzol zugegeben werden und die Menge des Sauerstoffdonors limitiert die Leistungsfähigkeit des Oxygenierungssystem, so dass es neben der porphyrinkatalysierten Reaktion durchaus auch zu einer zur Ausbildung von Hydroxylamin führenden Hydrolyse des Oxims kommen kann.

Nicht alle Oxime hydrolysieren unter den hier gewählten Bedingungen in gleichem Maße, manche sogar gar nicht. Dies zeigen die Ergebnisse der UV/Vis-Bestimmungen der Substanzen bei verschiedenen pH-Werten in Abbildung 33 bzw. 34. Dabei scheint das Ausmaß dieser Hydrolyse mit der Größe des Moleküls und der Art der Substituenten am Aromaten zu korrelieren, denn die höchsten Werte wurden bei den im Vergleich zu den anderen relativ kleinen Vertretern CHOX und BOX gefunden. DBOX liegt mit der Hydroxylamin-Bildung im Mittelfeld. Die Substanz ist zwar aufgrund der zwei Substituenten am Benzolring größer als CBOX und NBOX, jedoch handelt es sich bei den beiden Methoxy-Gruppen um elektronenschiebende Reste. Diese erhöhen die Basizität des Stickstoffes. Hierdurch wird auch die Hydrolyse zu Hydroxylamin erleichtert, da sich hier initial ein Proton an den basischen Stickstoff anlagern muss:



**Abbildung 47:** Saure Hydrolyse eines Oxims unter Ausbildung von Hydroxylamin.

Die elektronenziehenden Reste an CBOX und NBOX dagegen bewirken eine verminderte Basizität am Stickstoff und somit eine gebremste Hydrolyse. Dabei können stabilisierende intramolekulare Effekte im NBOX-Molekül für eine noch stärker verhinderte Hydroxylamin-Bildung verantwortlich sein:



**Abbildung 48:** Stabilisierende intramolekulare Effekte bei NBOX im sauren und basischem Milieu: Neben einer Ringbildung kommt es bei pH 9,0 zusätzlich zu einem ausgeprägten Push-Pull-Effekt, welches eine Weiterreaktion der Substanz erschwert.

Das beschriebene unterschiedliche Hydrolyse-Verhalten zeigte sich auch bei den Vorproben zu diesem Versuch, bei denen die Oxime in verdünnter Salzsäure inkubiert und dann nach Zugabe der Farbreagenzien vermessen wurden. Eine Grünfärbung trat umso später und schwächer auf, je größer das Molekül war, und auch elektronenziehende Reste verzögerten und verminderten die Ausbildung des Farbproduktes.

Interessant sind diese Ergebnisse auch auf die Vermutung hin, die hämotoxische Wirkung der Oxime sei auf deren Hydrolyse zu Hydroxylamin zurückzuführen <sup>[42]</sup>. Von den hier untersuchten Vertretern konnte bei BPOX und FLOX zumindest mit diesem Versuch bei pH 7,4 keine Hydroxylamin-Bildung beobachtet werden.

Wie erwartet hydrolysierten alle untersuchten Oxime im sauren Milieu am stärksten, und die Menge des gebildeten Hydroxylamins sank mit zunehmendem pH-Wert. Sollte ein Oxim NO über verschiedene Mechanismen parallel freisetzen, was denkbar ist, so wäre der Weg über intermediär gebildetes Hydroxylamin im sauren bevorzugt.

### **2.13.3 Angeli`s Salz**

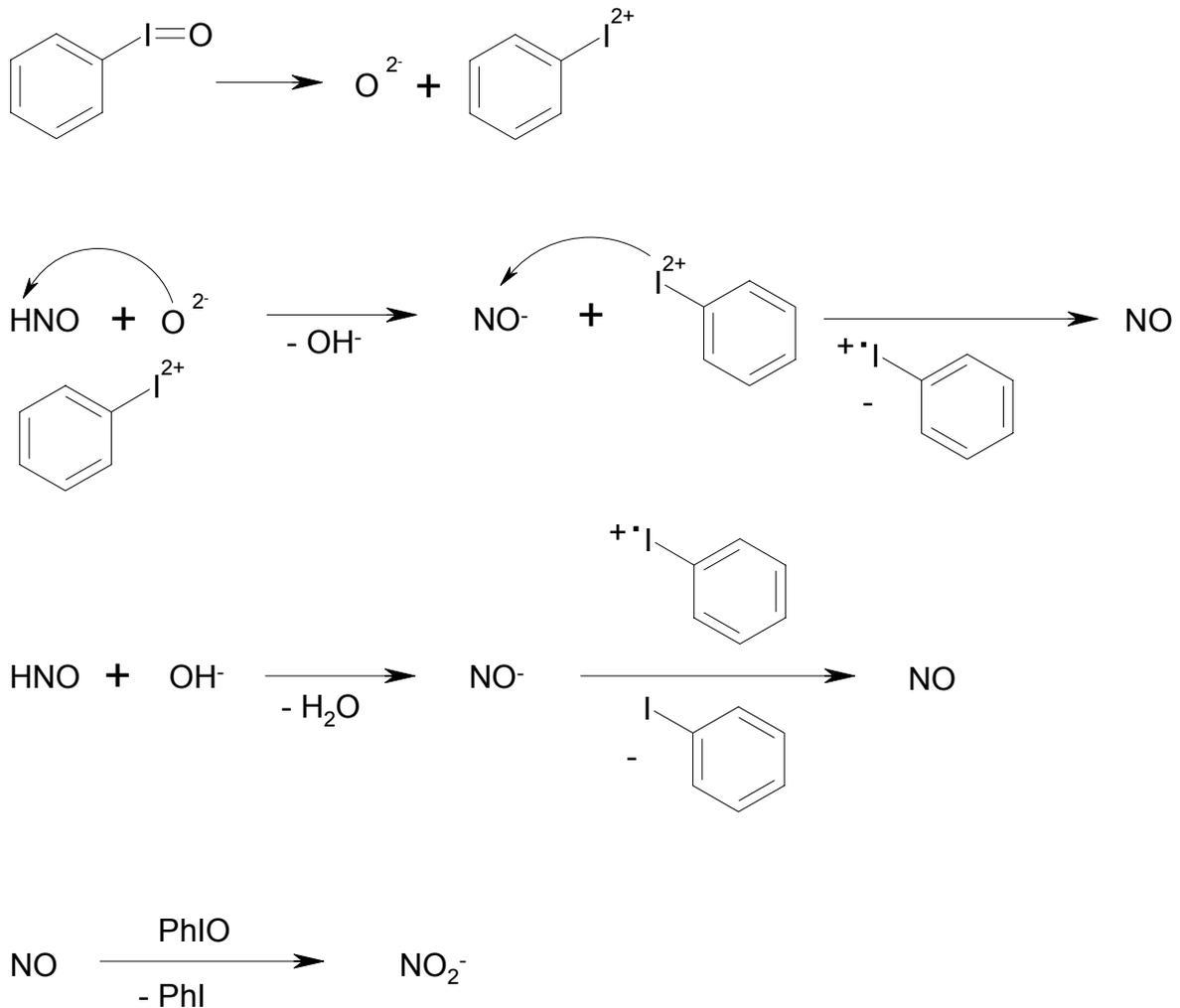
#### **2.13.3.1 Chemilumineszenzbestimmungen**

Ein wichtiges Ziel der Chemilumineszenzmessung war die Quantifizierung der freigesetzten NO- und Nitrit-Mengen aus Angeli`s Salz im physiologischen Milieu, da hierzu keine konkreten Literaturangaben zu finden waren. In der folgenden Tabelle sind darum die Ergebnisse gezeigt. Die Werte sind dabei in Mol angegeben und beziehen sich auf 1 mol eingesetzter Substanz:

Puffer und Zusätze	NO [mol]	Nitrit [mol]
pH 7,4	0,64	0,84
pH 7,4 + CuSO <sub>4</sub>	0,98	0,52
pH 7,4 + K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	1,03	0,69
pH 7,4 + FeTPPCI	0,88	0,71
pH 7,4 + FeTPPCI + CuSO <sub>4</sub>	0,87	0,47
pH 7,4 + FeTPPCI + K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	0,91	0,47
pH 7,4 + PhIO	0,15	1,90
pH 7,4 + PhIO + CuSO <sub>4</sub>	0,18	1,86
pH 7,4 + PhIO + K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	0,26	1,13
pH 7,4 + PhIO + FeTPPCI	0,20	1,80
pH 7,4 + PhIO + FeTPPCI + CuSO <sub>4</sub>	0,17	1,86
pH 7,4 + PhIO + FeTPPCI + K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	0,26	1,25

**Tabelle 3:** *Ergebnisse der Chemilumineszenzbestimmungen von Angeli's Salz bezogen auf 1 mol eingesetzter Substanz.*

Unter Verwendung des Sauerstoffdonors Iodosobenzol wird im Verhältnis zu NO mehr Nitrit gebildet; ohne Iodosobenzol-Zugabe ist es andersherum. Diesen Sachverhalt kann man zum einen darauf zurückführen, dass unter Verwendung des Sauerstoffdonors oder des Oxygenierungssystems zumindest ein Teil des gebildeten NO zu Nitrit oxidiert worden ist. Zum anderen kann das veränderte Freisetzungsverhältnis NO zu NO<sub>2</sub><sup>-</sup> auch auf eine vermehrte Nitrit-Freisetzung aus der Muttersubstanz unter Beteiligung des Sauerstoffdonors zurückgeführt werden (s. Abb. 49).



**Abbildung 49:** Postulierter Mechanismus der Nitrit-Bildung über NO als Intermediat aus Angeli's Salz in Gegenwart von Iodosobenzol. Dabei reagiert zunächst 1 Mol PhIO mit 2 Mol HNO unter der Freisetzung von 2 Mol NO. Das gebildete NO wird durch ein weiteres Molekül des Sauerstoffdonors zu Nitrit oxidiert.

Für diesen Mechanismus sprechen 2 Mol Stickstoffspezies (NO + Nitrit), die pro mol Angeli's Salz bei fast allen Kombinationen unter Verwendung von PhIO freigesetzt wurden. Der postulierte Reaktionsweg führt ebenfalls zur vollständigen Erschöpfung der Ausgangssubstanz. Die Ausnahme bei der Nitrit-Freisetzung unter Sauerstoffdonor-Zusatz besteht bei Kaliumhexacyanoferrat(III), denn dort wurden weniger als 200 % erreicht. Eine Begründung hierfür könnte ein erhöhter Verbrauch des Iodosobenzols durch den Eisen(II)-Komplex sein. Dieser wurde während der HNO-Oxidation unter Verwendung von  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  gebildet [s. Gleichung (58, 59)] und ist leichter oxidierbar als Kupfer(I)-Ionen.



Dadurch verbleibt weniger Sauerstoffdonor, um den Mechanismus in Abbildung 49 durch zu führen. Ein Hinweis darauf ist die erhöhte NO-Bildung im Verhältnis zu den anderen verwendeten Kombinationen.

Es wäre auch denkbar, dass die Nitrit-Bildung in Gegenwart des Iodosobenzols nicht nur über die intermediäre NO-Bildung abläuft, sondern auch vom Nitroxyl direkt ausgehen kann, da durch den Sauerstoffdonor zwei Elektronen übertragen werden.

Eine Oxidation des NO durch Iodosobenzol oder durch das Oxygenierungssystem bis zum Nitrat findet unter diesen Bedingungen allerdings nicht statt. Alle Messungen dieser Stickstoffspezies führten zu einem negativen Ergebnis. Nitrat ist das Isomerisierungsprodukt von Peroxynitrit im physiologischen Milieu. Das negative Ergebnis kann darum als weiterer Hinweis gewertet werden, dass  $\text{ONOO}^-$  aus Angeli's Salz bei diesem pH-Wert nicht gebildet wird.

Die Theorie, dass Nitrit zusammen mit  $\text{HN}_2\text{O}_3^-$  oder einer aus HNO resultierenden Spezies zu einer NO-Freisetzung führt, wurde nur für pH 3 bis 4 beschrieben <sup>[98, 102]</sup> und scheint im physiologischen Milieu keine Rolle zu spielen. Dafür liegt das  $\text{NO-NO}_2^-$ -Verhältnis zu sehr auf der Seite des Letzteren.

Des Weiteren entsprach die Steigerung der NO-Ausbeute aus Angeli's Salz in Gegenwart von Kaliumhexacyanoferrat(III) und Kupfer(II)-sulfat den Literatur-Angaben, in denen von einer katalytischen Wirkung dieser Salze auf die NO-Bildung aus Nitroxyl berichtet wird <sup>[8, 96, 97]</sup>. Dabei ist das Eisen dem Kupfer leicht überlegen. Die geringe Veränderung der NO-Werte nach Porphyrin-Zusatz im PhIO-freien System gegenüber der reinen Pufferlösung kann mit der Ausbildung relativ stabiler Porphyrin-Nitroso-Komplexe erklärt werden.

Die zusätzliche Gabe eines Porphyrins zu  $\text{CuSO}_4$  bzw.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  behindert etwaige Weiterreaktionen des HNO durch die Ausbildung relativ stabiler Nitroso-Komplexe. Interessanterweise hat die Verwendung des Oxygenierungsystems keinen stärkeren Einfluss auf die Weiteroxidation von NO zu Nitrit als die alleinige Verwendung der oxidativen Zusätze (PhIO, Metallsalze).

### 2.13.3.2 Fluorimetrie

Die Zersetzung von Angeli's Salz verläuft in sauerstoffhaltiger Lösung gemäß folgender Gleichung <sup>[8]</sup>:



Die Ergebnisse der fluorimetrischen Untersuchung sprechen aus folgenden Gründen für eine Beteiligung von molekularem Sauerstoff an der Oxidation des Indikators Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF) durch Angeli's Salz:

1. Bei den anaeroben Experimenten steigen die Fluoreszenzintensitäten bei kürzerer Inkubations-Zeit nach Beginn der Vermessung und somit nach Sauerstoffzufuhr noch stark an.
2. Die erhaltenen Intensitäten fielen sehr viel höher aus wenn Sauerstoff schon während der Inkubations-Zeit vorhanden war.

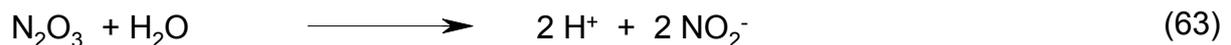
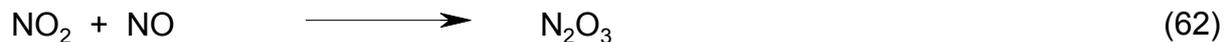
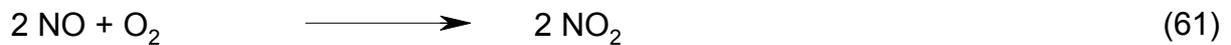
Des Weiteren bestätigen die erniedrigten Ergebnisse nach Zugabe des HNO-Fängers Kupfer(II)-sulfat die Annahme, dass Nitroxyl das Intermediat der Gleichung (60) sein kann.

Über die Art des gebildeten Oxidanz aus Gleichung (60) kann man anhand der hier gewonnen Daten lediglich sagen, dass es aus Angeli's Salz direkt gebildet wird und äußerst instabil in wässriger Lösung ist. Dieses wird deutlich wenn man die Unterschiede der einzelnen Intensitäten in Abbildung 46 betrachtet. Kürzere Inkubationszeiten und längeres Aussetzen der Analysen-Lösung mit Sauerstoff während der Zersetzungsreaktion bewirkten größere Unterschiede in der

Fluoreszenzintensität. Die Vorstufe der Substanz, die zu der Oxidation des DCDHFs führt, ist ebenfalls recht instabil, denn sie zersetzt sich während der Inkubation.

Manche Autoren vermuten eine Oxidation des DCDHFs direkt durch Nitroxyl <sup>[107]</sup>. Dagegen spricht jedoch, dass an der Fluoreszenzentwicklung Luftsauerstoff beteiligt ist.

Eine weitere Theorie besagt, dass aus NO gebildetes Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) den Indikator oxidiert <sup>[109]</sup>. NO kann unter aeroben Bedingungen in wässriger Lösung intermediär in Stickstoffdioxid umgewandelt werden. Dieses Gas zeichnet sich unter solchen Bedingungen durch eine extreme Kurzlebigkeit aus, denn es reagiert sofort weiter zu Nitrit:



Allerdings müsste in diesem Fall die Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat ansteigen, da dieses die NO- und somit die NO<sub>2</sub>-Bildung aus Nitroxyl katalysiert. Die sinkende Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Kupfer(II)-Salzes spricht also gegen diese Theorie. Jedoch erhärtet sich durch die hier gewonnenen Ergebnisse der Verdacht, dass Nitroxyl das Intermediat ist, woraus sich unter Sauerstoffeinfluss ein starkes Oxidanz bildet. HNO kann unter anaeroben Bedingungen leicht dimerisieren [s. Gleichung (51)] und somit „verbraucht“ werden, wie es in Abbildung 46 beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der Chemilumineszenzmessungen haben gezeigt, dass die NO-Freisetzung von 0,64 mol pro mol eingesetztem Angeli's Salz bei pH 7,4 durch Zusatz von oxidativ wirksamen Metallsalzen bis auf 1 Mol erhöht werden kann. Nicht wirksam ist dabei der Zusatz des Oxygenierungssystems, welches lediglich zu einer stark erhöhten Nitrit-Bildung führt und die NO-Freisetzung sogar um das 4-fache senkt. Ob sich jedoch diese Ergebnisse auf biologische Systeme übertragen lassen ist fraglich. Zum Beispiel bildet Cytochrom c durch die Reaktion mit HNO sehr instabile Nitroso-Häm-Protein-Komplexe, während die Produkte der synthetischen Porphyrine und Nitroxyl recht stabile Komplexe darstellen.

Einige kürzlich aufgestellte Thesen über die Zersetzung von Angeli's Salz unter physiologischen Bedingungen konnten mit dieser Versuchsreihe bestätigt werden:

1. Angeli's Salz bildet in wässriger sauerstoffhaltiger Lösung bei pH 7,4 unter Mitwirkung von molekularem Sauerstoff ein relativ starkes Oxidanz.
2. Der Verdacht, dass Nitroxyl als Intermediat dieser Oxidanzbildung auftritt, konnte bestärkt werden.
3. Die Bildung von Nitrat, das Isomerisierungsprodukt von Peroxynitrit in physiologischem Milieu aus Angeli's Salz, wurde nicht beobachtet.

Nicht bestätigt werden konnte die Annahme, das Nitrit an der NO-Bildung bei pH 7,4 beteiligt ist und sogar katalytische Wirkungen zeigt. Ebenfalls scheint keine direkte Oxidationswirkung des gebildeten Nitroxyl auf den Fluoreszenzindikator Dichlorodihydrofluorescein (DCDHF) statt zu finden.

## **2.13.4 Chemilumineszenzbestimmungen: Hydroxylamin, Oxime**

### **2.13.4.1 Hydroxylamin**

#### *Einfluss von Kupfer(II)-Ionen*

Die von vielen Autoren beschriebene katalytische Wirkung von Kupfer(II)-Ionen auf den Zerfall von Hydroxylamin <sup>[9, 80, 82, 83, 86]</sup> konnte unter den Bedingungen der Chemilumineszenzbestimmung bestätigt werden, da unter Verwendung dieses Salzes in Gegenwart des Sauerstoffdonors die höchsten Werte gefunden wurden (Abb. 38). Selbst nach der alleinigen Gabe von Kupfer(II)-sulfat konnte eine geringe Menge NO gemessen werden. Dieses wird ebenfalls in der Literatur erwähnt und gelang im Rahmen dieser Arbeit nur bei CHOX.

Die hohe NO-Ausbeute, die in Gegenwart des Oxygenierungssystems zusammen mit Kupfer(II)-sulfat aus Hydroxylamin erhalten wurde, weicht ab von den Ergebnissen aus Angeli's Salz unter vergleichbaren Bedingungen (Abb. 43). Im Gegensatz zu

dem Salz wurde hier nicht ein Großteil zu Nitrit oxidiert. Dafür könnten Unterschiede in den Freisetzungsmechanismen der beiden Substanzen verantwortlich sein. Während Angeli's Salz als spontaner NO-Donor bekannt ist, setzt Hydroxylamin NO lediglich unter oxidativen Bedingungen und wahrscheinlich nur unter intermediärer Nitroxyl-Bildung frei. Die verschiedenen Elektronenzustände des Nitroxyls und die daraus resultierenden unterschiedlichen chemischen Eigenschaften <sup>[99]</sup> könnten ebenfalls dabei eine Rolle spielen.

Diese Ergebnisse geben erneut Grund zu der Annahme (s. 2.13.3), dass eine Weiteroxidation zu Nitrit nicht von NO sondern von Nitroxyl ausgeht, da sich Angeli's Salz und Hydroxylamin lediglich in der Art des gebildeten HNO unterscheiden. Iodosobenzol liegt wie fast alle Moleküle im Singulett-Zustand vor und wird darum mit <sup>1</sup>HNO besser reagieren können als <sup>3</sup>HNO bzw. <sup>3</sup>NOH. Was ebenfalls dafür spricht, ist die Tatsache, dass die Oxidation von NO<sup>-</sup> zu NO<sub>2</sub><sup>-</sup> eine Zwei-Elektronen-Oxidation darstellt. Das entspricht der Elektronenmenge, die auch von Iodosobenzol übertragen wird.

