

# **Biomimetische Modellsysteme Cytochrom P450-abhängiger Epoxidierungen, Desalkylierungen und Hydroxylierungen**

**DISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Andrea Nicola Lübbe**  
aus Hamburg

Hamburg 2006

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein  
Prof. Dr. D. Geffken

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2002 bis Januar 2006 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

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

Ihm danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die freundliche Motivation und die zahlreichen Anregungen bei der Bearbeitung des Themas.

**Herrn Prof. Dr. D. Geffken**

danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiteren Dank richte ich an Herrn Dr. Stefan Francke aus dem Institut für Organische Chemie für die Durchführung der MS/MS-Experimente und Herrn Dr. Thomas Lemcke aus dem Institut für Pharmazie für das Erstellen der Metalloporphyrin-Modelle. Frau Christine Bostedt danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen Experimente.

Frau Dr. Bianca Rickerts, Frau Irmhild Goebel, Herrn Dr. Albrecht Sakmann und Herrn Dr. Carsten Goebel gilt mein Dank für das Lesen der Korrekturen. Weiterhin danke ich Frau Katrin Bennesch, Frau Steffi Jaeger, Frau Anke Klack, Frau Katharina Wehner, Frau Katrin Schlüter, Frau Ilona Schon, Frau Dr. Judith Möllenbeck, Herrn Guido Schmeinck und Herrn Andreas Soltau für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern unseres Instituts für die angenehme Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht und mich in allen Belangen stets unterstützt haben.



## Abkürzungsverzeichnis

$\bar{x}$	Mittelwert
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abs.	Absorption
Abt.	Abteilung
CBZ	Carbamazepin
CHOX	Cyclohexanonoxim
CyP 450	Cytochrom P450
DHBA	Dihydroxybenzoesäure
e	Einwaage
ESI-MS	Massenspektrometrie mit Elektrospray Ionisierung
FeT4MPyPcI	5,10,15,20-Tetrakis-( <i>N</i> -methyl-4-pyridyl)- porphyrinato-Fe(III) pentachlorid
FeTDCPPcI	5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dichlorophenyl)- porphyrinato-Fe(III) chlorid
FeTFPPcI	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)- porphyrinato-Fe(III) chlorid
FeTPPcI	Tetraphenylporphyrinato-Fe(III) chlorid
Gluc	mit Glucuronsäure konjugiert
H <sub>2</sub> TFPP	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)- 21,23 <i>H</i> -porphyrin
ID	Innendurchmesser
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
imm.	immobilisiert
konv.	konventionell
konz.	konzentriert
Lit.	Literatur
lsl.	löslich
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -Chlorperoxybenzoesäure
Me	Metallkation
MMPP	Magnesiummonoperoxyphthalat Hexahydrat
MnT4MPyPcI	5,10,15,20-Tetrakis-( <i>N</i> -methyl-4-pyridyl)- porphyrinato-Mn(III) pentachlorid
MnTDCPPcI	5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dichlorophenyl)- porphyrinato-Mn(III) chlorid
MnTDCSPcI	5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dichlor-3-sulfonatophenyl)- porphyrinato-Mn(III) chlorid

MnTFPPCl	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)- porphyrinato-Mn(III) chlorid
MODP	Methoxim-3,4-dephostatin
MW	Mikrowelle
n. d.	nicht detektierbar
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids
NADPH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid- phosphats
NHH	<i>N</i> -Hydroxyharnstoff
ox	oxidiert
PhI	Iodbenzol
PhIO	Iodosobenzol
red	reduziert
RP	reversed phase
s	Standardabweichung
TBAP	Tetra- <i>N</i> -butylammoniumperiodat
TMSBr	Trimethylsilylbromid
tr.	trocken, lösungsmittelfrei
vgl.	vergleiche
Vk	Variationskoeffizient

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Cytochrom P450-Enzymsystem .....	2
1.2	Nutzen biomimetischer Modelle.....	7
<b>2</b>	<b>Biomimetische Modellsysteme</b> .....	<b>9</b>
2.1	Einleitung und Literaturübersicht .....	9
2.2	Metalloporphyrine .....	12
2.2.1	Theoretische Betrachtung zur Stabilität der ausgewählten Metalloporphyrine .....	14
2.3	Sauerstoffdonatoren und Cofaktoren.....	17
2.3.1	Iodosobenzol.....	17
2.3.2	<i>m</i> -Chlorperoxybenzoesäure .....	18
2.3.3	Magnesiummonoperoxyphthalat-Hexahydrat .....	18
2.3.4	Tetra- <i>N</i> -butylammoniumperiodat .....	18
2.3.5	Wasserstoffperoxid .....	19
2.3.6	Imidazol .....	20
2.3.7	Kupfer(II)-Ionen .....	21
2.4	Lösungsmittel .....	21
<b>3</b>	<b>Immobilisierung von Metalloporphyrinen</b> .....	<b>22</b>
3.1	Einleitung und Literaturübersicht .....	22
3.2	Immobilisierungen nach Literaturvorschriften .....	25
3.3	UV/VIS-spektroskopische Quantifizierung immobilisierter Metalloporphyrine .....	26
3.3.1	Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeT4MPyPCL.....	26
3.3.2	Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeTFPPCL .....	27
3.3.3	Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen.....	30
3.4	Optimierung der Methoden zur Immobilisierung.....	31
3.4.1	Immobilisierung unter Einsatz der Synthesemikrowelle.....	31
3.4.2	Immobilisierung ohne Lösungsmittel .....	37
3.4.3	Abschließende Betrachtung zur Immobilisierung von Metalloporphyrinen .....	38