#### *Einfluss der eingesetzten Konzentration bei der Nitrit-Messung*

Die Abhängigkeit der Nitrit-Freisetzung von der eingesetzten Probenkonzentration lässt sich auch hier mit dem Vorhandensein eines geschlossenen Systems und den bei der Dünnschichtchromatographie bereits diskutierten Folgen erklären. Die Ausbildung eines chemischen Gleichgewichtes scheint umso eher erreicht zu sein desto höher die eingesetzte Menge an Hydroxylamin ist. Dadurch sinken die durch die Prozentangaben relativierten Ergebnisse. Aus diesem Grunde sind auch für die Nitrit-Freisetzung nur vergleichende Aussagen zu treffen. Es ist jedoch damit zu rechnen, dass die Ergebnisse der niedrigsten eingesetzten Hydroxylamin-Konzentration dem wahren Werten am nächsten kommen, denn hier wurden die höchsten Ausbeuten gefunden.

Des Weiteren machte Amarger die Beobachtung <sup>[112]</sup>, dass die Nitrit-Produktion aus Hydroxylamin bzw. Oximen durch *Pseudomonas aeruginosa* konzentrationsabhängig ablief. Dabei war die NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung konzentrationsbegrenzt und vollzog sich umso weniger, je mehr Hydroxylamin bzw. Oxim im Wachstumsmedium vorhanden war. Dies ist ebenfalls eine mögliche Erklärung für das Konzentrationsphänomen bei Hydroxylamin und FLOX, bei dessen Nitrit-Messung ähnliches beobachtet wurde.

Trotz dieses Fehlers, der einen Vergleich mit den NO- Ergebnissen erschwert, sind einige Tendenzen erkennbar. Besonders ausgeprägt sind diese unter Verwendung von Kupfer(II)-sulfat. Auffällig ist der sehr niedrige Nitrit-Wert unter Verwendung des Oxygenierungssystem und  $\text{CuSO}_4$ . Dieser rührt von der mit 98 % sehr hohen NO-Ausbeute her, die unter den gleichen Bedingungen erhalten wurde, da die insgesamt freigesetzte Stickstoffspezies-Menge aus Hydroxylamin 100 % nicht überschreiten kann. Das gleiche erklärt auch die niedrige Nitrit-Ausbeute unter der Verwendung von Kupfer und dem Sauerstoffdonor. Hier wurde ebenfalls mit 85 % ein recht hoher NO-Wert gemessen.

Man kann davon ausgehen, dass durch eine Erniedrigung der eingesetzten Hydroxylamin-Konzentration unter 0,5 mmol/l eine weitere Erhöhung der Nitrit-Menge erzielt wird, jedoch können diese die erzielten NO-Mengen nicht übertreffen. Dies würde nämlich Gesamt-Stickstoffmengen von über 100 % ergeben.

#### *Reduktion von NO durch Hydroxylamin*

Es ist nicht davon auszugehen, dass eine Reduktion des NO durch Hydroxylamin zu Stickstoff und Distickstoffoxid während der NO-Messung stattgefunden hat <sup>[90]</sup>, da Stickstoffmonoxid durch das Trägergas Argon sofort zum Detektor geleitet und somit dem System entzogen wird.

Jedoch kann dieses durchaus bei der Nitrit-Messung geschehen sein, denn die Freisetzungsreaktion wurde hier in einem externen Reaktionsgefäß durchgeführt. Da die durch diese Reduktion entstandenen Gase [s. 2.10.1, Gleichung (49)] von der Chemilumineszenzmethode nicht erfasst werden können, wäre dieses eine mögliche Erklärung, warum die Summe der NO- und Nitrit-Messung nicht immer die erwarteten 100 % Stickstoffspezies erreicht.

Auch die Bildung von unter diesen Umständen nicht erfassbarem Peroxynitrit wäre denkbar.

#### *Nitrat-Bildung*

Eine Weiteroxidation von Nitrit zu Nitrat wäre unter Verwendung des Sauerstoffdonors oder des Oxygenierungssystems denkbar jedoch sprechen Ergebnisse früherer Arbeiten dagegen. Es konnte nämlich weder unter der

Verwendung des Oxygenierungssystems noch Kupfer(II)-sulfat bei pH 7,4 Nitrat gefunden werden <sup>[73]</sup>. Des Weiteren ist in der Literatur nur von einer geringen Nitrat-Menge aus Hydroxylamin die Rede, das sich obendrein nur sehr langsam ausbildete und durch die Isomerisierung von zwischenzeitlich gebildetem Peroxynitrit herrührte (s.1.2.1 und 2.10.1):



Unter oxidativen Bedingungen und unter Zusatz von Kupfer(II)-sulfat wurde gar kein Nitrat mehr gefunden <sup>[9, 80]</sup>.

Des Weiteren war bei der Nitrat-Messung aus Angeli's Salz ebenfalls keine Oxidation von Nitrit zu Nitrat feststellbar, denn alle Messungen erzielten ein negatives Ergebnis.

### *Einfluss des Oxygenierungssystems*

Entgegen der Angaben in der Literatur und der Ergebnisse früherer Arbeiten <sup>[63, 73, 81]</sup>, wurde bei diesem Versuch weder die NO- noch die Nitrit-Menge durch Porphyrin-Anwesenheit erhöht.

Lediglich der Zusatz von Kupfer(II)-sulfat bewirkt eine Erhöhung der NO-Freisetzung, die in Gegenwart des MnTPPCI sogar noch höher ist als unter der alleinigen Kombination mit Iodosobenzol. Dies erklärt sich durch die erhöhte Menge an vorhandenen Kupfer(II)-Ionen. Diese müssen nämlich nach durchgeführter Oxidation des Hydroxylamins oder auch des intermediär gebildeten Nitroxyls, wobei Kupfer(I)-Ionen entstanden sind, wieder regeneriert werden. Dies vollzieht sich in Gegenwart des Oxygenierungssystem leichter als unter alleiniger Verwendung von Iodosobenzol. Literaturberichten zufolge wird die Menge an Distickstoffoxid durch erhöhte  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration gesteigert <sup>[9]</sup>. Da Nitroxyl die Vorstufe von Lachgas darstellt [s. 2.10.1, Gleichung (36)], erhöht sich auch die Menge an  $\text{NO}^-$ , aus dessen Oxidation die gesteigerten NO-Ausbeuten resultieren.

Eine fehlende Porphyrin-katalysierte NO- und Nitrit-Freisetzung würde bei der UV/Vis-Bestimmung die erniedrigten Hydroxylamin-Werte aus CHOX unter Verwendung des Oxygenierungssystem (s. Abb. 35) in sofern erklären, als dass die

verminderten Werte nicht durch eine verstärkte Weiterreaktion des gebildeten Hydroxylamins herrühren. Eher scheint eine generell verminderte Hydrolyse unter diesen Umständen dazu geführt zu haben.

Die Ergebnisse dieser Chemilumineszenzbestimmungen zeigen, dass Hydroxylamin im physiologischen Milieu unter allen hier verwendeten Zusätzen immer mehr NO als Nitrit freisetzt, besonders unter Verwendung von Kupfer(II)-Ionen.

#### **2.13.4.2 Oxime**

Obwohl die NO-Messungen der sieben hier untersuchten Oxime z.T. recht unterschiedlich ausfallen, existieren dennoch Gemeinsamkeiten, die sich auf die Molekülstruktur zurückführen lassen.

##### *NO-Freisetzung*

##### Einfluss des Sauerstoffdonors

Die NO-Freisetzung aus Oximen unter Einfluss des Iodosobenzols kann wie folgt ablaufen:



Innerhalb dieser Reaktion würde es zu einer intermediären Bildung von Nitroxyl-Anionen kommen. Dieses Zwischenprodukt wird von vielen Autoren auch für die NO-Freisetzung aus Hydroxylamin postuliert [9, 80, 86]. Einige Autoren gehen bei der Stickstoffmonoxid-Bildung aus diversen Hydroxyimino-Verbindungen von letzterem als Zwischenprodukt aus. Für CHOX konnte es als Intermediat der Stickstoffmonoxid-Bildung identifiziert werden [42, 73, 81]. Es ist also sowohl in dem in Abbildung 50 dargestellten Mechanismus als auch bei der NO-Freisetzung über das Hydrolyse-Produkt Hydroxylamin von der intermediären Bildung des Nitroxyl-Anions auszugehen.

Die möglichen Weiterreaktionen des  $\text{NO}^-$  wurden in 1.2.1 und 2.12.1 bereits dargestellt. Die für diese Diskussion wichtigsten Folgereaktionen sind zum einen die Dimerisierung unter Bildung von Distickstoffoxid [s. 2.12.1, Gleichung (51)] und die Reaktion unter oxidativen Bedingungen zu Peroxynitrit [s. 2.12.1, Gleichung (53)]. Beide Stickstoffspezies können nicht von der hier verwendeten Chemilumineszenzmethode erfasst werden. Somit führt deren Bildung sowohl für die NO- als auch für die Nitrit-Messung zu einer Absenkung der Ergebnisse.

Die Ergebnisse des Hydroxylamin-Nachweises aus den hier untersuchten Oximen zeigten, dass die Neigung zur Hydrolyse bei den einzelnen Oximen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Es ist darum anzunehmen, dass Oxime wie CHOX und BOX, die relativ viel Hydroxylamin unter den Bedingungen der Chemilumineszenzmessungen bilden, NO auch über dieses Hydrolyse-Produkt freisetzen. Während andere Vertreter, wie z. B. FLOX oder BPOX, die unter den gewählten Bedingungen gar nicht hydrolysieren, Stickstoffmonoxid eher über den in Abbildung 50 dargestellten Mechanismus bilden. Dabei ist nicht auszuschließen, dass beide Freisetzungsreaktionen parallel ablaufen.

Die durch elektronenschiebende Reste gesteigerte Oxidierbarkeit der Oxime (s. 2.1) wird durch die im Vergleich zu den anderen Benzaldehydoxim-Derivaten leicht erhöhte NO-Freisetzung aus DBOX deutlich.

Eine Weiteroxidation von NO zu Nitrit unter Einfluss von Iodosobenzol, wie sie bei Angeli's Salz beobachtet wurde, ist möglich (s. Abb. 49). Jedoch ist dies schwer nachzuweisen, da Oxime im Gegensatz zu dem Salz nur unter oxidativen

Bedingungen Stickstoffmonoxid frei setzen und somit der direkte Vergleich nicht erfolgen kann.

### Einfluss des pH-Wertes

Alle hier untersuchten Oxime zeigen im Basischen eine verminderte NO-Freisetzung. Dieses lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen:

1. Die Aktivität der Hydrolyse zu Hydroxylamin ist im Basischen am geringsten, so dass der über diesen Mechanismus gebildete NO-Anteil stark zurückgedrängt wird. Die hier untersuchten Oxime sind ohne weitere Zusätze in höheren pH-Bereichen stabiler.
2. Im Basischen findet eine verstärkte Reaktion von Nitroxyl-Anionen und Hydroxylamin zu Stickstoff statt. Letzteres kann vom NO-Analyzer nicht erfasst werden.
3. Da sich die Nitrit-Freisetzung aus Hydroxylamin mit steigendem pH-Wert erhöht, kann von einer verminderten Nitroxyl- und somit auch von einer verminderten NO-Bildung ausgegangen werden.
4. Die Bildung von Peroxynitrit aus  $\text{NO}^-$  ist im alkalischen Milieu begünstigt. Auch Peroxynitrit kann nicht mit der Chemilumineszenzmethode erfasst werden.

Auch im Sauren zeigen DBOX, CBOX, NBOX und CHOX eine gegenüber pH 7,4 herabgesetzte NO-Freisetzung. Diese lässt sich hauptsächlich durch die vermehrte Reaktionstendenz von HNO im sauren Milieu zu Distickstoffoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) erklären, da letzteres von der Chemilumineszenzmethode nicht erfasst werden kann. Gerade in diesem pH-Bereich spielt die Freisetzungsgeschwindigkeit eine große Rolle, da die  $\text{N}_2\text{O}$ -Bildung sehr schnell stattfindet und somit eine starke Konkurrenzreaktion zur NO-Generierung darstellt. Diese Geschwindigkeit kann jedoch bei den Benzaldehydoxim-Derivaten durch Reste in ortho-Position behindert sein, wie sich bei der Betrachtung der Ergebnisse von BOX zeigt.

Im Neutralen sind diese Neben- und Folgereaktionen nicht so ausgeprägt bzw. zurückgedrängt und spielen darum eine geringere Rolle. Aus diesem Grund findet

man bei fast allen in dieser Studie untersuchten Oximen die höchsten NO-Ausbeuten.

In einem Milieu ohne weitere Zusätze gibt ein rascher Zerfall weniger Zeit für Neben- oder Folgereaktionen (s. oben), die zu nicht erfassbaren Produkten führen. Darum ist unter diesen Bedingungen eine rasche NO-Freisetzungsgeschwindigkeit für hohe Ergebnisse notwendig.

Man kann das pH-abhängige NO-Freisetzungsprofil der sieben untersuchten Oxime generell in drei Gruppen einteilen:

1. Die NO-Freisetzung ist im sauren Milieu am höchsten und sinkt mit steigendem pH-Wert. Dazu gehören BOX, FLOX und BPOX.
2. Die NO-Freisetzung ist am höchsten bei pH 7,4 und am geringsten bei pH 4,5. Dazu gehören CHOX und DBOX.
3. Die NO-Freisetzung ist am höchsten bei pH 7,4 und am geringsten bei pH 9,0. Dazu gehören CBOX und NBOX.

Da die Hydrolyse von Oximen zu Hydroxylamin am stärksten im sauren Milieu abläuft, wäre eine steigende NO-Freisetzung bei sinkendem pH-Wert gemäß der ersten Gruppe für alle untersuchten Vertreter zu erwarten <sup>[73]</sup>. Dieses traf jedoch nur auf die drei Oxime der genannten Gruppe zu (BOX, FLOX, BPOX). Allerdings konnte nur bei BOX Hydroxylamin unter den Bedingungen der NO-Messung gefunden werden, weswegen der Freisetzungsweg über eine vor geschaltete Hydrolyse für dieses Oxim angenommen werden kann. Für die beiden anderen Vertreter ist Hydroxylamin somit nicht als Intermediat der NO-Bildung anzusehen, sondern eher der in Abbildung 50 dargestellte Mechanismus. Hier ist möglicherweise eine im Sauren verstärkte Zersetzung für die steigende NO-Bildung bei sinkendem pH-Wert verantwortlich. Diese kann auf eine geringe sterische Hinderung durch den symmetrischen Molekülaufbau zurückgeführt werden.

Bei den Oximen der zweiten Gruppe ist ebenfalls eine NO-Freisetzung über Hydroxylamin möglich. DBOX sollte aufgrund seiner zwei elektronenschiebenden Reste für eine einleitende Protonierung am Stickstoff empfänglicher sein, als z.B.

BOX. Allerdings wird der Angriff eines Protons am Stickstoff aus sterischen Gründen durch die relativ große Methoxy-Gruppe in ortho-Stellung bei DBOX für eine gegenüber BOX behinderte Hydroxylamin-Bildung verantwortlich sein.

Für CHOX hingegen wurde die NO-Bildung über eine Hydrolyse bereits gezeigt <sup>[42]</sup>. Die NO-Freisetzung über die intermediäre Bildung von Hydroxylamin spielt lediglich bei pH 7,4 eine wichtigere Rolle, da bei pH 4,5 zwar die stärkste Hydrolyse jedoch die niedrigste NO-Bildung verzeichnet wurde. Hydroxylamin setzt selber im Neutralen am meisten NO frei, da in den anderen beiden pH-Bereichen Neben- und Folgereaktionen stärker hervortreten und die Ausbeuten senken (s. oben).

Im Sauren wird im Falle von CHOX wie bei FLOX und BPOX der NO-Freisetzungsmechanismus aus Abbildung 50 eher zum tragen kommen. Dies ist auch ein Ausdruck der allgemein schlechteren Verseifbarkeit cycloaliphatischer Ketoxime gegenüber Aldoximen und anderen Ketoximen <sup>[46]</sup>. Aus diesem Grund setzt CHOX allgemein ohne Zusätze deutlich weniger NO frei als die übrigen hier untersuchten Vertreter.

Dass die NO-Bildung im Basischen gegenüber dem Sauren erhöht ist, lässt sich durch eine verstärkte Bildung von Iminoxy-Radikalen durch Deprotonierung erklären <sup>[62]</sup>.

Die zu der dritten Gruppe gehörenden Oxime CBOX und NBOX besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal eine elektronenziehende Gruppe in ortho-Stellung. Die Hydrolyse ist darum bei beiden Vertretern behindert und spielt bei der NO-Freisetzung eine eher untergeordnete Rolle. Dies bestätigen auch die Ergebnisse des Hydroxylamin-Nachweises. Wären Deprotonierungsprozesse verantwortlich für die NO-Bildung, wie es in einigen Literaturquellen <sup>[52, 62]</sup> unter anderem für die NO-Biosynthese aus NOHA vorgeschlagen wird, so sollten hier, insbesondere bei pH 9,0, erhöhte Ausbeuten beobachtet werden. Denn eine Deprotonierung wäre durch elektronenziehende Reste gefördert. Da dieses nicht der Fall ist, kann die Annahme für diese Vertreter nicht bestätigt werden. Aufgrund relativ langsamer Zersetzung durch sterische Hinderung seitens der Reste in ortho-Stellung sind auch hier vermehrt Neben- und Folgereaktionen denkbar (s. oben).

Bei NBOX werden auch stabilisierende, intramolekulare Effekte im sauren und basischen Milieu zu erniedrigten Ergebnissen geführt haben (s Abb. 48). Dieses drückt sich in den stärker abgesenkten NO-Ausbeuten gegenüber CBOX bei pH 4,5

und 9,0 aus. Negative Ergebnisse bei der UV/Vis-Spektroskopischen Untersuchung von NBOX bekräftigen diese Theorie.

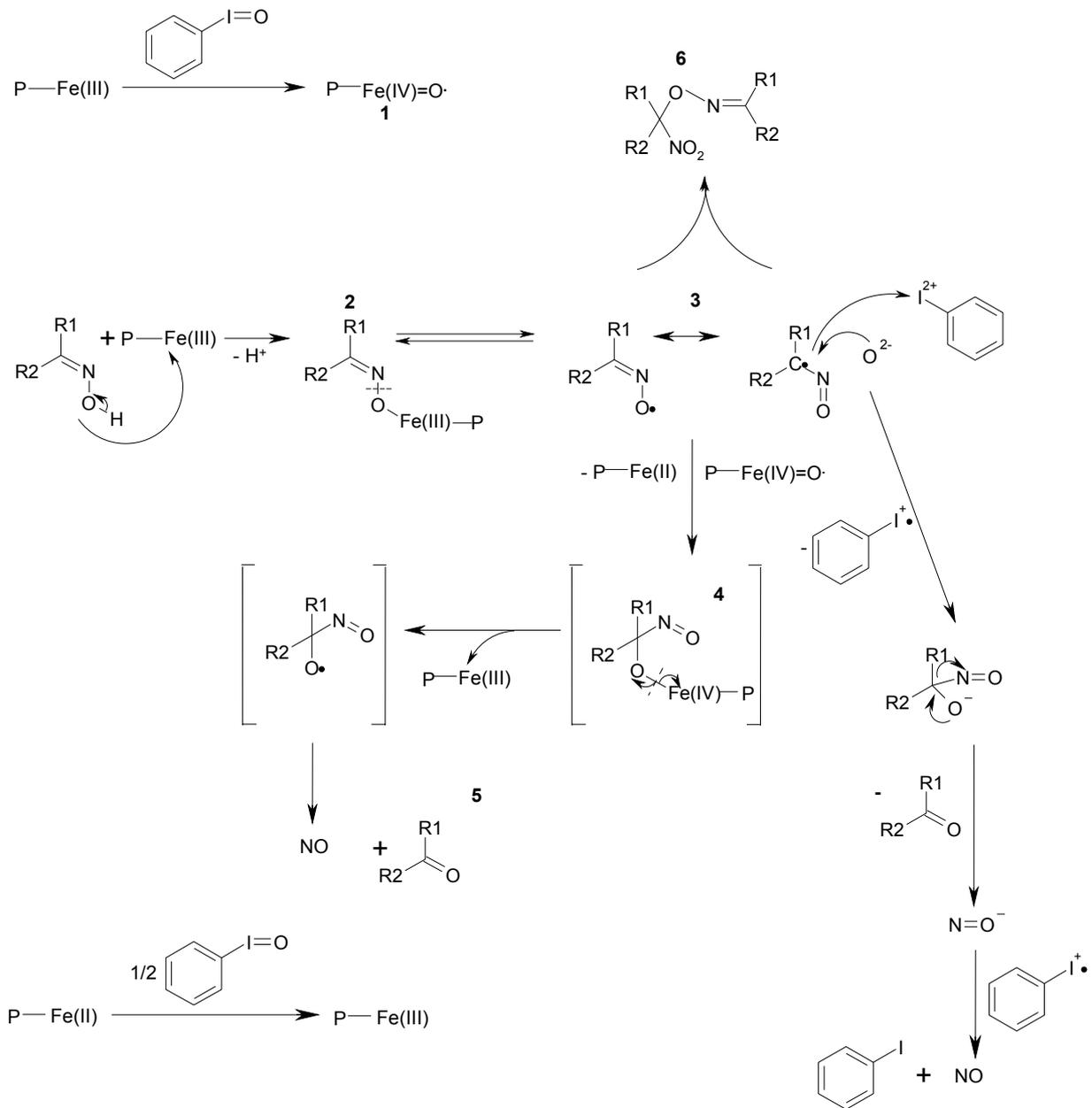
Die funktionellen Gruppen am Benzolring haben Auswirkung auf die Freisetzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH-Wertes. DBOX mit seinen elektronenschiebenden Methoxy-Gruppen zeigt die längsten Reaktionszeiten im Alkalischen. BOX, welches keine Substituenten am Benzolring aufweist, benötigt für die NO-Freisetzung im Neutralen die längste Zeitspanne. CBOX und NBOX mit elektronenziehenden Resten zerfallen am langsamsten im Sauren.

### Einfluss des Oxygenierungssystems

Die NO-Freisetzung aus allen hier untersuchten Ketoximen konnte durch die Zugabe des Oxygenierungssystems in allen verwendeten Medien deutlich gesteigert werden. Bei den Aldoximen sind die Ergebnisse diesbezüglich jedoch sehr viel komplexer. Im Neutralen konnte nur bei CBOX eine Erhöhung durch Porphyrin-Zusatz erzielt werden. Ansonsten war bei folgenden Vertretern eine Steigerung der Stickstoffmonoxid-Ausbeute durch das biomimetische System zu verzeichnen:

- Benzaldehydoxim-Derivate mit elektronenziehenden Resten (CBOX, NBOX) im Sauren und Alkalischen
- BOX im Alkalischen

Anhand von Literaturdaten und der hier erhaltenen DC-Ergebnisse lässt sich für die durch Porphyrine verstärkte NO-Freisetzung unter Regeneration der entsprechenden Carbonylverbindung aus den hier untersuchten Ketoximen folgender Reaktionsmechanismus postulieren:



**Abbildung 51:** Vorgeschlagener Mechanismus einer FeTPPCI-katalysierten NO-Freisetzung aus Oximen. Die Eisen(IV)=O-Spezies wurde auch für MnTPPCI nach der Reaktion mit Iodosobenzol formuliert<sup>[77]</sup>.

Dabei wird zunächst das Fe(III)-Porphyrin durch die Reaktion mit Iodosobenzol in den hochreaktiven Fe(IV)-Porphyrin-Komplex überführt (1). Das Oxim reagiert mit einem weiteren Molekül Fe(III)-Porphyrin zu einem Eisen(III)-Oxim-Komplex (2). Dessen Homolyse zwischen dem Eisen und dem Sauerstoff unter Bildung eines Iminoxy-Radikals (3) stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser

Reaktionskaskade dar. Durch Anlagerung des hochreaktiven Eisen(IV)-Porphyrin-Komplexes an das  $\alpha$ -C-Atom dieses Radikals entsteht eine instabile Eisen(IV)-Spezies (**4**), welche unter Abspaltung des Eisen(III)-Porphyrins zu NO und der entsprechenden Carbonylverbindung (**5**) reagiert. Iodosobenzol regeneriert das Eisen(III)-Porphyrin durch die Oxidation von intermediär erhaltenen Eisen(II)-Porphyrin, was in unserem Labor bestätigt werden konnte. Parallel zu der Reaktion mit der Eisen-(IV)-Spezies kann das Iminoxy-Radikal (**3**) zum einen dimerisieren (**6**). Die Stabilität dieses dimerähnlichen Moleküls ist unter anderem abhängig von der Art des Oxims, von dem pH-Wert der umgebenden Lösung und deren Temperatur. Es steht in den meisten Fällen zu dem Radikal im chemischen Gleichgewicht. Zum anderen kann das Iminoxy-Radikal mit einem weiteren Molekül Iodosobenzol reagieren, wobei ebenfalls neben NO die entsprechende Carbonyl-Verbindung entsteht. Bei diesem Mechanismus bildet sich zunächst ein Nitroxyl-Anion, welches durch die Reaktion mit PhIO zu Stickstoffmonoxid oxidiert wird.

Während dieser Reaktionskaskade wird intermediär kein Hydroxylamin gebildet. Das bestätigen die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie, in denen unter Verwendung des Oxygenierungssystems aus CHOX eine deutlich verminderte Hydroxylamin-Menge gefunden wurde (s. 2.10.3, Abb. 35).

Um die Porphyrin-bedingte Erhöhung der NO-Freisetzung aus Oximen zu erklären ist die Überlegung wichtig, welche Rolle hierbei die Ausbildung des Oxim-Porphyrin-Komplexes [s. Abb. 51, (**2**)] spielt.

Die Ausbildung eines Oxim-Porphyrin-Komplexes, bei dem der Oxim-Sauerstoff an das Metall-Ion des Porphyrins bindet [s. 2.3, Abb. 11 (**1**) und Abb. 51 (**2**)], ist sehr wichtig für die katalytische Wirkung. Die Homolyse dieser Verbindung wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt dieser Reaktionskaskade ermittelt <sup>[44]</sup>. Da normalerweise der Stickstoff den basischsten Molekülteil in einem Oxim-Molekül darstellt, kommen Komplexe über den Stickstoff sehr viel häufiger vor <sup>[50, 51]</sup>. Durch bestimmte Strukturmerkmale, wie z.B. elektronenziehende Reste oder Deprotonierung der Hydroxyimino-Gruppe, kann die Basizität des Stickstoffs zugunsten des Sauerstoffes soweit abgesenkt werden, dass die Ausbildung eines Komplexes über letzteres stattfindet <sup>[45]</sup>.

Nimmt man an, dass die N-Metall-Verknüpfung stabiler ist als die O-Metall-Verknüpfung, so wäre demnach die NO-steigernde Wirkung durch Porphyrine zum

einen vom Oxim-Molekülaufbau und zum anderen von dem umgebenden Milieu abhängig.

Der Mechanismus in Abbildung 51 lässt sich auf die hier untersuchten Ketoxime CHOX, FLOX und BPOX übertragen. Erstens reagierten diese drei Vertreter in allen verwendeten Medien mit einer erhöhten NO-Freisetzung unter Zusatz des Oxygenierungssystems. Zweitens gibt es für alle drei Oxime in der Literatur Hinweise auf die Ausbildung des entsprechenden Ketons in Porphyrin-Anwesenheit <sup>[42, 44, 64]</sup>. Im Falle von FLOX konnte die Regenerierung der Carbonylverbindung in Gegenwart des Oxygenierungssystems mittels Dünnschichtchromatographie in dieser Arbeit gezeigt werden. Drittens können die nicht identifizierbaren zwischenzeitlich auftretenden Substanzflecken bei der DC-Untersuchung von dem ebenfalls intermediär gebildeten Iminoxy-Radikal (**3**) oder dem daraus resultierenden dimerähnlichen Molekül (**6**) herrühren.

Folgende Ursachen werden für die NO-Freisetzung aus den Ketoximen nach dem in Abbildung 51 dargestellten Mechanismus verantwortlich gemacht:

- Ketoxime sind generell gekennzeichnet durch eine gegenüber den Aldoximen verbesserte Fähigkeit, Metallkomplexe und somit auch ein Oxim-Porphyrin-Komplex zu bilden, wie er in Abbildung 51 (**2**) zu finden ist <sup>[45]</sup>.
- Sowohl FLOX als auch BPOX besitzen elektronenziehende Phenylgruppen in der Molekül-Struktur. Dadurch wird die Basizität des Stickstoffes gegenüber dem Sauerstoff so weit gesenkt, dass die Ausbildung eines Oxim-Porphyrin-Komplexes über den Sauerstoff möglich ist. Des Weiteren sorgen diese Reste für eine hohe Mesomeriestabilisierung der intermediär gebildeten Iminoxy-Radikale [s. Abb. 51, (**3**)], was ebenfalls zu einer erhöhten NO-Bildung führt <sup>[62]</sup>.
- CHOX, FLOX und BPOX besitzen einen sehr symmetrischen Molekül-Aufbau, in dem zwischen der Basizität des Stickstoffes und des Sauerstoffes wenig Unterschied vorliegt. Dadurch kommt es zu einer genügend hohen Anzahl der für die katalytische Wirkung wichtigen Oxim-Porphyrin-Komplexen über den Sauerstoff. Dieses Gleichgewicht ist im Basischen auf die Seite des Sauerstoffes verschoben, was sich in den stark erhöhten NO-Ausbeuten in Gegenwart des Oxygenierungssystems bei pH 9,0 ausdrückt (s. 2.7.2, Abb. 27).

Das Oxygenierungssystem unter Verwendung von MnTPPCI war im alkalischen Milieu in Bezug auf die Steigerung der NO-Freisetzung bei den hier untersuchten Oximen leistungsfähiger. Die einzige Ausnahme bildet DBOX, bei dem keine Porphyrin-abhängige Erhöhung der NO-Ausbeute zu beobachten war. In Bezug auf die Freisetzungsgeschwindigkeit war MnTPPCI dem FeTPPCI meistens überlegen. Dieses deckt sich mit Literaturberichten, in denen eine Abhängigkeit der Oxim-Zersetzung von der Art verwendeter Porphyrine verzeichnet wurde <sup>[44]</sup>.

Im Gegensatz zu den Ketoximen reagierten die Benzaldehydoxim-Derivate im Neutralen bis auf CBOX in Gegenwart der Porphyrine mit keiner Steigerung der NO-Freisetzung. Der Vergleich der NO-Bildung nach Erreichen des Endpunktes mit denen nach fünf Minuten jedoch zeigte, dass bei allen untersuchten Oximen zumindest zu Beginn der Freisetzung eine Porphyrin-Katalyse zu beobachten war. Dieses kann man mit den parallelen Abläufen mehrerer Zersetzungsmechanismen erklären, von denen die NO-Bildung über den Mechanismus aus Abbildung 51 am schnellsten stattfindet. Die Betrachtung der Reaktionszeiten in Tabelle 1 deckt sich mit dieser Theorie, da in Gegenwart der Porphyrine generell kleinere Zerfallsraten beobachtet werden konnten. Die absolut erniedrigten Ausbeuten deuten auf Neben- und Folgereaktionen hin, die zu keiner NO-Bildung führen (s. oben).

Selbstverständlich spielt hier die verminderte Fähigkeit der Aldoxime mit Metallen komplexe Verbindungen einzugehen eine Rolle <sup>[45, 46]</sup>. Diese führt zu einer niedrigeren Ausbildung des Oxim-Porphyrin-Komplexes [s. Abb. 51 (2)] über den Hydroxyimino-Sauerstoff.

Da der Aufbau und somit die Stabilität der aus den Iminoxy-Radikalen gebildeten dimerähnlichen Moleküle [s. Abb. 51 (3 + 6)] unter anderem von der Art des Ausgangsmoleküls abhängt <sup>[61]</sup>, ist es durchaus denkbar, dass aus Aldoximen stabilere Varianten gebildet werden als aus Ketoximen. Dieser Aspekt führt ebenfalls zu einer erniedrigten NO-Ausbeute.

Des Weiteren können durch den ständigen Abzug von NO über das Trägergas Reaktionen, die zu keiner NO-Bildung geführt haben sogar wieder rückgängig gemacht werden. Die bereits erwähnten dimerähnlichen Moleküle können so wieder zu Iminoxy-Radikalen, mit denen sie in einem chemischen Gleichgewicht stehen <sup>[61]</sup> zurückgebildet werden. Dieser Mechanismus führt zu einer verzögerten NO-Bildung.

Obwohl bei Aldoximen nur die Z-Isomeren komplexe Verknüpfungen mit Metallen eingehen sollen, konnte auch aus einem Z-Benzaldehydoxim-Derivat keine gesteigerte NO-Bildung in Gegenwart eines Porphyrins erzielt werden (Werte nicht gezeigt). Diese Beobachtung entkräftet die Theorie, dass aus E-BOX erst eine durch Porphyrine gesteigerte NO-Freisetzung einsetzt, nachdem die E-Form durch die Metallanwesenheit in die Z-Form isomerisierte.

Da die meisten Aldoxime mit einer Verminderung der NO-Freisetzung in Gegenwart der Porphyrine reagierten, liegt die Vermutung nahe, dass es hierbei zu der Ausbildung von Oxim-Porphyrin-Komplexen über den Stickstoff gekommen ist. Bekräftigt wird diese Theorie durch die fast ausnahmslose Porphyrin-induzierte NO-Steigerung im alkalischen Milieu. Des Weiteren ist dies auch ein weiterer Hinweis auf den postulierten Mechanismus in Abbildung 51. Durch den hohen pH-Wert und die daraus resultierende Deprotonierung des Hydroxyimino-Sauerstoffes werden die Basizitätsverhältnisse nämlich soweit verändert, dass eine Bindung über den Sauerstoff und somit die Reaktionskaskade stattfinden kann. Da dieser Effekt durch elektronenschiebende Reste behindert wird, läuft er bei DBOX weder im Alkalischen noch in einem anderen hier verwendeten Milieu ab.

Unterstützt wird diese Annahme auch durch die Erhöhung der NO-Bildung aus CBOX in allen untersuchten Medien. Durch den elektronenziehenden Rest wird die Basizität des Stickstoffes so weit herabgesetzt, dass es auch zur Ausbildung des für die Reaktion in Abbildung 51 notwendigen Oxim-Porphyrin-Komplexes kommt (2).

Obwohl aufgrund der elektronenziehenden Gruppe im Falle des CBOX gerade im Alkalischen eine Porphyrin-induzierte Erhöhung der NO-Freisetzung zu erwarten wäre, ist diese bei pH 9,0 nur wenig ausgeprägt. Im Basischen ist die NO-Bildung durch die Einwirkung des Sauerstoff-Donors allein wahrscheinlich bevorzugt. Darauf gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise und auch in unserem Arbeitskreis wurde diese Möglichkeit bereits beschrieben <sup>[62, 63]</sup>. Aus diesem Grund liegt nur noch ein geringer Unterschied zwischen der gebildeten NO-Menge mit und ohne Porphyrin vor.

Bei NBOX sind die Verhältnisse etwas anders, da das Molekül im Alkalischen durch intramolekulare Effekte insoweit stabilisiert vorliegt (s. Abb. 48), wodurch der Vorteil durch die Porphyrine wieder zum Tragen kommt.

Bei BOX, in dessen Molekülstruktur weder elektronenziehende noch elektronenschiebende Gruppen vorkommen, findet man nur im Falle des MnTPPCl

bei pH 9,0 eine Erhöhung der NO-Ausbeute, was ebenfalls durch die erhöhte Basizität des Sauerstoffs im Vergleich zum Stickstoff durch vorangegangene Deprotonierung zu begründen ist und für den in Abbildung 51 dargestellten Mechanismus spricht.

$\text{NO}^-$  ist in der Lage, mit Fe(III)-Porphyrinen stabile Nitroso-Komplexe zu bilden <sup>[97, 104]</sup>, was laut den Ergebnissen der Angeli's Salz-Untersuchung die Stickstoffmonoxid-Bildung nicht steigert. Aus diesem Grund kann die Erhöhung der NO-Ausbeute in den oben beschriebenen Fällen als Hinweis auf diese Reaktionskaskade in Abbildung 51 angesehen werden, da  $\text{NO}^-$  hier nicht vorkommt [lediglich in einer möglichen Nebenreaktion durch den Angriff des Sauerstoffdonors am Iminoxy-Radikal (**3**)]. Dieser Aspekt kann in Hinblick auf das parallele Auftreten mehrerer Reaktionsabläufe auch an der Minderung der NO-Bildung bei den Aldoximen unter manchen Bedingungen beteiligt sein. Da alle anderen postulierten Mechanismen von der intermediären Bildung von Nitroxyl-Anionen ausgehen, würden diese durch die Anwesenheit von Porphyrinen unter Weiterreaktion zu den stabilen Nitroso-Komplexen eine verminderte NO-Ausbeute bewirken. Dieses wirkt sich nur dann mindernd aus, wenn die Porphyrin-katalysierte Reaktionskaskade (s. Abb.51) bei der NO-Freisetzung nicht im Vordergrund steht.

Die Ausbildung dieser Komplexe sollte mit dem elektronegativeren Eisen besser ablaufen als mit Mangan, was die in manchen Fällen erhöhte Leistungsfähigkeit des MnTPPCI erklärt.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für eine gegenüber dem Porphyrin-freien System abgesenkte NO-Freisetzung liegt in der Struktur der bei der Porphyrin-Katalyse intermediär gebildeten Iminoxy-Radikale. In der Literatur wird berichtet, dass eine erhöhte Mesomerie-Stabilität wesentlich zur Mengen-Steigerung der NO-Bildung beiträgt <sup>[62]</sup>.

Mögliche Nebenreaktionen, die bei einer Porphyrin-vermittelten Oxim-Zersetzung auftreten können und zu einer generell verminderten NO-Ausbeute führen, sind neben der Ausbildung stabiler dimerähnlicher Moleküle auch deren Zersetzung unter Produktion von elementarem Stickstoff. Des Weiteren wird in der Literatur von

Nitroalkan-Bildung nach Einwirkung der Eisen(V)=O-Spezies berichtet <sup>[52, 59]</sup>, welche ebenfalls nicht von dem NO-Analyzer erfasst werden können.

Der gegenüber den Ketoximen erhöhte Anteil an Nitroalkan-Bildung bei den Aldoximen unter Einwirkung der Porphyrine ist ein weiterer Erklärungsansatz für die z.T. verminderte NO-Ausbeute in Gegenwart des Oxygenierungssystems.

Die hier gebildeten Nitroalkane sind nicht in der Lage selber NO freizusetzen. Dies ist nur möglich, wenn sie eine Hydroxyimino-Gruppe in ihrer Molekülstruktur aufweisen <sup>[52, 59]</sup>.

Die Theorie, dass sich unter Verwendung von Porphyrinen ausschließlich Nitroalkane aus Oximen bilden, wie es in der Literatur diskutiert wurde <sup>[59]</sup>, konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch widerlegt werden.

In Gegenwart des Oxygenierungssystems scheint im Sauren die Bildung von Nitroalkanen für eine generelle Verminderung der NO-Freisetzung gegenüber pH 7,4 verantwortlich zu sein.

Die erhöhte Spaltbarkeit der Ketoxime gegenüber den Aldoximen <sup>[46]</sup> findet man sowohl in der Freisetzungsgeschwindigkeit als auch in den gebildeten NO-Mengen der hier untersuchten Oxime wieder. Dabei sind die NO-Ausbeuten, die aus BPOX erhalten wurden, deutlich höher als die aus den anderen hier untersuchten Oximen.

Welche Auswirkungen der Molekülaufbau hat, macht der Unterschied der gebildeten NO-Ausbeuten innerhalb der Ketoxim-Gruppe deutlich. Während BPOX mit 40 % die höchsten Werte ohne weitere Zusätze bei pH 7,4 erzielte, bildete das strukturell eng verwandte FLOX ähnliche Stickstoffmonoxidmengen wie die Benzaldehydoxim-Derivate. CHOX dagegen lag mit knapp 10 % deutlich darunter. Offensichtlich bewirkt die Verbindung der beiden Phenyl-Reste im FLOX-Molekül eine derartige Veränderung, dass sich dessen NO-Freisetzungsmenge stark dem des CHOX annähert. Dessen geringe NO-Freisetzung ohne weitere Zusätze lässt sich wiederum durch den cycloaliphatischen Charakter erklären, der laut Literatur für eine noch unter den Aldoximen liegende Spaltbarkeit sorgt. Die hohe gebildete Stickstoffmonoxidmenge und die hohe Freisetzungsrate von BPOX ist neben diesem Aspekt auch durch die hohe Mesomeriestabilität des intermediär gebildeten Iminoxy-Radikals zu erklären <sup>[62]</sup>. Des Weiteren unterscheiden sich FLOX und BPOX trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit in dem Aufbau des dimerähnlichen Moleküls [s. Abb. 51 (6)]. Dieses ist auf sterische Unterschiede zurückzuführen, die durch die

fehlende Verknüpfung der beiden Phenyl-Reste und damit durch den Verlust der Rigidität des Moleküls entstanden sind. Die aus BPOX resultierende Struktur zerfällt im Gegensatz zu der in Abbildung 51 dargestellten Verbindung irreversibel in das entsprechende Iminoxy-Radikal <sup>[61]</sup>. Dieser Sachverhalt ist eine weitere Erklärung zu der im Vergleich zu den anderen Oximen extrem beschleunigten Zersetzung.

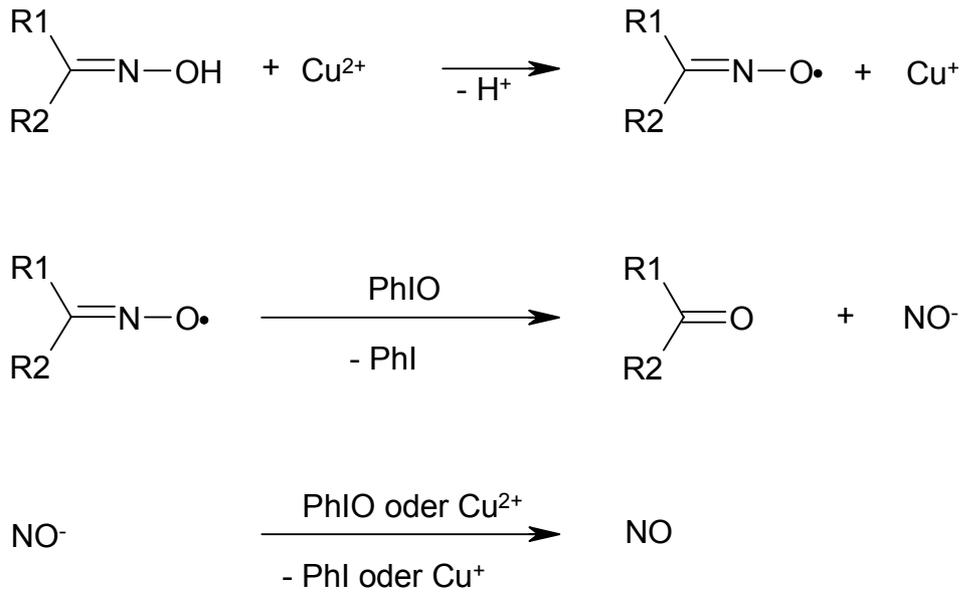
#### Einfluss von Kupfer(II)-sulfat und Kaliumhexacyanoferrat(III)

Da Kupfer(II)-Ionen den oxidativen Zerfall von Hydroxylamin katalysieren <sup>[9, 80, 86]</sup>, kann man eine Erhöhung der NO-Freisetzung aus Oximen in Gegenwart von Kupfer(II)-sulfat als Indikator für die intermediäre Bildung des Hydrolyseproduktes ansehen (s. Abb. 47).

Alle hier untersuchten Oxime zeigten in Gegenwart von Kupfer zumindest eine leichte Steigerung der NO-Ausbeute, was auf Hydroxylamin als Intermediat der Freisetzungsreaktion hindeutet. Ganz besonders gilt dieses für CHOX, das außerordentlich hohe Ausbeuten in Gegenwart von CuSO<sub>4</sub> erzielte. Sowohl diese Ergebnisse als auch die relativ hohen freigesetzten Hydroxylamin-Mengen bestätigen die Literaturquellen, in denen von einer NO-Freisetzung aus CHOX über die Bildung von Hydroxylamin berichtet wird <sup>[41, 42]</sup>.

Die Erhöhung der NO-Freisetzung unter Verwendung von Kupfer ist jedoch bei gleichzeitiger Gabe von MnTPPCI weniger stark. Dieses bestätigt wiederum den Mechanismus in Abbildung 51 und somit die Theorie, dass während der Porphyrin-Katalyse kein Hydroxylamin als Intermediat gebildet wird. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass sowohl die Hydrolyse als auch die Reaktionskaskade in direkter Konkurrenz zueinander stehen und parallel ablaufen können.

Neben einer katalysierten Hydrolyse sind auch direkte oxidative Effekte auf die NO-Freisetzung durch Kupfer(II)-sulfat denkbar:



**Abbildung 52:** *Vorgeschlagener Mechanismus der NO-Freisetzung aus Oximen unter oxidativer Einwirkung von Kupfer(II)-Ionen.*

Da weder bei FLOX noch bei BPOX Hydroxylamin unter den Bedingungen der NO-Messung nachgewiesen werden konnte, wird der in Abbildung 52 dargestellte Mechanismus für die gesteigerte NO-Freisetzung in Gegenwart von  $\text{CuSO}_4$  verantwortlich sein. Bei den anderen Oximen, insbesondere CHOX und BOX werden oxidative Effekte als auch Katalyse der Hydroxylamin-Autoxidation durch Kupfer(II)-sulfat parallel ablaufen.

Der Zusatz von Kupfer(II)-Ionen bewirkt in einigen Fällen noch eine zusätzliche Beschleunigung der NO-Freisetzung, was sich jedoch auf die absolute NO-Ausbeute nicht immer steigernd auswirkt.

Eine durch die Zugabe von Kupfer(II)-sulfat erhöhte NO-Freisetzung kann auch dadurch bewirkt worden sein, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen  $\text{NO}^-$  zu NO oxidiert, während Iodosobenzol mit Nitroxyl-Anionen unter Umständen bis zum Nitrit reagiert. Dies ist begründet in der gegenüber dem Sauerstoffdonor verminderten oxidativen Kraft des Kupfers und in der Tatsache dass durch  $\text{Cu}^{2+}$  nur ein Elektron übertragen wird. Iodosobenzol hingegen liefert die für die  $\text{NO}^-$ -Oxidation zu Nitrit notwendigen zwei Elektronen.

Die NO-Freisetzung von CHOX unter Verwendung des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat(III) erbrachte leider nur eine sehr geringe Ausbeute. Der

Vergleich der NO-Werte nach 5 Minuten mit dem NO-Endwert zeigte zwar eine sehr rasche Freisetzungsreaktion, jedoch wurde unter Verwendung dieses Metallsalzes eine NO-Ausbeute beobachtet, die noch unter der nach alleiniger Zugabe des Sauerstoffdonors lag. Obwohl Oxime sich durch rotes Blutlaugensalz sehr gut oxidieren lassen <sup>[61]</sup>, entsteht hieraus nur zu einem geringen Anteil Stickstoffmonoxid. Dieses ist als weiterer Hinweis zu sehen, dass CHOX NO über die intermediäre Bildung von Hydroxylamin freisetzt. Hydroxylamin bildet nämlich in Gegenwart von Kaliumhexacyanoferrat(III) hauptsächlich elementaren Stickstoff <sup>[82, 89]</sup>. Dieser kann von der hier verwendeten Chemilumineszenz-Methode jedoch nicht erfasst werden, was die erniedrigten NO-Ausbeuten erklärt.

#### *Nitrit-Freisetzung am Beispiel von Fluorennoxim*

Wie bei der Nitrit-Messung aus Hydroxylamin bereits beobachtet, kommt es auch bei der Vermessung von FLOX zu der bekannten Konzentrationsabhängigkeit. Dieses ist ebenfalls auf die Untersuchung aus einem geschlossenen System zurückzuführen. Aus diesem Grund sind auch hier nur vergleichende Aussagen zu machen.

Die sinkenden Nitrit-Mengen in Anwesenheit des Oxygenierungssystems bei steigender Oxim-Konzentration bestätigen die Literaturangaben, in denen von einer Behinderung der Nitrit-Bildung unter Enzym-Beteiligung aus hohen Oxim-Mengen berichtet wird, während sie bei niedrigen Konzentrationen stöchiometrisch abläuft <sup>[112]</sup>. Anders jedoch als beim Hydroxylamin kam es bei der Nitrit-Bildung aus FLOX nur in Gegenwart des Oxygenierungssystems bei steigender Oxim-Konzentration zu sinkenden Ausbeuten. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass FLOX unter den Bedingungen der NO-Messung nicht zu Hydroxylamin hydrolysiert.

Eine Begründung für die Abhängigkeit der Nitrit-Freisetzung aus FLOX (s. Abb. 30) könnte in der Neigung der Oxime zu finden sein, Assoziate zu bilden <sup>[46]</sup>. Diese könnten aus sterischen Gründen die Porphyrin-induzierte Nitrit-Bildung behindern, und zwar umso stärker, je höher die Ausgangskonzentration ist. Durch die Abwesenheit der Porphyrine wird die Freisetzung durch steigende Konzentrationen jedoch noch zusätzlich erhöht. Offensichtlich liegt hier ein durch das Oxim katalysierter Effekt vor, der möglicherweise ebenfalls auf die Assoziat-Bildung zurückgeführt werden kann.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt darin, dass die Stabilität des in Abbildung 51 dargestellten dimerähnlichen Moleküls (**6**) mit der Oxim-Ausgangskonzentration steigt <sup>[61]</sup>. Dadurch sinkt die Verfügbarkeit des damit im chemischen Gleichgewicht stehenden Iminoxy-Radikals, was die Menge der daraus resultierenden Produkte (s. Abb. 51) ebenfalls mindert. Das wirkt sich auch auf die gebildete Nitrit-Menge aus, wenn man davon ausgeht, dass  $\text{NO}_2^-$  auch aus  $\text{NO}$  bzw.  $\text{NO}^-$  gebildet wird. Die Ausbildung des dimerähnlichen Moleküls ist nur in Anwesenheit des Oxygenierungssystems möglich.

Des Weiteren haben die Ergebnisse der Vermessung des HNO-Donors Angeli's Salz gezeigt, dass es durch die Anwesenheit von Iodosobenzol zu einer Weiteroxidation zu Nitrit kommen kann. Diese fiel jedoch sowohl unter Verwendung des Oxygenierungssystems als auch unter Iodosobenzol allein gleichermaßen stark aus, was durchaus auf dieses System übertragbar ist.

Anders als bei der Nitrit-Freisetzung aus dem Hydrolyse-Produkt, kommt es bei FLOX zu einer Erhöhung der Ausbeuten in Gegenwart der Porphyrinen, was wieder auf eine Zersetzung ohne intermediäre Ausbildung von Hydroxylamin hindeutet.

Allerdings konnten der Zusatz von Eisen-Porphyrinen die Nitritmengen steigern. Dies scheint ein weiterer Hinweis auf eine Oximen gegenüber verminderte Leistungsfähigkeit in Bezug auf die NO-Freisetzung zu sein, da mehr Nitrit gebildet wird.

Auch hier wird das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Porphyrine deutlich. Die Werte sind unter Verwendung von FeTPPCI stabil. Dieses trifft jedoch nicht auf die beiden anderen Vertreter zu. Die sinkenden Ausbeuten in Anwesenheit von FeTFPCCI und MnTPPCI deuten auf Nitrit verbrauchende Interaktionen seitens der Porphyrine hin. Hierfür gibt es folgende Erklärungsansätze:

1. Aufgrund des oxidativen Potentials des Oxygenierungssystems kommt es zur Bildung von Nitrat, welches mit diesem Assay nicht detektiert werden kann. Allerdings konnte dieses NO-Oxidationsprodukt in der Vergangenheit nur selten und lediglich in kleinen Mengen bei pH 7,4 gemessen werden <sup>[73]</sup>.
2. Nitrit könnte durch die genannten Porphyrine als Ligand gebunden bzw. komplexiert worden sein.

Anders als bei der NO-Freisetzung wird hier die erhöhte Leistungsfähigkeit des FeTFPPCI durch die axialen Liganden in der deutlich höheren Nitrit-Ausbeute ersichtlich.

Da die Werte unter Verwendung von Kupfer(II)-sulfat stabil sind und sich in ihrer Oxim-Konzentrationsabhängigkeit verschieden von den Porphyrinen verhalten, kann hier von einem unterschiedlichen Freisetzungsmechanismus ausgegangen werden.

Der Zerfall des Nitrits in Abhängigkeit der eingesetzten Oxim-Konzentration ist übrigens durch die zusätzliche Verwendung von Kupfer verhindert. Die Ausbeuten sind zwar nur wenig erhöht, bleiben jedoch etwas länger stabil als unter alleiniger Verwendung des Oxygenierungssystems. Kinetische Gründe und Komplexbildung könnten für stabilisierende Effekte sorgen.

Der fehlende katalytische Effekt von Kupfer(II)-Ionen spricht wieder gegen die intermediäre Ausbildung von Hydroxylamin bei der Zersetzung von Fluorennoxim.

Addiert man die Nitrit-Freisetzungen unter den jeweiligen Zusätzen zu den entsprechenden NO-Werten, fällt auf, dass nur unter Verwendung des MnTFPPCI-Oxygenierungssystems mit und ohne Kupfer mehr NO als Nitrit gefunden wurde. Bei den anderen Kombinationen war es umgekehrt. Die höchsten Ausbeuten der gemessenen Stickstoffspezies wurden dabei unter Verwendung der beiden Eisen-Porphyrine gefunden. In den meisten Fällen wurden ca. 40 % Stickstoffspezies aus FLOX gemessen. Die verbleibenden Molekülanteile sind wahrscheinlich durch die Ausbildung verschiedener Nebenprodukte, wie z.B. Distickstoffoxid, elementarer Stickstoff, und Nitroalkane <sup>[9, 82, 86]</sup> (s. oben), der Chemilumineszenzmethode entgangen. Nitroalkane selber setzen kein Nitrit frei <sup>[112]</sup>.

## 2.14 Fazit

Aus den bisher erhaltenen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- Das pH-abhängige NO-Freisetzungsverhalten kann zum einen auf strukturelle Besonderheiten zurückgeführt werden. Zum anderen scheint es Ausdruck für die intermediäre NO<sup>-</sup>-Bildung zu sein, da diese pH-abhängige Neben- und

Weiterreaktionen durchläuft, die sich in den Chemilumineszenz- und UV/Vis-Bestimmungen der Oxime wieder finden lassen. Auch kinetische Effekte können hier mit hineinspielen.

- Die Weiteroxidation des NO durch die Zusätze, insbesondere des Oxygenierungssystems, ist denkbar. Der Vergleich der Chemilumineszenz-Ergebnisse der beiden Nitroxyl-Donoren Angeli's Salz und Hydroxylamin hat dabei ergeben, dass die Oxidation zu Nitrit wahrscheinlich auch von NO<sup>-</sup> ausgeht.
- Die Erhöhung der NO-Ausbeute durch Zusatz von Kupfer(II)-Ionen ist nicht unbedingt ein Hinweis auf die Existenz von Hydroxylamin als Intermediat, da auch die direkte Reaktion mit dem Oxim denkbar ist. Des Weiteren kann die gegenüber Iodosobenzol verbesserte Weiteroxidation von Nitroxyl zu NO durch Kupfer(II)-Ionen für erhöhte NO-Ausbeuten verantwortlich sein.
- Es sind mehrere Freisetzungsmechanismen möglich, die auch parallel ablaufen können:
  - über die Hydrolyse zum NO-Donor Hydroxylamin
  - durch die Reaktion mit dem Sauerstoff-Donor
  - durch die Reaktion mit Kupfer(II)-Ionen
  - durch die katalytische Reaktion mit Porphyrinen

Welcher Mechanismus dabei überwiegt, ist wiederum sowohl von den strukturellen Eigenschaften des Oxims als auch von den äußeren Gegebenheiten (Art der Zusätze und pH-Wert der Umgebung) abhängig.

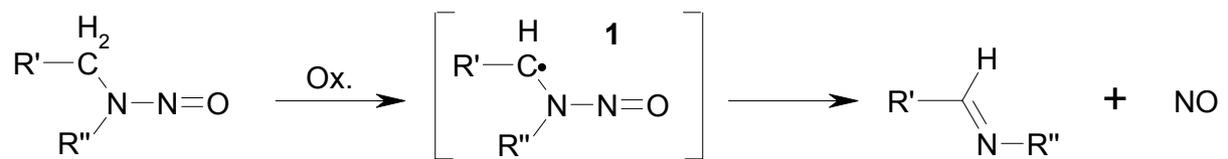
- Die NO-Freisetzung über die intermediäre Hydroxylamin-Bildung spielt bei FLOX und BPOX wenn überhaupt nur eine sehr geringe Rolle. Dieses konnte anhand der negativen Ergebnisse des Hydroxylamin-Nachweises unter den Bedingungen der Chemilumineszenz-Bestimmungen gezeigt werden. Der Vergleich der Nitrit-Messungen aus FLOX mit dem denen des Hydrolyse-Produktes bestätigt diese These.
- NO<sup>-</sup> wird bei fast allen postulierten Freisetzungsmechanismen als Intermediat angenommen. Einzige Ausnahme bildet der Weg über die Porphyrine. Ein Hinweis darauf ist die Steigerung der NO-Freisetzung in Anwesenheit des Oxygenierungssystems aus einigen Oximen, da Nitroxyl-Anionen mit Porphyrinen stabile Nitroso-Komplexe bilden. Im Falle des Nitroxyl-Donors Angeli's Salz bewirkte die Ausbildung dieser Komplexe eine fehlende NO-Freisetzungserhöhung.

- Obwohl Porphyrine generell die NO-Freisetzung beschleunigen, können sie nur bei den Ketoximen die Ausbeuten in allen untersuchten Medien erhöhen. Dieses zeigt, dass in Gegenwart des Oxygenierungssystems nicht die Zersetzungsgeschwindigkeit allein eine hohe Stickstoffmonoxid-Ausbeute garantiert. Vielmehr spielt hierbei auch die Art des intermediär gebildeten Oxim-Porphyrin-Komplexes eine wichtige Rolle, denn nur wenn dieser über den Hydroxyimino-Sauerstoff entsteht, kommt es zu einer Porphyrin-katalysierten NO-Freisetzung. Wie stark dieser im Verhältnis zu der Verknüpfung über den Stickstoff ausgebildet wird, ist zum einen abhängig vom Aufbau des Oxim-Derivates und zum andern von dem pH-Wert der umgebenden Lösung.
- Der in Abbildung 51 dargestellte Reaktionsmechanismus lässt sich auf die hier untersuchten Ketoxime, aber auch auf einige Aldoxime übertragen. Letzteres ist gegeben, wenn basisches Lösemittel verwendet wird und elektronenziehende Reste vorhanden sind.
- Die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie und Chemilumineszenzbestimmungen von Hydroxylamin und der Oxime haben gezeigt, dass der Porphyrin-katalysierte NO-Freisetzungsmechanismus aus Oximen (s. Abb. 51) nicht über die intermediäre Bildung von Hydroxylamin verläuft.
- BPOX zersetzt sich am schnellsten und bildet dabei am meisten NO. Erhöhte Spaltbarkeit aufgrund der Ketoxim-Struktur, hohe Mesomeriestabilität des intermediär gebildeten Iminoxy-Radikals sowie verminderte Rigidität durch die fehlende Verbindung der beiden Phenylreste werden dafür verantwortlich gemacht.
- Die Konzentrationsabhängigkeit der Nitrit-Ausbeute von der eingesetzten FLOX-Konzentration kann durch die Assoziat-Bildungsneigung der Oxime und die mit der Ausgangssubstanzmenge korrelierende Stabilität der aus Iminoxy-Radikalen gebildeten dimerähnlichen Moleküle erklärt werden.
- Die schnell absinkende Nitritmenge in Gegenwart des Oxygenierungssystems ist wahrscheinlich auf eine Ligandisierung des Analyten durch die Porphyrine zurückzuführen. Die Weiteroxidation zu Nitrat ist zwar denkbar, jedoch aufgrund sehr niedriger Ergebnisse in früheren Arbeiten unter den hier vorherrschenden Bedingungen wahrscheinlich nur schwach ausgeprägt [9, 73, 80].

### 3. Dephostatine als NO-Donatoren

#### 3.1 Eigenschaften

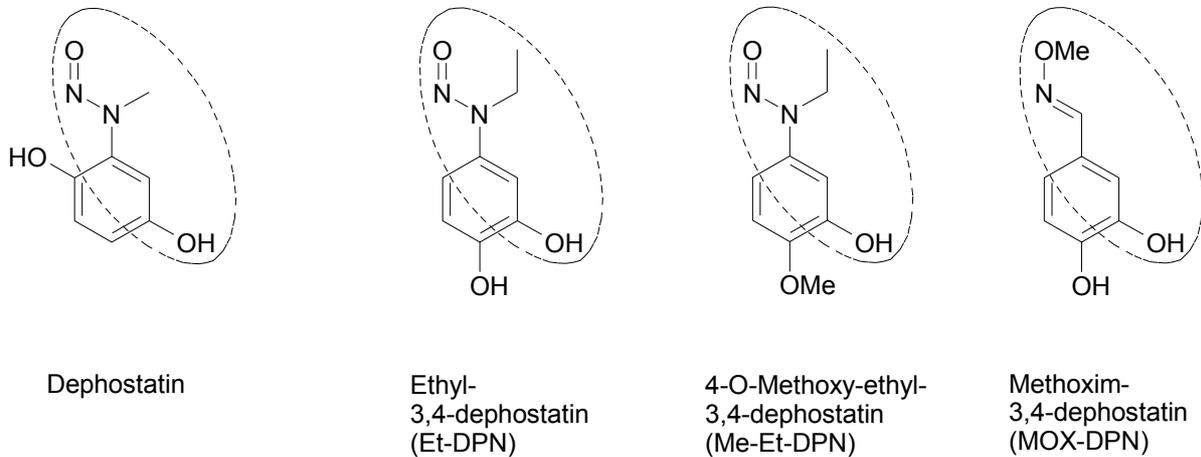
Die Ausgangssubstanz dieser Gruppe ist das Dephostatin, welches vor 10 Jahren aus dem Bakterium *Streptomyces sp.* isoliert und später auch synthetisch hergestellt wurde<sup>[40, 113]</sup>. Es handelt sich dabei um ein *N*-Nitrosamin, dass zu der Gruppe der *N*-NO-Donatoren gehört. *N*-Nitrosamine sind cancerogen und mutagen. Sie setzen NO in einer Ein-Elektronenoxidation frei, vermutlich vermittelt durch eine CytP450-abhängige metabolische Aktivierung. Der angenommene Mechanismus für diese Substanzen ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53:** *Vorgeschlagener Mechanismus der NO-Freisetzung aus N-Nitrosaminen. Dabei wird zunächst ein Kohlenstoff in Nachbarstellung zur N-Nitrosamin-Gruppe oxidiert, was zu einem instabilen  $\alpha$ -Nitrosamino-Radikal 1 führt. Der Zerfall dieses Intermediats führt zur Bildung von NO. Dieser Mechanismus kann auch für Dephostatin angenommen werden.*

Dephostatin ist als NO-Donor bereits bekannt. Die Substanz ist jedoch durch eine relativ kurze Haltbarkeit im Zellkulturmedium gekennzeichnet. Deshalb wurden mehr als 20 Dephostatin-Derivate synthetisiert, welche eine größere Stabilität aufweisen. Dephostatine sind in der Lage Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) zu inhibieren, was zu neuroprotektiven Mechanismen führt. Dieses ist in Hinblick auf die Behandlung chronischer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, von großem Interesse. Der Ansatz bietet neue Strategien, im Verlauf dieser Erkrankungen vor neuronalem Zelltod zu schützen. Auch von manchen NO-Donatoren ist bekannt, dass sie neuroprotektive Effekte aufweisen<sup>[40]</sup>. Aus diesem Grund sollte herausgefunden werden ob, und vor allem

wie viel NO Derivate des Dephostatins freisetzen. In der Abbildung 54 sind die hier untersuchten Derivate und die Ausgangssubstanz dargestellt:



**Abbildung 54:** Drei Derivate des Dephostatin, die hier untersucht wurden und die Ausgangssubstanz. Die Fähigkeit, NO freizusetzen war von Dephostatin bekannt, nicht jedoch von seinen Derivaten.

MOX-DPN wird in der Literatur als Nitrosamin-freies DPN bezeichnet, obwohl es strukturell kein Dephostatin-Analogon ist <sup>[40]</sup>. Die Ähnlichkeit ist allerdings so groß (MOX-DPN ist ein Methin-Isoster zu Dephostatin), dass es zur besseren Vergleichbarkeit so wie in der Literatur bezeichnet wird.

Mit Ausnahme des MOX-DPN konnte von allen in Abbildung 54 dargestellten Substanzen von der Fähigkeit spontan NO zu bilden ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurde das Oxim im Rahmen der NO-Messung als Negativkontrolle mitgeführt, da auch diese Substanz neuroprotektive Effekte aufweist. Jedoch ging man davon aus, dass diese nicht auf NO-vermittelte Mechanismen beruhten. Man wollte durch die Vermessung am NO-Analyser einen weiteren Beweis für diese These erhalten.

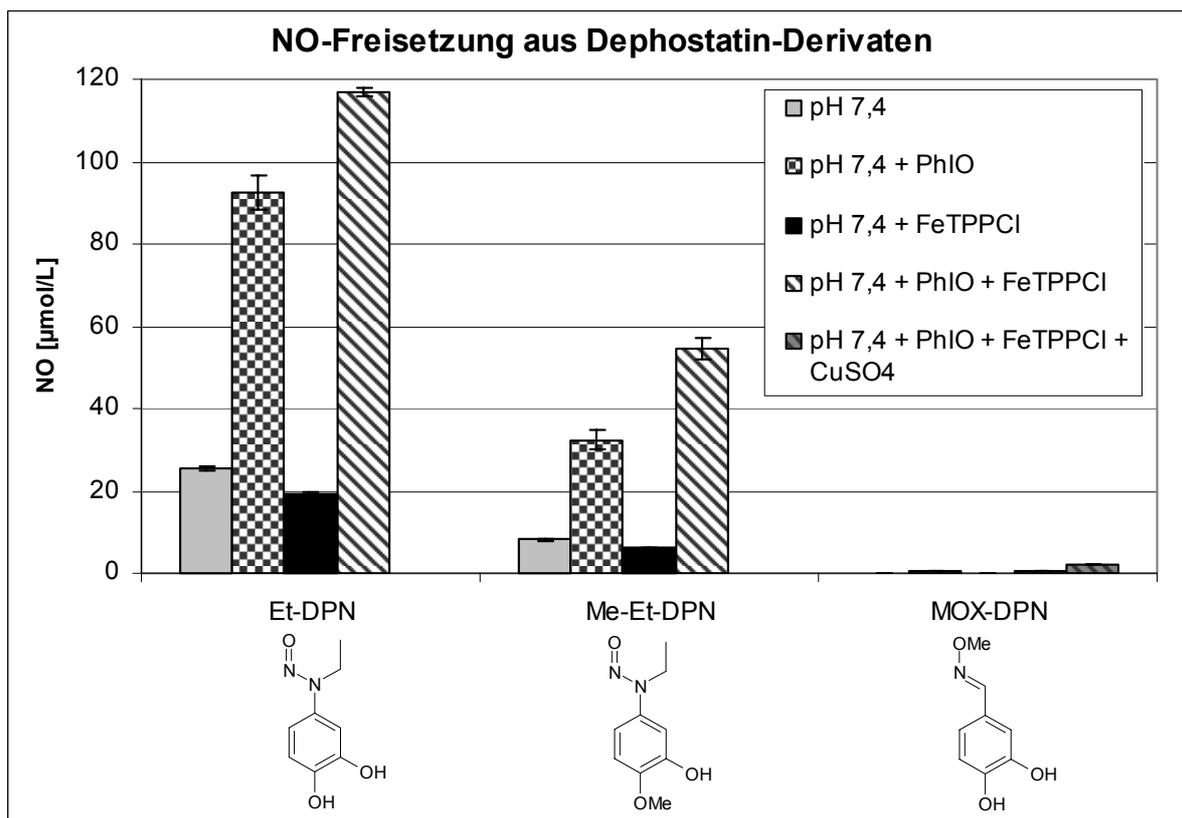
Die Auswirkung des Oxygenierungssystems auf die Stickstoffmonoxid-Bildung der Dephostatine war unbekannt, besonders in Hinblick auf das O-alkylierte Oxim MOX-DPN. Laut Angaben in der Literatur sind Substanzen mit einer auf diese Weise verschlossenen Hydroxyimino-Struktur nicht in der Lage NO freizusetzen <sup>[114]</sup>. Allerdings hat es auch Berichte über O-Desalkylierungen unter Verwendung von

Porphyrinen gegeben <sup>[71]</sup>. Dieser Prozess würde zur Entkopplung der Hydroxyimino-Gruppe führen und somit die Fähigkeit, NO freizusetzen, wiederherstellen.

Da die Verwendung von Kupfer(II)-Ionen bei der Vermessung der Oxime stets eine Verbesserung der Ergebnisse gebracht hatte, sollte dessen Einfluss auf MOX-DPN ebenfalls untersucht werden.

### **3.2 Ergebnisse der NO-Messung**

In der folgenden Graphik sind die Ergebnisse in  $\mu\text{mol/L}$  angegeben. Als Fehlerindikator wurde die Standardabweichung verwendet. Die Stichprobenanzahl  $n$  beträgt 5.



**Abbildung 55:** Freisetzung von NO aus 3,4-Dephostatin-Derivaten. In der Legende sind die Zusätze aufgeführt. Das Lösemittel ist immer Puffer pH 7,4. Kupfer(II)Ionen wurden nur bei der Untersuchung von Methoxim-3,4-Dephostatin verwendet. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine Probenkonzentration von 1 mol eingesetzte Substanz.

Unter allen hier gewählten Bedingungen setzte Et-DPN mehr NO frei als Me-Et-DPN. Dabei worden bei beiden Substanzen die höchsten Werte nach Zusatz des Oxygenierungssystems erzielt, nämlich 117  $\mu\text{mol/L}$  bei Et-DPN und 54  $\mu\text{mol/L}$  bei Me-Et-DPN, die zweithöchsten Ergebnisse mit 93  $\mu\text{mol/L}$  und 32  $\mu\text{mol/L}$  konnten unter der alleinigen Verwendung des Sauerstoffdonors beobachtet werden. Wie erwartet setzten lediglich diese beiden Substanzen spontan NO frei, während MOX-DPN dieses nicht tat. Mit 52  $\mu\text{mol/L}$  bzw. 8  $\mu\text{mol/L}$  waren diese Ergebnisse jedoch noch etwas höher als nach alleinigem Zusatz des Porphyrins. Diese betragen nur 19  $\mu\text{mol/L}$  bzw. 6  $\mu\text{mol/L}$  und waren somit am niedrigsten. Das zunächst als Negativkontrolle mitgeführte MOX-DPN bildete spontan kein NO. Die Zugabe von FeTPPCI erbrachte ebenfalls ein negatives Ergebnis. Allerdings konnten unter Verwendung des Oxygenierungssystems und auch unter alleiniger Verwendung des Sauerstoffdonors kleine Stickstoffmonoxidmengen gemessen werden. Diese erhöhten sich leicht durch die zusätzliche Gabe von Kupfer(II)-sulfat.

### **3.3 Diskussion der Ergebnisse**

Die Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Werte unter Einsatz des Oxygenierungssystems bestärkt die These, dass bei der NO-Freisetzung aus *N*-Nitrosaminen CytP450 beteiligt ist.

Es konnte anhand von *N*-Nitroso-*N*-oxybenzamidin gezeigt werden, dass die Substitution des Benzol-Ringes in para-Position einen direkten Effekt auf Stabilität, Oxidationsfähigkeit und Enzymkinetik dieser Substanzen hat <sup>[115]</sup>. Dabei wurde festgestellt, dass elektronenziehende Reste die NO-Freisetzung erniedrigen, während elektronenschiebende Reste diese erhöhen, und zwar umso mehr je stärker dieser Effekt ist.

Das Modell lässt sich aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft auf Dephostatine übertragen. Dieses erklärt, warum Et-DPN mehr NO freisetzt als Me-Et-DPN, da Hydroxyl-Gruppen stärker elektronenschiebend wirken als Methoxy-Gruppen. Eine Abhängigkeit des enzymatischen Abbaus von der Art des para-Substituenten konnte anhand unseres Oxygenierungssystems jedoch nicht

beobachtet werden. Es waren keine Unterschiede in den Verhältnissen der Werte unter den verschiedenen Zusätzen zu beobachten.

Das positive NO-Ergebnis aus MOX-DPN nach Zugabe des Oxygenierungssystems ist als ein Hinweis auf eine O-Desalkylierung der Hydroxyimino-Gruppe zu verstehen, die durch das Enzym-Modellsystem vermittelt wurde. Die die zusätzliche Steigerung der Ausbeute durch Kupfer(II)-sulfat bestätigt diese Annahme, da durch die Entkopplung ein O-unsubstituiertes Oxim frei wird.

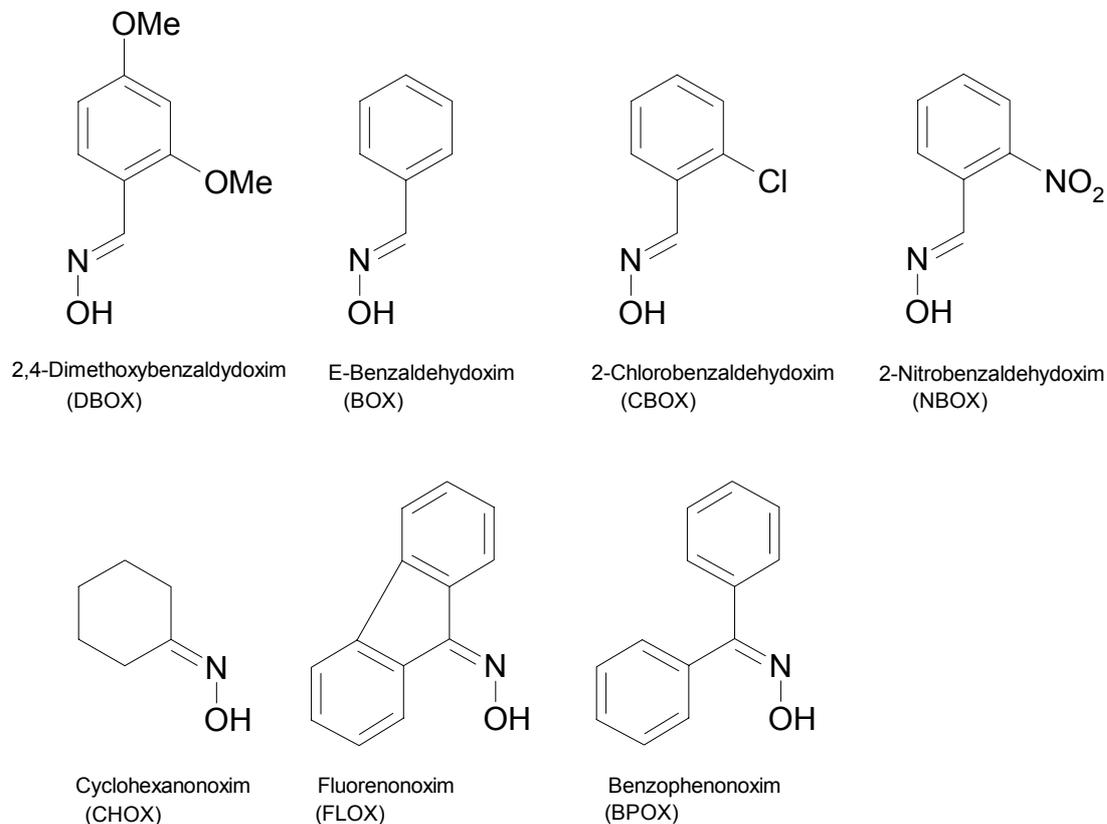
In der Literatur wurde im Jahre 2002 der Metabolismus von dem Makrolid-Antibiotikum Roxithromycin <sup>[116]</sup>, das eine O-alkylierte Oxim-Struktur aufweist, dargestellt. Hier wurde gezeigt, dass es zu einer metabolischen, NADPH-abhängigen Abspaltung dieser Alkyl-Kette kommt. Das liefert einen Hinweis auf das oben beschriebene Phänomen, denn das Oxygenierungssystem wurde konzipiert um enzymatische metabolische Prozesse zu imitieren. Das auf diese Weise desalkylierte MOX-DPN sollte nach den Ergebnissen in dieser Arbeit NO freisetzen können.

Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse wären weitere Untersuchungen der Porphyrin-katalysierten NO-Freisetzung aus O-alkylierten Oximen von Interesse.

## 4. Zusammenfassung

Diese Arbeit behandelt im Wesentlichen die Untersuchung der NO-Freisetzung aus Oximen. Der mögliche Einfluss von Cytochrom P450 auf diese Freisetzung wurde durch ein in unserem Arbeitskreis bereits etabliertes biomimetisches Modellsystem, bestehend aus einem niedermolekularen Metall-Porphyrin-Komplex und Iodosobenzol als Sauerstoffdonor, imitiert.

Die Quantifizierung der freigesetzten NO-Mengen erfolgte mit Hilfe der bis in den picomolaren Konzentrationsbereich empfindliche Chemilumineszenzmethode.



**Abbildung 56:** In dieser Studie untersuchte Oxime; obere Reihe: Aldoxime, untere Reihe: Ketoxime.

Die NO-Freisetzung aus den in dieser Studie untersuchten Oximen kann sehr unterschiedlich ausfallen. Sie hängt nicht nur von den äußeren Bedingungen, sondern auch sehr von dem molekularen Aufbau ab. Folgende strukturelle Aspekte spielen bei der NO-Freisetzung aus diesen Hydroxyimino-Verbindungen eine Rolle:

- Die NO-Bildung aus Ketoximen kann im Gegensatz zu Aldoximen durch Porphyrine im neutralen Milieu gesteigert werden.
- Elektronenziehende Reste können bei Benzaldehydoxim-Derivaten auch bei pH 7,4 in Porphyrin-Anwesenheit zu einer Erhöhung der Ausbeute führen.
- Die gebildete NO-Menge sinkt in folgender Reihenfolge:  
Ketoxime > Aldoxime > cycloaliphatische Ketoxime  
Dafür werden neben der unterschiedlichen Mesomeriestabilität intermediär gebildeter Iminoxy-Radikale, eine durch die Struktur bedingte verbesserte Spaltbarkeit und sterische Gründe verantwortlich gemacht. Letztere bewirken die intermediäre Ausbildung eines dimerähnlichen Moleküls, welches sich sehr schnell und irreversibel zersetzt.
- Elektronenschiebende Reste bewirken eine verbesserte Oxidierbarkeit, die zu erhöhter NO-Ausbeute führen kann.

Es konnten dabei vier verschiedene mögliche Freisetzungsmechanismen postuliert werden, die auch parallel zueinander ablaufen können (s. 2.13):

1. über die Hydrolyse zum NO-Donor Hydroxylamin (s. 2.10.1 und Abb. 47)
2. durch die Reaktion mit dem Sauerstoff-Donor (s. Abb. 50)
3. durch die Reaktion mit Kupfer(II)-Ionen (s. Abb. 52)
4. durch die katalytische Reaktion mit Porphyrinen (s. Abb. 51)

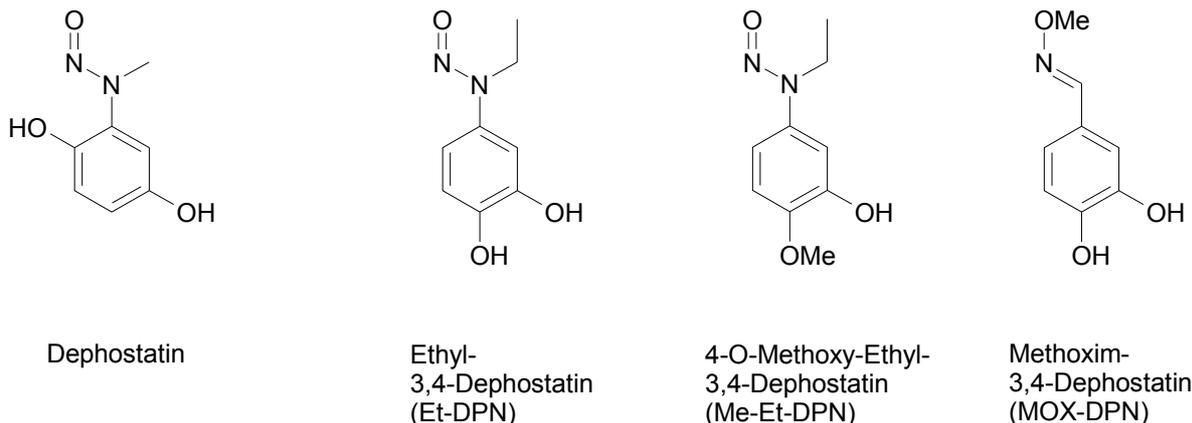
Diese mechanistischen Vorstellungen konnten durch den kolorimetrischen Hydroxylamin-Nachweis, den DC-Nachweis der entsprechenden Carbonylverbindung am Beispiel von FLOX, sowie die Untersuchung des Nitroxyl-Donors Angeli's Salz mit Hilfe der Fluorimetrie und Chemilumineszenzmethode bestätigt werden. Des Weiteren tragen diverse Untersuchungen in vorangegangenen Arbeiten in unserem Arbeitskreis, sowie zahlreiche Angaben in der Literatur zur Bekräftigung dieser Reaktionsvorschläge bei.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigen nicht nur die These, dass der NO-Donor Hydroxylamin intermediär Nitroxyl-Anionen bildet. Zusätzlich deuten sie an, dass dieses Intermediat bei der NO-Freisetzung aus Oximen, die sich nach den Mechanismen 1.-3. zersetzen, ebenfalls gebildet wird. Lediglich durch die Porphyrin-katalysierte Reaktion (4.) kommen NO<sup>-</sup> zwischenzeitlich nicht vor.

Frühere Untersuchungen an verschiedenen Hydroxyimino-Verbindungen zeigten, dass all diese NO über die intermediäre Bildung von Hydroxylamin bilden. Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit nur für einige Oxime gezeigt werden. Dieser Aspekt ist in Hinblick auf die Hämtoxizität bisher untersuchter Oxime wichtig, da diese von einer Hydrolyse im Blut herrühren soll.

Der Vergleich der Chemilumineszenzbestimmung von Angeli's Salz, Hydroxylamin und FLOX (beispielhaft für die Oxime) zeigt, dass die Oxidation zu Nitrit nicht nur vom Stickstoffmonoxid sondern auch von  $\text{NO}^-$  aus geht. Dabei scheint der elektronische Zustand eine wichtige Rolle zu spielen. Singulett-Nitroxyl scheint in Gegenwart des Iodosobenzols eher zu Nitrit zu reagieren als zu NO. Bei Triplett-Nitroxyl entsteht unter diesen Bedingungen mehr Stickstoffmonoxid. Kupfer(II)-Ionen reagieren mit beiden Nitroxyl-Varianten nur bis zum NO.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit die Stickstoffmonoxid-Freisetzung anhand bis dato nicht als NO-Donor bekannter Derivate des Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Dephostatin gezeigt und untersucht werden. Die Erhöhung der NO-Ausbeute aus diesen Substanzen durch Verwendung des biomimetischen Systems deutet dabei eine Stickstoffmonoxid-Freisetzung unter Enzymbeteiligung an.



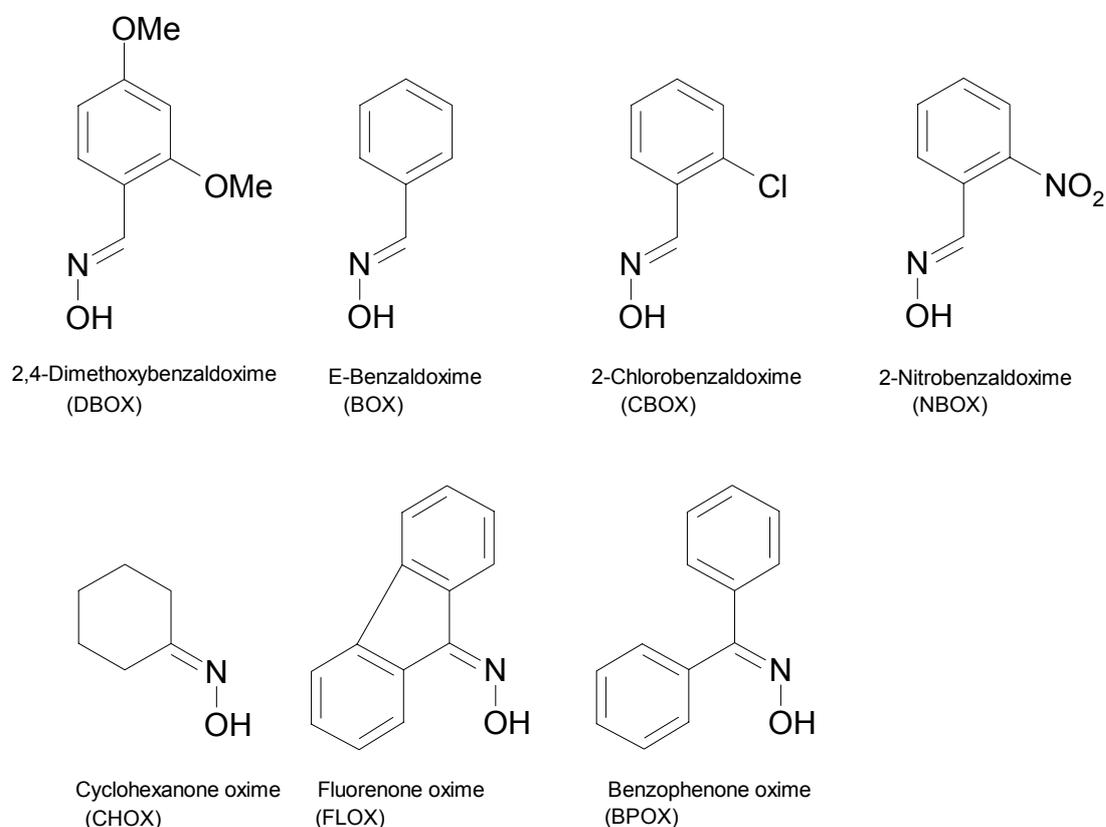
**Abbildung 57:** *Untersuchte Dephostatin-Derivate. Während Dephostatin als NO-Donor bereits bekannt war, konnte die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus den Derivaten Et-DPN und Me-DPN in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden. Auch das eigentlich als Negativ-Kontrolle mitgeführte MOX-DPN setzte in Gegenwart des Oxygenierungssystems kleine Mengen NO frei.*

Das positive Ergebnis eines als Negativ-Kontrolle mitgeführten O-alkylierten Oxims nach Zugabe des Oxygenierungssystems, eröffnet neue Ansätze in der Anwendung unseres biomimetischen Modells.

## 5. Summary

The principal subject of this work was to investigate NO generation from oximes. To analyze whether the released amount of NO was affected by the cytochrome-P450 we used a cytochrome-P450 model system consisting of low molecular weight metal complex and iodosobenzene as oxygen donor. This system had been tried and tested.

The quantification of nitric oxide was carried out by chemiluminescence method, which is sensitive down to the picomolar concentration rate.



**Figure 56:** Investigated oximes in this study; upper series: aldoximes, lower series: ketoximes

The NO-release from the compounds investigated in this study can be very variable. It does not only depend on the outside influences but also on their molecular structure. The following structural aspects play a role for the generation of nitric oxide from oximes:

- The NO-release from ketoximes increases in the presence of porphyrines at the pH 7,4. The NO-release of aldoximes does not.
- The yield of NO from benzaldehyde oximes enhances in the presence of porphyrines at pH 7,4 by electron poor substituents.
- The generated amount decreases in the following order:  
ketoximes > aldoximes > cycloaliphatic ketoximes  
This supposed to be caused by the mesomerism stability of the iminoxy radical, the enhanced fissionability as a result of the ketoxime structure and steric reasons. The latter effects the formation of a dimer, whose decomposition is fast and irreversible.
- The ability of oximes to be oxidised increases by electron rich substituents. Thereby the NO generation can be increased.

We were able to postulate four distinct mechanisms suggested which can react parallel to each other (chap. 2.13):

1. NO release running over the formation of hydroxylamine (chap. 2.10.1 and fig. 47).
2. reaction with iodosobenzene (fig. 50)
3. reaction with copper(II)-ions (fig. 52)
4. katalytical reaction with porphyrines (fig.51)

These hypothetical mechanisms were confirmed by colorimetric determination of hydroxylamine (chap. 2.10.2) as well as by DC-identification of the corresponding oxo-compound fluorenone. The results of the examination of the nitroxyl donor Angeli's salt by fluorimetry and chemiluminescence affirmed these presumptions, too. Several bibliographical references as well as former investigations in our work group also contributed to the affirmation.

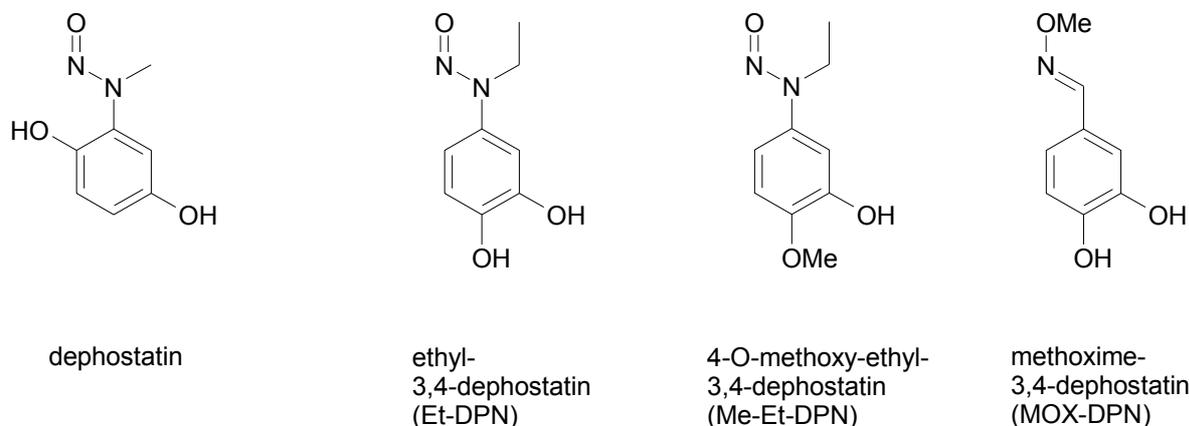
The results of this study confirm that the hydroxylamine release NO by the production of nitroxyl.  $\text{NO}^-$  seems to be the intermediate of the mechanisms 1. – 3. as well. Merely the porphyrin catalysed NO release doesn't yield this intermediate.

The common mechanism for NO release derived for compounds with hydroxyiminopartial structure with the intermediate hydroxylamine as NO donor was shown in former investigations. This could be demonstrated only for some oximes in

this study, which is noteworthy with regard to the haemotoxicity of these compounds. The toxic effect can be caused by the hydrolysis to give hydroxylamine.

By comparing the results of the chemiluminescence measurement from Angeli's salt, hydroxylamine and FLOX (to be indicative of the oximes) it was shown that the oxidation to yield nitrite need not only have come from nitric oxide but also from nitroxyl. This seems to be dependend on the electronic state of  $\text{NO}^-$ . The reaction of singlet nitroxyl with iodosylbenzene gives nitrite rather than NO whereas triplet nitroxyl is more likely to yield nitric oxide under the same conditions. Copper sulphate reacts with both types to give NO.

In addition, the NO release from derivates of the protein-tyrosine phosphatase inhibitor dephostatin, which, so far, has not been known as nitric oxide donor, was investigated. The amount increased in the presence of the model system, which indicates a potential influence of cytochrome-P450.



**Figure 57:** Investigated dephostatines in this study

While dephostatin is a known nitric oxide donor, the NO release from Et-DPN and Me-DPN was shown for the first time in this work. Even the negative control MOX-DPN generated a few amounts in the presence of the model system.

In the presence of the model system NO generation from an O-alkylated oxime as negative control was detected. This result can be the basis of further researches into the NO release from these compounds.

## **6. Anhang**

### **6.1 Experimenteller Teil**

#### **6.1.1 Geräte**

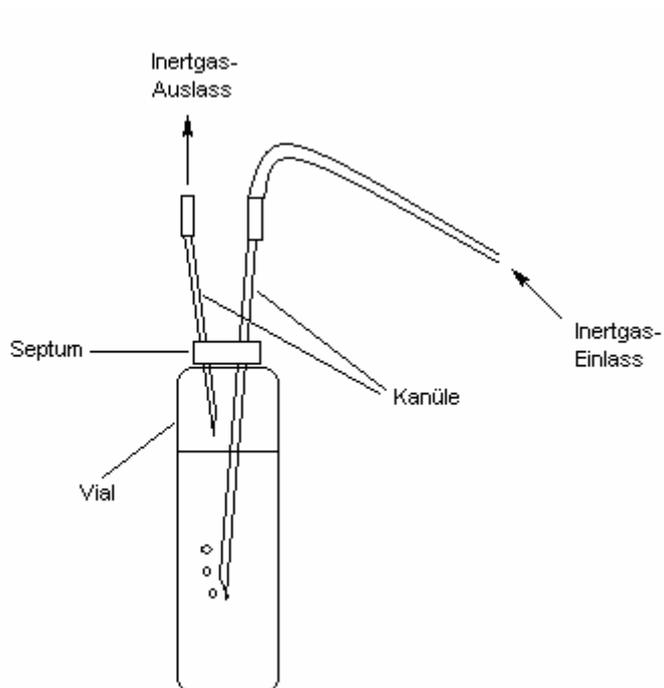
NO-Analyzer:	Siervers 280 Nitric Oxide Analyzer NOA™
Fluorimeter:	Jasco FP 750 Spectrofluorimeter
pH-Meter:	Metrohm 632 pH-Meter, Glaselektrode Methrom 6.0203.000
UV/Vis-Spektrometer:	Shimadzu UV-160 UV/ Visible Recording Spectrophotometer
Ultraschallbad:	Sonorex Bandelin TK 52 H
Waagen	Sartorius micro M 500 P AD&D Instruments LTD HR-120
Wasserbad	Haake Ch Haake F3
UV/Lampe	Lamag Universal-UV-Lampe 254 nm

### 6.1.2 Verwendete Gase

Argon 6.0, Firma Linde (Inertgas)

Carbogen (95 % Sauerstoff + 5 % Kohlendioxid), Firma Linde (Ozon-Generierung)

Wurden mit Hilfe von Argon Lösungen oder Gefäße durch Begasung anaerobisiert, so erfolgte dieses gemäß Abbildung 58 während eines Zeitraumes von 20 Minuten.



**Abbildung 58:** Aufbau für die Anaerobisierung von Lösungen im Vial mit Hilfe von Argon 6.0.

### 6.1.3 Verwendete Spritzen

100  $\mu$ L; 1 mL Hamilton Syringe, Hamilton Company

10  $\mu$ L; 25  $\mu$ L; 50  $\mu$ L; 100  $\mu$ L Exmire Microsyringe, ITO Corporation

## 6.1.4 Methoden

### 6.1.4.1 Chemilumineszenzmethode

*Gerätespezifikationen Sievers NOA™280*

Empfindlichkeit: < 1 pM NO

Messbereich: nM-mM

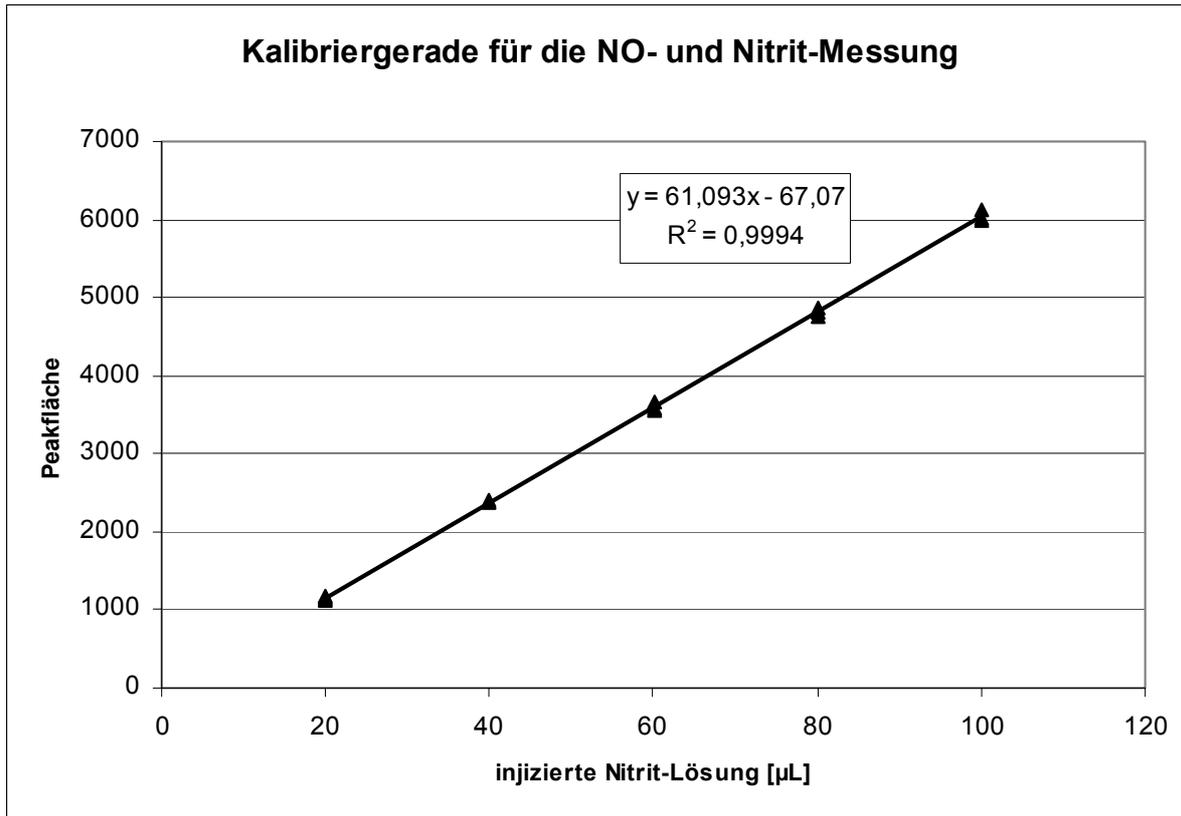
Wiederholbarkeit: ± 5 %

Alle Angaben beziehen sich auf die Messung aus flüssigen Systemen (Liquid-Methode, s. 2.6.3).

#### *Kalibrierung*

#### NO-und Nitrit-Messung

Da Nitrit in essigsaurer Kaliumiodid-Lösung quantitativ zu NO reagiert, wurde der NO-Analyzer für die Bestimmung von sowohl NO als auch Nitrit mit einer 5 µM Kaliumnitrit-Lösung kalibriert. Es wurden dafür 5 definierte Volumina mit einer gasdichten Spritze jeweils dreimal in das mit 5 mL essigsaurer Kaliumiodid-Lösung gefüllte Reaktionsgefäß injiziert. Aus der Integration der erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit der verschiedenen Nitritmengen wurde folgende Gerade erhalten:



**Abbildung 59:** Kalibriergerade für die Bestimmung von NO und Nitrit.

Die Kalibrierung wurde zu Beginn jedes Messtages mit einer frisch hergestellten 5 µM Kaliumnitritstandard-Lösung durchgeführt. Damit wurde im Laufe des Tages die Genauigkeit der Kalibriergerade in regelmäßigen Abständen überprüft und falls erforderlich, eine neue aufgenommen.

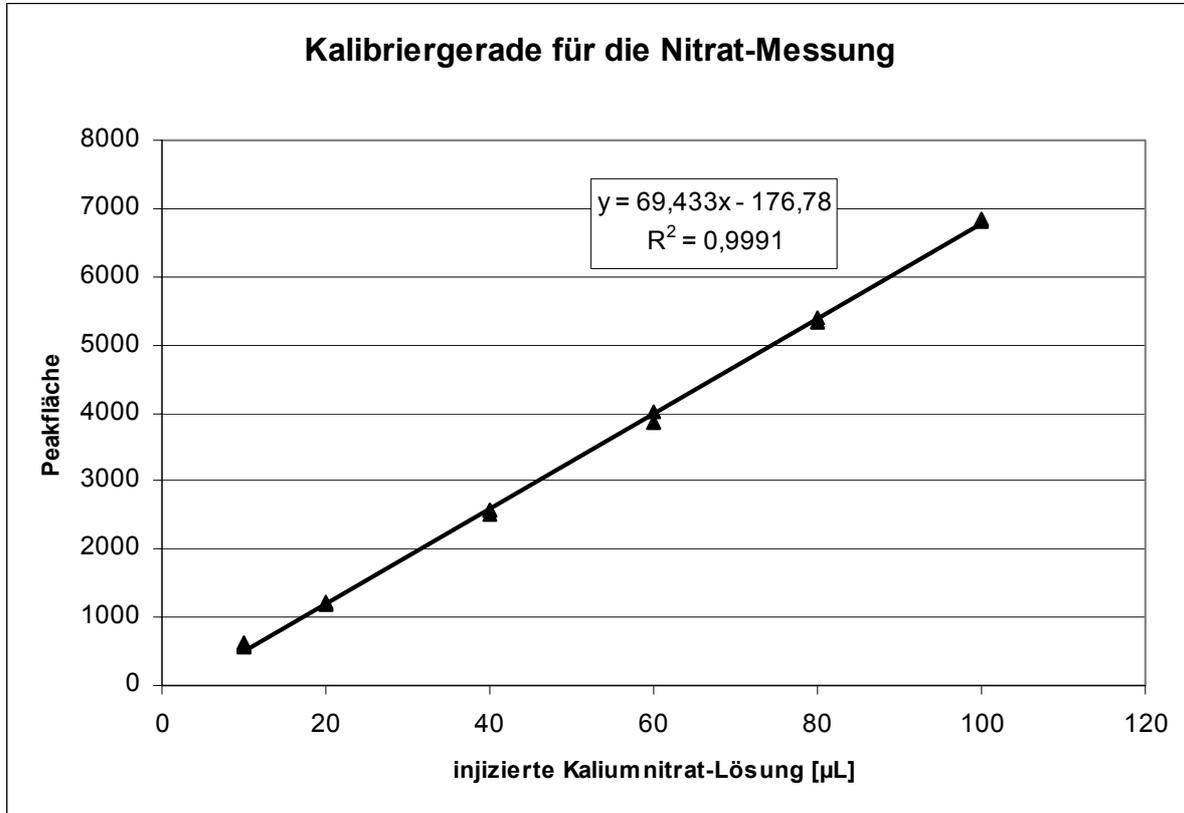
Das Reaktionsgefäß wird mit 4 mL Eisessig und 1 mL 1 %ige Kaliumiodid-Lösung befüllt, mit Argon anaerobisiert und auf 37°C temperiert.

### Nitrat-Messung

Nitrat wurde durch eine salzsaure, gesättigte Vanadium(III)-chloridlösung bei 95°C zu NO reduziert. Für die Herstellung dieses Reduktionsgemisches werden 0,2 g Vanadiumchlorid mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt, auf 25,0 mL mit Aqua dest. aufgefüllt und filtriert. 5 mL dieser Lösung werden in das Reaktionsgefäß des Messgerätes gegeben, mit Argon anaerobisiert und auf 95°C temperiert.

Für die Kalibrierung für die Nitrat-Messung wurden 5 definierte Volumina einer 100 µM Kaliumnitrat-Lösung mit einer gasdichten Spritze jeweils dreimal in das mit

5 mL salzsaurer Vanadiumchlorid-Lösung gefüllte Reaktionsgefäß injiziert. Aus der Integration der erhaltenen Peakflächen in Abhängigkeit der verschiedenen Nitrat-Mengen wurde folgende Gerade erhalten:



**Abbildung 60:** Kalibriergerade für die Bestimmung von Nitrat.

Die Aufnahme der Kalibriergerade erfolgte mittels einer frisch angesetzten 5 µM Kaliumnitratstandard-Lösung zu Beginn jedes Messtages. Über den Tag wurde mit diesem Standard in regelmäßigen Abständen die Genauigkeit der Geraden überprüft und falls notwendig eine neue aufgenommen.

### *NO-Messung*

Das entsprechende Lösungsmittel wurde zusammen mit den Zusätzen in dem Reaktionsgefäß des NO-Analyzers wie folgt vorgelegt:

- 50 µL PhIO-Lösung, 10fache Probenkonzentration in Ethanol
- 50 µL Porphyrin-Lösung (FeTPPCI, MnTPPCI oder FeTFPPCI), äquimolar zur Probenkonzentration in Ethanol

- 50 µL Kupfer(II)-sulfat-Lösung, äquimolar zur Probenkonzentration
- 50 µL Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung, äquimolar zur Probenkonzentration
- 2,5-4 mL Puffer (Vorsicht: Schaumentwicklung!): Citratpuffer 0,1 M pH 4,5; Phosphatpuffer 0,07 M pH 7,4; Boratpuffer 0,1 M pH 9,0

Die Volumina der Zusätze richteten sich dabei nach dem eingespritzten Probenvolumen. Es sollte immer dieselbe Menge an Probe und Zusätzen zugefügt werden.

Nach der Zugabe der Zusätze und des Lösemittels (Pufferlösungen pH 4,5; 7,4; 9,0; s. oben) wird abgewartet, bis die Basislinie wieder erreicht ist (dies kann einige Minuten dauern) und die Probe-Lösung durch das Septum mit Hilfe einer Spritze injiziert:

- 50 µL Probe-Lösung 6 mM in Ethanol

Das eingespritzte Probenvolumen und somit auch das Volumen der Zusätze richtete sich nach der Höhe der erhaltenen Peaks und sollte optimalerweise zwischen 10 bis 100 µL liegen.

### *Nitrit- und Nitrat-Messung*

Für die Bestimmung von Nitrit wurde das Reaktionsgefäß (Vessel) des NO-Analyzers mit dem Reduktionsmittel, bestehend aus 4 mL Eisessig und 1 mL 1 %iger Kaliumiodid-Lösung, befüllt und auf 37°C temperiert. Für die Nitrat-Messung bestand das Reduktionsgemisch lediglich aus einer gesättigten Vanadium(III)-chlorid-Lösung in 1 N Salzsäure. Das Vessel musste hierzu auf 95°C erhitzt werden. Zusätzlich wurde ein mit 20 mL 1 N Natronlauge gefüllter „Gasbubblers“ zwischengeschaltet um das Gerät vor eintretenden Säuredämpfen zu schützen.

Die Freisetzungsreaktion konnte aufgrund dieser Reduktionsgemische nur in einem externen Vial durchgeführt werden. Dieses wurde zunächst mit den entsprechenden Zusätzen und Puffer befüllt:

- 50 µL PhIO-Lösung, 10 fache Probenkonzentration in Ethanol
- 50 µL Porphyrin-Lösung (FeTPPCI, MnTPPCI oder FeTFPPCI), äquimolar zur Probenkonzentration in Ethanol

- 50 µL Kupfer(II)-sulfat, äquimolar zur Probenkonzentration
- 50 µL Kaliumhexacyanoferrat(III), äquimolar zur Probenkonzentration
- ad 2 mL Puffer: Citratpuffer 0,1 M pH 4,5; Phosphatpuffer 0,07 M pH 7,4; Boratpuffer 0,1 M pH 9,0

Die auf diese Weise befüllten Vials wurden mit einem Septum verschlossen und in einem Wasserbad auf 37°C temperiert. Danach erfolgte die Injektion der Probenlösung durch das Septum mit Hilfe einer Spritze und die Inkubation im Wasserbad bei 37°C.

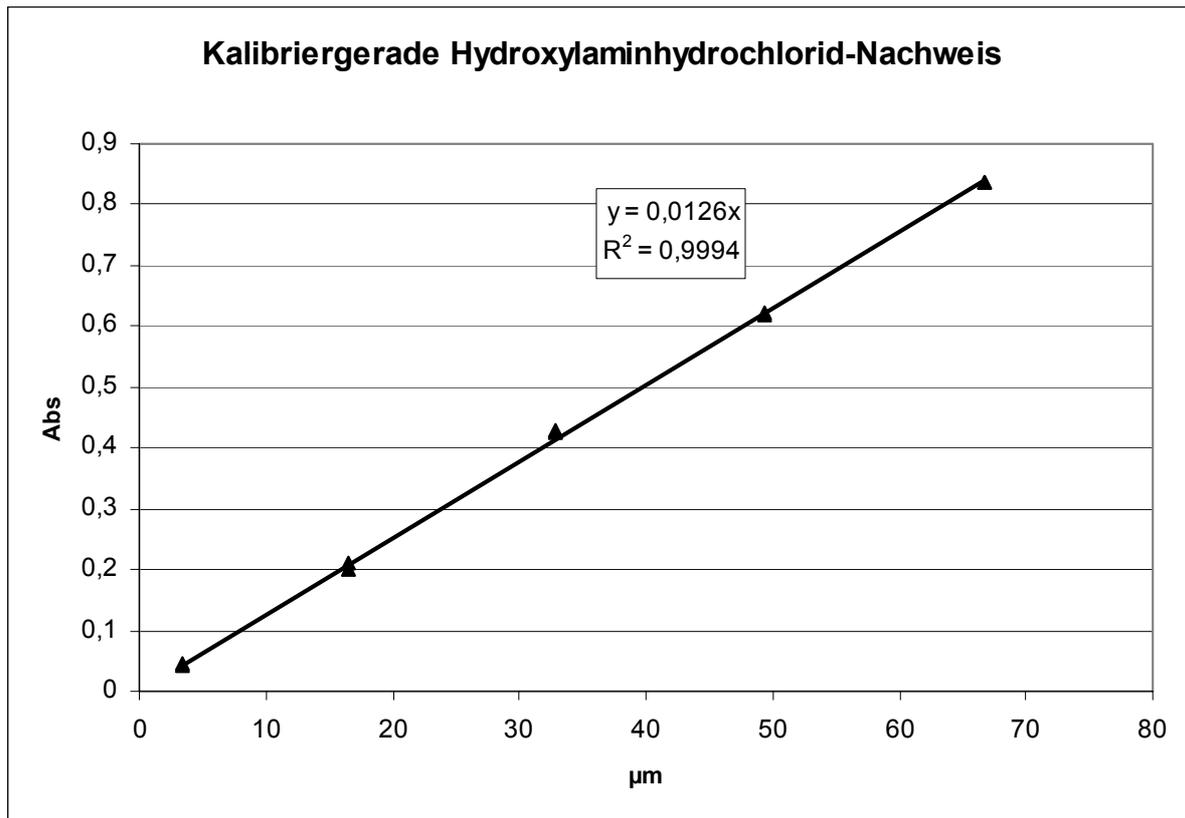
- 50 µL Proben-Lösung; 0,5 mM; 1 mM; 5 mM in Ethanol

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde ein definiertes Volumen des Vial-Inhaltes ebenfalls mit Hilfe einer Spritze in das Reaktionsgefäß des NO-Analyzers injiziert. Dieses Volumen richtete sich nach der Höhe der erhaltenen Peaks und lag zwischen 10-100 µL.

#### **6.1.4.2 Hydroxylamin-Nachweis**

##### *Kalibrierung*

Die Kalibrierung für den Hydroxylamin-Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Hydroxylaminhydrochlorid-Lösungen. Dabei wurden fünf verschiedene Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen hergestellt. 1 mL dieser Kalibrierlösung wurde mit 1 mL ethanolischer 1 %iger 8-Hydroxychinolin-Lösung und 1 mL 1 M Natriumcarbonat-Lösung versetzt, gut geschüttelt und nach 30 Minuten vermessen. Für jede Konzentration wurden drei Ansätze hergestellt.



**Abbildung 61:** Kalibriergerade für den Nachweis von Hydroxylaminhydrochlorid-Nachweis.

### Probenvermessung

Die Untersuchungslösungen wurden zunächst in einem gut verschließbaren Schnappdeckelglas angesetzt:

- 40 µL Proben-Lösung 250 mM in Ethanol
- 40 µL PhIO-Lösung, äquimolar zur Probenkonzentration in Ethanol
- 40 µL Kupfer(II)-sulfat-Lösung äquimolar zur Probenkonzentration
- immobilisiertes Porphyrin<sup>\*</sup>, äquimolar zur Probenkonzentration
- ad 1 mL Puffer: Citratpuffer pH 0,1 M 4,5; Phosphatpuffer 0,07 M pH 7,4; Boratpuffer 0,1 M pH 9,0

<sup>\*</sup> Nach einer Vorschrift von A. N. Luebbe (AK Duchstein) immobilisiert; wird demnächst veröffentlicht. Aufgrund der starken Eigenfarbe der Porphyrine konnte für diesen Nachweis lediglich ein an einen Träger gekoppeltes und vor der Vermessung abgetrenntes FeTPPCl verwendet werden.

Diese Lösungen wurden unterschiedlich lange inkubiert. Die Zeitspanne reichte je nach Versuchsziel zwischen sofortiger Weiterverarbeitung bis mehrere Tage. Nach Zugabe von jeweils

- 1 mL frisch hergestellte 1 %ige 8-Hydroxychinolin-Lösung in Ethanol und
- 1 mL 1 M Natriumcarbonat-Lösung

Wurde das Gemisch wieder je nach Intention zwischen 30 Minuten und 24 Stunden inkubiert und danach am UV/Vis-Spektrometer vermessen.

### **6.1.4.3 Fluorimetrischer Peroxynitrit-Nachweis**

#### *Herstellung des Fluoreszenz-Indikators*

Zunächst wurde eine 7 mM ethanolische Stammlösung aus 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat hergestellt. Diese kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff in einem mit Argon gespülten Gefäß einige Zeit gelagert werden. Daraus wurde kurz vor dem Gebrauch durch Verdünnen mit 20 mM Natronlauge (Esterhydrolyse) die 1 mM Gebrauchslösung (Dichlorordihydrofluorescein, DCDHF) hergestellt. Diese war unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff in Eiswasser mehrere Stunden haltbar.

#### *Herstellung der Angeli's Salz-Lösung*

Für die Herstellung einer 10 mM Stammlösung wurde 12,2 mg  $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$  in einen mit Argon anaerobisiertes Vial gegeben und mit 10 mL ebenfalls anaerobisierter 10 mM Natronlauge befüllt. Diese Lösung ist unter Inertgas und Lichtausschluss bei  $-30^{\circ}\text{C}$  wenige Tage stabil <sup>[106]</sup>. Aus dieser Stammlösung wurde die 1 mM Probe-Lösung durch Verdünnen mit 10 mM Natronlauge erhalten. Letztere war ebenfalls im Eisbad zu lagern.

### *Vial-Inhalt*

Die Inkubation aller Reaktionsgefäße erfolgte unter strengem Lichtausschluss. Falls anaerobe Bedingungen vorherrschen sollten, wurden alle verwendeten Lösungen sowie die Vials mit Hilfe von Argon anaerobisiert.

- 30 µL Probe 1 mM in 10 mM NaOH
- 30 µL DCDHF 1 mM in 20 mM NaOH
- 30 µL CuSO<sub>4</sub> 1 mM in Aqua dest.

#### **6.1.4.4 Dünnschichtchromatographie**

DC-Platten: DC-Microkarten Polygam<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel, 40 x 80 mm, Schichtdicke 0,25 mm

Alle Untersuchungen wurden über eine Laufstrecke von 5 cm mit Kammersättigung durchgeführt. Als Laufmittel diente Dichlormethan.

Alle Ansätze wurden in einem verschließbaren Reaktionsgefäß wie folgt angesetzt:

- 50 µL Probe 5 mM in Ethanol
- 50 µL PhIO 50 mM in Ethanol
- 50 µL Porphyrin (FeTPPCI) 5 mM in Ethanol
- ad 1 mL Puffer: Citratpuffer 0,1 M pH 4,5; Phosphatpuffer 0,07 M pH 7,4; Boratpuffer 0,1 M pH 9,0

## 6.1.5 Pufferlösungen

### 6.1.5.5 Herstellung der Pufferlösungen

*Citratpuffer 0,1 M pH 4,5:*

66,4 mL Lösung A + 33,6 mL Lösung B, eingestellt mit 1 M NaOH

Lösung A: 0,1 M Dinatriumcitrat

21,04 g/L Citronensäuremonohydrat in 200 mL 1 M NaOH

Aqua dest. ad 1000 mL

Lösung B: 0,1 N HCL

*Phosphatpuffer 0,07 M pH 7,4:*

19,7 mL Lösung A + 80,3 mL Lösung B, eingestellt mit konz. HCl

Lösung A: 0,07 M Kaliumdihydrogenphosphat 9,07 g/L

Lösung B: 0,07 M di-Natiumhydrogenphosphat-Dihydrat 11,87 g/L

*Boratpuffer 0,1 M pH 9,0:*

83,5 mL Lösung A + 16,5 mL Lösung B

Lösung A: 0,1 M Borax

12,37 g Borsäure + 4 g NaOH in 1000 mL Aqua dest.

Lösung B: 0,1 M HCl

### 6.1.5.6 Einstellung der Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden mit einem pH-Meter und einer Glaselektrode eingestellt. Die Kalibrierung der Glaselektrode wurde vor jeder Einstellung nach Ph. Eur. mit folgenden Reagenzien durchgeführt <sup>[117]</sup>:

- Kaliumhydrogenphthalat-Lösung 0,05 M für pH 4,1
- Kaliumhydrogenphosphat-Lösung 0,009 M und Natriummonohydrogenphosphat-Lösung 0,03 M für pH 7,41
- Natriumcarbonat-Lösung 0,025 M und Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,025 M für pH 10,0

### 6.1.6 Verwendete Substanzen

Benzophenonoxim	Acros 34233
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Acros 12404
E-Benzaldehydoxim	Aldrich 24,567-4
2-Chlorobenzaldehydoxim	Aldrich 53,323-8
FeTFPPCI	Aldrich 25,291-3
FeTPPCI	Aldrich 25,907-1
MnTPPCI	Aldrich 25,475-4
2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	Alexis 610-022
Dichlormethan	Fluka 66749
Hydroxylaminhydrochlorid	Fluka 55460
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka 60299
Kaliumnitrat	Fluka 60419
Kaliumnitrit	Fluka 60417
Cyclohexanonoxim	Lancaster 11221
2,4-Dimethoxybenzaldehydoxim	Lancaster 9894
9-Fluorenonoxim	Lancaster 3950
2-Nitrobenzaldehydoxim	Lancaster 2549
Borsäure	Merck 100165
Citronensäure-Monohydrat	Merck 100243
8-Hydroxychinolin	Merck 820261
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 104871
Kaliumhydrogenphthalat	Merck 104874
Kaliumiodid	Merck 105040
Kupfer(II)-sulfat	Merck 102792
Natriumcarbonat	Merck 106398
Natriumhydrogencarbonat	Merck 106323
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck 106580
Natriumhydroxid	Merck 106462
Vanadium(III)-chlorid	Merck 112393

**6.2. Gefahrenstoffverzeichnis**

Stoffname	Gefahrensymbol	R-und S-Sätze
Aceton	F	R: 11 S: 2-3.2-9-16-33
E-Benzaldehydoxim	Xn	R: 36/37/38 S: 26-37/39
Benzophenonoxim	Xn	S: 24/25
2-Chlorobenzaldehydoxim	Xi	R: 36/37/38 S: 26-36
Citronensäure-Monohydrat	Xi	R: 36 S: 26
Cyclohexanonoxim	Xn	R: 22 S: 24/25
Dichlormethan	Xn	R: 40 S: 23.2-24/25-36/37
5,10,15,20,-Tetraphenyl-21 <i>H</i> ,32 <i>H</i> - porphyrin-eisen(III)-chlorid	Xi	R: 36(37/38 S: 26-37/39
Essigsäure 100 % (Eisessig)	C	R: 10-35 S: 23-26-45
Ethanol	F	R: 11 S: 7-16
Fluorenonoxim	--	S: 22-24/25
Hydroxylaminhydrochlorid	Xn	R: 22-36/38-43- 48/22-50 S: 22-24-37-61
8-Hydroxychinolin	Xn	R: 20/22 S: 24/25
Kaliumhexacyanoferrat(III)	T, N	R: 26/27/28-32-50/53
Kaliumiodid	--	R: 36/37/38-42/43-63 S: 22-26-36
Kaliumnitrat	O	R: 8-22-36/37/38 S: 7-17-26-36
Kaliumnitrit	O, T, N	R: 8-25 S: 45
Kupfer(II)-sulfat	Xn, N	R: 22-36/38 S: 22
Natriumcarbonat	Xi	R: 36 S: 22-26
Natriumhydroxid	C	R: 35 S: 26-37/39-45
2-Nitrobenzaldehydoxim	Xn, Xi	R: 36/37/38 S: 26-36/37/38
Salzsäure 1N	--	R: 36/37/38 S: 26-45

Salzsäure konz.	C	R: 35-36/37/38 S: 2-26
Vanadium(III)-chlorid	X	R: 34-20/21/22 S: 3-26-36/37/39/-45

### 6.3 Literaturverzeichnis

1. Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin*, Nature (London), 1980. **288**, 373-376.
2. Ignarro, L. J.; Byrns, R. E.; Buga, G. M.; Wood, K. S. *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical*, Circ. Res., 1987. **61**, 866-879.
3. Kelm, M.; Feelisch, M.; Spahr, R.; Piper, H. M.; Noack, E.; Schrader, J. *Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells*, Biochem Biophys. Res. Commun., 1988. **154**.
4. Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*, Nature (London), 1987. **327**, 524-526.
5. Takeuchi, T.; Suzuki, K.; Yamamoto, H.; al, e. *Cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastric mucosal responses*, J. Physiol. Pharmacol., 1998. **49**, 501-513.
6. Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Anorganische Chemie*, Verlag Chemie, Basel, 1982. **4**, 432-442.
7. Grätzel, M.; Taniguchi, S.; Henglein, A. *Pulse radiolytic study of short-lived products of nitric oxide-reduction in aqueous solution*, Ber. Bunsenges. Phys., 1970. **74**, 1003-10.
8. Miranda, K. M.; Dutton, A. S.; Ridnour, L. A.; Foreman, C. A.; Ford, E.; Paolucci, N.; Katori, T.; Tocchetti, C. G.; Mancardi, D.; Thomas, D. D.; Espey, M. G.; Houk, K. N.; Fukuto, J. M.; Wink, D. A. *Mechanism of aerobic decomposition of angeli's salt (sodium trioxodinitrate) at physiological pH*, J. Am. Chem. Soc., 2005. **127**, 722-731.
9. Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *Autoxidation of hydroxylamine in alkaline solution*, J. Chem. Soc. (A), 1971, 164-168.
10. Feelisch, M.; Stamler, J. S. *Methods in nitric oxide research*, John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
11. Lancaster, J. *Nitric Oxide*, Academic press, San Diego, 1996.
12. Lowenstein, C. J.; Snyder, S. H. *Nitric oxide, a novel biologic messenger*, Cell, 1992. **70**, 705-707.
13. Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. *S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992. **89**, 444-448.

14. Ignarro, L. J.; Murad, F. *Nitric oxide*, Academic Press, San Diego, 1995.
15. Ignarro, L. J.; Degan, J. N.; Baricos, W. H.; Kadowitz. *Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1982. **718**, 49-59.
16. Zabel, U.; Kleinschnitz, C.; Oh, P.; Nedvetsky, P.; Smolenski, A.; Muller, H.; Kronich, P.; Kugler, P.; Walter, U.; Schnitzer, J. E.; Schmidt, H. H. H. W. *Calcium-dependent membrane associate sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide*, *Nature Cell. Biol.*, 2002. **4**, 307-311.
17. Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991. **88**, 4651-4655.
18. Clancy, R. M.; Leszczynska-Piziak, J.; Abramson, S. B. *Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase*, *J. Clin. Invest.*, 1992. **90**, 1116-1121.
19. Guidarelli, A.; Tommasini, I.; Fionari, M.; Cantoni, O. *Essential role of the mitochondrial respiratory chain in peroxynitrite-induced strand scission of genomic DNA*, *IUBMB Life*, 2000. **50**, 195-201.
20. Stichtentoth, D. O. *Nitrogen monoxide. Mediator or marker of chronic inflammation?*, *Internist*, 1997. **38**, 420-426.
21. Olesen, J.; Thomsen, L. L.; Iversen, H. *Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches*, *Trends pharmacol. sci.*, 1994. **15**, 149-53.
22. Paredi, P.; Kharitonov, S. A.; Barnes, P. J. *Elevation of exhaled ethane concentration in asthma*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000. **162**, 1450-4.
23. Stuehr, D. J.; Kwon, N. S.; Nathan, C. F.; Griffith, O. W.; Feldman, P. L.; Wiseman, J. *N<sup>w</sup>-Hydroxy-L-arginin is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*, *J. Biol. Chem.*, 1991. **266**, 6259-63.
24. Clement, B.; Schnoerwangen, E.; kaempchen, T.; Mordvintcev, P.; Muelsch, A. *15N-NMR analysis of 15NG-hydroxy-L-arginine ([15N]L-NHA) and e.s.r. studies of enzymic nitric oxide formation from [15]NL-NHA*, *Portland Press Proceedings*, 1994. **8**, 61-5.
25. Mansuy, D.; Boucher, J. L.; Clement, B. *On the mechanism of nitric oxide formation upon oxidative cleavage of C=N(OH) bonds by NO-synthases and cytochromes P450*, *Biochimie*, 1995. **77**, 661-667.
26. Boucher, J. L.; Genet, A.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Henry, Y.; Mansuy, D. *Cytochrome P450 catalyses the oxidation of N<sup>w</sup>-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrullin*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992. **187**, 880-886.

27. Schott, C. A.; Bogen, C. M.; Vetrovsky, P.; Berton, C. C.; Stoclet, J. C. *Exogenous N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine causes nitrite production in vascular smooth muscle cells in the absence of nitric oxide activity*, FEBS Lett., 1994. **341**, 203-207.
28. Renault, J. P.; Boucher, J. L.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Mansuy, D. *Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N-hydroxy-L-arginine to citrullin and nitrogen oxides and occurrence in NO synthases of a sequence in P450s*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1993. **192**, 53-60.
29. Andrew, P. J.; Mayer, B. *Enzymatic function of nitric synthases*, Cardiovasc. Res., 1999. **43**, 521-531.
30. Abusoud, H. M.; Yoho, L. L.; Stuehr, D. J. *Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism - Activation of intra- and interdomain electron transfer*, J. Biol. Chem., 1994. **269**.
31. Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*, Biochem. J., 2001. **357**, 593-615.
32. Papapetropoulos, A.; Rudic, R. D.; Sessa, W. C. *Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system*, Cardiovasc. Res., 1999. **43**, 509-520.
33. Venema, R. C.; Ju, H.; Zou, R.; Ryan, J. W.; Venema, V. J. *Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase*, J. Biol. Chem., 1997. **272**, 1276-82.
34. Heyn, G. *Tradition mit Zukunft*, Pharm. Ztg., 2003. **45**.
35. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Taschenatlas der Pharmakologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004. **5**, 318-321.
36. Karow, T.; Lang-Roth. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Thomas Karow, Pulheim, 2004. **12**.
37. Mutschler, E.; Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1997. **7**.
38. Harrison, D. G.; Bates, J. N. *The nitrovasodilators - New ideas about old drugs*, Circulation, 1993. **87**, 1461-1467.
39. Blaeser-Kiel, G. *Akutes Lungenversagen: Inhalation von Stickstoffmonoxid*, Dtsch. Ärztebl., 1996. **93**, 348.
40. Gerling, N. *Neuroprotektion und Aktivierung von Neurotrophin-Signaltransduktionswegen durch Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen und durch NO-Donatoren*, Dissertation, 2004.
41. Thomas, G., Ramwell, P.W. *Vascular relaxation mediated by hydroxylamines and oximes: Their conversion to nitrites and mechanism of endothelium dependent vascular relaxation*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989. **164**, 889-893.

42. Glover, R. E., Corbett, J.T, Burka, L.T., Mason, R.P. *In vivo production of nitric oxide after administration of cyclohexanone oxime*, Chem. Res. Toxicol., 1999. **12**, 952-957.
43. Palmen, N. G. M.; Evelo, C. T. A. *Oxidative effects in human erythrocytes caused by some oximes and hydroxylamine*, Arch. Toxicol., 1998. **72**, 270-276.
44. Wang, C. C.-Y., Ho, D.M., Groves, J.T. *Models of nitric oxide synthase: iron(III) porphyrin-catalyzed oxidation of fluorenone oxime to nitric oxide and fluorenone*, J. Am. Chem. Soc., 1999. **121**, 12094-12103.
45. Klages, F. *Lehrbuch der organischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, 1953, 590-592; 660-666.
46. Houben-Weyl. *Methoden der organischen Chemie*, H. Metzger, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968. **10/4**, 269-273.
47. Falbe, J.; Regitz, M. *Römpp Chemielexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992. **9**, 1904-1905; 3173-3174.
48. Everett, S. A.; Naylor, M. A.; Stratford, M. R. L.; Patel, K. B.; Smith, K. A.; Wardman, P. *Aromatic oxime derivatives are substrates for tumor-associated cytochrome P450s and prodrugs for nitric oxide*, Portland Press Proceedings, 2000. **16**, 140.
49. De Lijser, H. J. P., Fardoun, F.H., Sawyer, J.R., Quant, M. *Photosensitized regeneration of carbonyl compounds from oximes*, Org. Lett., 2002. **4**, 2325-2328.
50. Chakravorty, A. *Structural chemistry of transition metal complexes of oximes*, Coord. Chem. Rev., 1974. **13**, 1-46.
51. Kukushkin, V. Y.; Tudela, D.; Pombeiro, A. J. L. *Metal-ion assisted reactions of oximes and reactivity of oxime-containing metal complexes*, Coord. Chem. Rev., 1996. **156**, 333-362.
52. Décout, J.-L., Roy, B., Fontecave, M., Muller, J.-C., Williams, P.H., Loyaux, D. *Decomposition of FK 409, a new vasodilator: Identification of nitric oxide as a metabolite*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995. **5**, 973-978.
53. Chalupsky, K.; Lobysheva, I.; Nepveu, F.; Gadea, I.; Beranova, P.; Entlicher, G.; Stoclet, J.-C.; Muller, B. *Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta: role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle*, Biochem. Pharmacol., 2004. **67**, 1203-1214.
54. Stepanovic-Petrovic, R. M.; Tokic-Vujosevic, Z.; Milovanovic, S.; Cekovic, Z.; Tomic, M. A. *Comparison of the relaxant effects of a new oxime-nitrate derived from isosorbide-5-mononitrate and the parent drug*, Arzneim.-Forsch., 2004. **54**, 195-202.

55. Derelanko, M. J.; Gad, S. C.; Powers, W. J.; Mulder, S.; F., G.; Babich, P. C. *Toxicity of cyclohexanone oxime; I. Hematotoxicity following subacute exposure in rats*, *Fundam Appl Toxicol*, 1985. **5**, 117-127.
56. Stolze, K.; Nohl, H. *Detection of free radicals as intermediates in the methemoglobin formation from oxyhemoglobin induced by hydroxylamin*, *Biochem. Pharm.*, 1989. **38**, 3055-9.
57. Reilly, T. P.; Woster, P. M.; Svensson, C. K. *Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999. **288**, 951-959.
58. King, R. S.; Teitel, C. H.; Shaddock, J. G.; Casciano, D. A.; Kadlubar, F. F. *Detoxification of carcinogenic aromatic and heterocyclic amines by enzymatic reduction of the N-hydroxy derivative*, *Cancer Lett.*, 1999. **143**, 167-171.
59. Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. *Microsomal cytochrome P450 dependent oxidation of N-hydroxyguanidines, amidoximes, and ketoximes: mechanism of the oxidative cleavage of their C:N(OH) bond with formation of nitrogen oxides*, *Biochemistry*, 1998. **37**, 17179-17191.
60. Chandra, S.; Sangeetika. *EPR and electronic spectral studies on copper(II) complexes of some N-O donor ligands*, *J. Indian. Chem. Soc.*, 2004. **81**, 203-206.
61. Brokenshire, J. L.; Roberts, J. R.; Ingold, K. U. *Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. VII. Self-reactions of iminoxy radicals*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972. **94**, 7040-9.
62. Koikov, L. N., Alexeeva, N.V., Lisitza, E.A., Krichevsky, E.S., Grigoryev, N.B., Danilov, A.V., Severina, I.S., Pyatakova, N.V., Granik, V.G. *Oximes, amidoximes and hydroxamic acids as nitric oxide donors*, *Mendeleev Commun.*, 1998. **4**, 165-168.
63. Erbach, C. *Untersuchung von potentiellen NO-Donoren hinsichtlich ihres NO-Freisetzungs-musters und ihrer Stimulationsfähigkeit mittels ausgewählter in-vitro Methoden*, Dissertation, 1999.
64. Tangestaninejad, S.; Habibi, M. H.; Iravani, M. R. *Efficient and mild regeneration of carbonyl compounds from oximes and hydrozones by manganese(III) porphyrin-periodate*, *J. Chem. Research*, 1998. **s**, 456-457.
65. Beyer, H.; Walter, W. *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 1991. **22**.
66. Marques, C. A.; Selva, M.; Tundo, P.; Montanari, F. *Reaction of oximes with dimethyl carbonate: a new entry to 3-methyl-4,5-disubstituted-4-oxazolin-2-ones*, *J. Org. Chem.*, 1993. **58**, 5765.

67. Duchstein, H.-J.; Riederer, S. *Release of nitric oxide from NO-containing drugs. Model reactions in the presence of light and transition metal complexes*, Arch. Pharm. (Weinheim), 1995. **328**, 317-24.
68. Mansuy, D.; Battioni, P. *Metallporphyrins in catalytic oxydation*, Marcel Dekker Inc, New York, 1994, 99-132.
69. Moreira, M. S. M.; Martins, P. R.; Curi, R. B.; Nascimento, O. R.; Iamamoto, Y. *Iron porphyrins immobilised on silica surface and encapsulated in silica matrix a comparison of their catalytic activity in hydrocarbon oxidation*, J. Mol. Catal., 2005. **233**, 73-81.
70. Ricci, M.; Querci, C. *Preparation of epoxides from alkenes using manganese porphyrin catalysts*, Eur. Pat. Appl., 1989, 10 pp.
71. Schmidt, I.; Chiemelewski, P. J. *Nickel(II) complexes of 21-C-alkylated inverted porphyrins: synthesis, protonation, redox properties*, Inorg. Chem., 2003. **42**, 5579-5593.
72. Tabushi, I.; Kodera, M. *Reductive dioxygen activation by use of artificial P-450 systems*, Coord. Chem. Rev., 1988. **86**, 1-42.
73. Runge, I. *Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Hydroxyimino-Verbindungen und Organischen Nitraten*, Dissertation, 2000.
74. Lucas, H. J.; Kennedy, E. R.; Formo, M. W. *Iodosobenzene*, Org. Synth., 1942. **22**, 70-2.
75. Lucas, H. J.; Kennedy, E. R. *Iodoxybenzene. I. Disproportionation of iodosobenzene*, Org. Synth., 1942. **22**, 72-3.
76. Lichtenberger, F.; Nastainczyk, W.; Ullrich, V. *Cytochrome P450 as an oxene transferase*, Biochem Biophys. Res. Commun., 1976. **70**.
77. Jørgensen, K. A. *Transition-metal-catalysed epoxidations*, Chem. Rev., 1989. **89**, 431-458.
78. Groves, J. T.; Lee, J.; Sudhakar, S. M. *Detection and characterization of an oxomanganese(V) pophyrin complex by rapid-mixing stopped-flow spectrophotometry*, J. Am. Chem. Soc., 1997. **119**, 6269-6273.
79. Hildebrandt, H. *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter, Berlin, 1994. **257**.
80. Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *The chemistry of peroxonitrites. Part II. Copper(II)-catalysed reaction between hydroxylamine and peroxonitrite in alkali*, J. Chem. Soc. (A), 1970, 925-928.
81. DeMaster, E. G.; Leopoldo, R.; Archer, S. L.; Weir, E. K. *Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989. **163**, 527-533.

82. Anderson, J. H. *The copper-catalysed oxidation of hydroxylamine*, *Analyst*, 1964. **89**, 357-362.
83. Erlenmeyer, H.; Flierl, C.; Sigel, H. *Zur Cu<sup>2+</sup>-katalysierten Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und Hydrazin bzw. Hydroxylamin*, *Chimia*, 1968. **22**, 433-434.
84. Osseo-Asare, K.; Al-Hinai, A. T. *Elektrochemical behavior of copper in hydroxylamine solution*, *Elektrochem. Soc. Proceed.*, 2001. **2000**, 191-200.
85. Daiber, A.; Ullrich, V. *Radical chemistry in organisms. Nitrogen monoxide, superoxide and peroxynitrite*, *Chem. Unserer Zeit*, 2002. **36**, 366-375.
86. Kono, Y. *Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay of superoxide dismutase*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978. **186**, 189-195.
87. Elstner, E. F.; Heupel, A. *Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase*, *Anal. Biochem.*, 1976. **70**, 616-620.
88. Elstner, E. F.; Stoffer, C.; Heupel, A. *Determination of superoxide free radical ion and hydrogen peroxide as products of photosynthetic oxygen*, *Z. Naturforsch.*, 1975. **30c**, 53-56.
89. Jindal, V. K.; Agrawal, M. C.; Mushran, S. P. *Mechanism of the oxidation of hydroxylamine by ferricyanide*, *J. Chem. Soc. (A)*, 1970, 2060-2062.
90. Bonner, F. T.; Wang, N.-Y. *Reduction of nitric oxide by hydroxylamine. 1. Kinetics and mechanism*, *Inorg. Chem.*, 1985. **25**, 1858-1862.
91. Berg, R.; Becker, E. *Ein neuer Nachweis von Hydroxylamin durch Bildung von Chinolinchinon-(5.8)-[8-oxy-chinoyl-5-imid]-(5), genannt "Indo-oxin"*. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1940. **73.1**, 172-173.
92. Murphy, M. E.; Sies, H. *Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991. **88**, 10860-4.
93. Hobbs, A. J.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J. *Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994. **91**, 10992-10996.
94. Fukuto, J. M.; Hszieh, R.; Gulati, P.; Chiang, K. T.; Nagasawa, H. T. *N,O-Diacylated-N-hydroxyarylsulfonamides: nitroxyl precursors with potent smooth muscle relaxant properties*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992. **187**, 1367-73.
95. Angeli, A.; Angelico, F.; Scurti, F. *Untersuchungen über einige Hydroxamsäuren*, *Rend. Accad. Lincei*, 1902. **1**, 691-693.
96. Dutton, A. S.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. *Mechanisms of HNO and NO production from angeli's salt: density functional and CBS-QB3 theory predictions*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. **126**, 3795-3800.

97. Miranda, K. M.; Paolocci, N.; Katori, T.; Thomas, D. D.; Ford, E.; Bartberger, D. M.; Espey, M. G.; Kass, D. A.; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Wink, D. A. *A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003. **100**, 9196-9201.
98. Hughes, M. N.; Cammack, R. *Synthesis, chemistry, and applications of nitroxyl ion releasers sodium trioxodinitrate or angeli's salt and piloty's acid*, Methods Enzymol., 1999. **268**, 279-287.
99. Bonner, F. T.; Dzelzkalins, L. S.; Bonucci, J. A. *Properties of nitroxyl as intermediate in the nitric oxide-hydroxylamine reaction and in trioxodinitrate Decomposition*, Inorg. Chem., 1978. **17**, 2487-2494.
100. Bartberger, D. M.; Liu, W.; Ford, E.; Miranda, K. M.; Switzer, C.; Fukuto, J. M.; Farmer, P. J.; Wink, D. A.; Houk, K. N. *The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. **99**, 10958-10963.
101. Grätzel, M.; Tanguchi, S.; Henglein, A. *Pulse radiolytic study of short-lived products of nitric oxide-reduction in aqueous solution*, Ber. Bunsenges. Phys., 1970. **74**, 1003-10.
102. Akhtar, M. J.; Lutz, C. A.; Bonner, F. T. *Decomposition of sodium trioxodinitrate (Na<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the presence of added nitrite in aqueous solution*, Inorg. Chem., 1979. **18**, 2369-2375.
103. Zamora, R.; Grzesiok, A.; Weber, H.; Feelisch, M. *Oxidative release of nitric oxide accounts for guanylyl cyclase stimulating, vasodilator and anti-platelet activity of Piloty's acid: a comparison with Angeli's salt*, Biochem. J., 1995. **312**, 333-339.
104. Nelli, S.; McIntosh, L.; Martin, W. *Role of copper ions and cytochrome P450 in the vasodilator actions of the nitroxyl anion generator, Angeli's salt, on rat aorta*, Eur. J. Pharmacol., 2001. **412**, 281-289.
105. Bari, S. E.; Marti, M. A.; Amorebieta, V. T.; Estrin, D. A.; Doctorovich, F. *Fast nitroxyl trapping by ferric porphyrins*, J. Am. Chem. Soc., 2003. **125**.
106. Keefer, L. K.; Nims, R. W.; Davies, K. M.; Wink, D. A. *"NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors dosage forms*, Methods Enzymol., 1996. **268**, 281-293.
107. Liochev, S. I.; Fridovich, I. *Copper, zinc superoxide dismutase as a univalent NO- oxidoreductase and as dichlorofluorescein peroxidase*, J. Biol. Chem., 2001. **276**, 35253-35257.
108. Hempel, S. L.; Buttner, G. R.; O'Malley, Y. Q.; Wessels, D. A.; Flaherty, D. M. *Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine*, Free Radicals Biol. Med., 1999. **27**, 146-159.

109. Crow, J. P. *Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species*, Nitric Oxide, 1997. **1**, 145-157.
110. Ischiropoulos, H.; Gow, A.; Thom, S. R.; Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Crow, J. P. *Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123*, Methods Enzymol., 1999. **301**, 367-373.
111. Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*, J. Chem. Soc. (A), 1968, 450-452.
112. Amarger, N.; Alexander, M. *Nitrite formation from hydroxylamine and oximes by pseudomonas aeruginosa*, Bacteriology, 1968. **95**, 1651-1657.
113. Watanabe, T.; Suzuki, T.; Umezawa, Y.; Takeuchi, T.; Otsuka, M.; Umezawa, K. *Structure-activity relationship and rational design of 3,4-dephostatin derivatives as tyrosine phosphatase inhibitors*, Tetrahedron, 2000. **56**, 741-752.
114. Everett, S. A.; Naylor, M. A.; Stratford, M. R. L.; Patel, K. B.; Ford, E.; Mortensen, A.; Ferguson, A. C.; Vojnovic, B.; Wardman, P. *Iminoxyl radicals and stable products from the one-electron oxidation of 1-methylindole-3-carbaldehyde oximes*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 2001, 1989-1997.
115. McGill, A.; Zhang, W.; Wittbrodt, J.; Wang, J.; Schlegel, H. B.; Wang, P. G. *Para-substituted N-nitroso-N-oxybenzenamine ammonium salts: a new class of redox-sensitive nitric oxide releasing compounds*, Bioorg. Med. Chem., 2000. **8**, 405-412.
116. Zhong, D.-F.; Zhang, S.-Q.; Sun, L.; Zhao, X.-Y. *Metabolism of roxithromycin in phenobarbital-treated rat liver microsomes*, Acta Pharmacol. Sin., 2002. **23**, 455-460.
117. EuAB. *Europäisches Arzneibuch, 4.00*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi Verlag GmbH, Frankfurt a. M., 2002.

## Tagungsbeiträge und Publikationen

Vortrag „**Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Oximen**“

DPhG Doktorandentagung 2004, 24.-26. März Freudenstadt-Lauterbad

B. Rickerts, Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Poster „**Release of Nitric Oxide from Compounds similar to N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine, an intermediate of the NO-biosynthesis**“

DPhG Jahrestagung, 6.-9. Oktober 2004 Regensburg

B. Rickerts, Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Publikation „**Nitric oxide donors induce neutrophin-like survival signaling and protect neurons against apoptosis**“

Molecular Pharmacology, October 2005

C. Culmsee, N. Gerling, S. Landshammer, B. Rickerts, H.-J. Duchstein, K. Umezawa, S. Klumpp, J. Kriegelstein

## Lebenslauf

Name: Bianca Rickerts

Geburtsdatum: 25.11.1972

Geburtsort: Uetersen

Schulbildung:

1983-1993 Jürgen-Fuhlendorf-Gymnasium Bad Bramstedt, Abitur

Berufsausbildung:

1993-1995 Ausbildung zur MTA, Forschungsinstitut Borstel, Examen

1996-2000 Studium der Pharmazie, Universität Hamburg, Staatsexamen

November 2001 Approbation als Apotheker

Seit Mai 2001 Doktorandin am Institut für Pharmazie, AK Prof. Dr. H.-J. Duchstein, Universität Hamburg

Berufserfahrung:

Februar 1996-März 1996 Tätigkeit als MTA, Dr. D. Keeser/ Prof. Dr. Arndt

1997-1998 Studentische Aushilfe, Stadtpark-Apotheke (Hamburg)

2001-2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Hamburg, Betreuung der Studierenden des 2. Semesters Pharmazie während des Labor-Praktikums „Quantitative Analyse von Arznei-, Hilfs- und Schadstoffen“

2002-2004 Nebentätigkeit als Apothekerin, Hohenhorster Apotheke (Hamburg)

Februar 2004 1 Woche Urlaubsvertretung, Sonnenapotheke (Uetersen)

Februar 2005 1 Woche Urlaubsvertretung, Sonnenapotheke (Uetersen)

Praktika:

- |                |  |
|----------------|--|
| Sommer 1993    | 6 Wochen Krankenpflege-Praktikum, Rheumaklinik Bad Bramstedt   |
| September 1996 | 4 Wochen Famulatur, Neue Apotheke am Kirchenbleeck und Apotheke am Bleeck (Bad Bramstedt)  |
| September 1997 | 4 Wochen Famulatur, Passat-Apotheke (Hamburg)  |
| 2000-2001      | Praktisches Jahr im Rahmen der Approbationsordnung für Apotheker: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Rosen-Apotheke (Hamburg)</li><li>2. Universität Hamburg, Institut für Pharmazie, AK Prof. Dr. H.-J. Duchstein</li></ol> |