3.5	Aktivitätsbestimmung immobilisierter Metalloporphyrine .....	41
3.5.1	Prinzip der Chemilumineszenzmessung .....	41
3.5.2	Suche nach einem geeigneten Modellsystem für die Chemilumineszenzmethode .....	42
3.5.3	Untersuchung der immobilisierten Metalloporphyrine .....	44
3.6	Abschließende Betrachtung .....	46
<b>4</b>	<b>Modellsysteme für Epoxidierungen .....</b>	<b>47</b>
4.1	Einleitung und Literaturübersicht .....	47
4.2	Methodenoptimierung mit Carbamazepin .....	50
4.2.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	50
4.2.2	Versuchsplanung .....	51
4.2.3	Analytik .....	52
4.2.4	Einfluss der Metalloporphyrine und Sauerstoffdonatoren .....	53
4.2.5	Einfluss des Ansatzverhältnisses .....	55
4.2.6	Einfluss des Einsatzes der Synthesemikrowelle .....	56
4.2.7	Diskussion .....	58
4.3	Protriptylin .....	59
4.3.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	59
4.3.2	Analytik .....	61
4.3.3	Umsetzung von Protriptylin .....	63
4.4	Methyleugenol .....	65
4.4.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	65
4.4.2	Analytik .....	67
4.4.3	Umsetzung von Methyleugenol .....	69
4.5	Acrylamid .....	71
4.5.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	71
4.5.2	Analytik .....	72
4.5.3	Umsetzung von Acrylamid .....	72
4.6	Fosfomycin .....	73
4.6.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	73
4.6.2	Synthese von <i>cis</i> -1-Propenylphosphonsäure .....	73
4.6.3	Analytik .....	74
4.6.4	Umsetzung von <i>cis</i> -1-Propenylphosphonsäure .....	75
4.7	Abschließende Betrachtung .....	76



<b>5</b>	<b>Modellsysteme für Desalkylierungen</b> .....	<b>79</b>
5.1	Einleitung und Literaturübersicht .....	79
5.2	Pharmakologische Eigenschaften der Substrate .....	80
5.2.1	<i>N</i> -Hydroxyharnstoff.....	80
5.2.2	Roxithromycin .....	81
5.2.3	Ceftazidim.....	82
5.3	Methodenoptimierung mit <i>N</i> -Hydroxyharnstoff.....	83
5.4	Desalkylierung von Roxithromycin und Ceftazidim .....	84
5.4.1	NO-Freisetzung.....	84
5.4.2	Nitrit-Bildung .....	85
5.4.3	Nitrat-Bildung.....	87
5.4.4	Hydroxylamin als Zwischenprodukt der NO-Freisetzung.....	87
5.5	Diskussion der Ergebnisse .....	89
<b>6</b>	<b>Modellsysteme für Hydroxylierungen</b> .....	<b>98</b>
6.1	Einleitung und Literaturübersicht .....	98
6.2	Phenylalanin .....	100
6.2.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	100
6.2.2	Analytik .....	102
6.2.3	Umsetzung von Phenylalanin .....	102
6.3	Acetylsalicylsäure und Salicylsäure .....	106
6.3.1	Pharmakologische Eigenschaften .....	106
6.3.2	Analytik .....	107
6.3.3	Umsetzung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure .....	107
6.4	Abschließende Betrachtung .....	108
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>119</b>
9.1	Verzeichnis der Geräte und allgemeine Methoden.....	119
9.2	Versuche zu Abschnitt 3 (Immobilisierungen).....	122
9.2.1	UV/VIS-spektroskopische Methode zur Quantifizierung der Metalloporphyrinbelegung des Trägermaterials.....	122

9.2.2	Immobilisierung nach konventionellen Methoden .....	125
9.2.3	Immobilisierung in der Synthesemikrowelle.....	126
9.2.4	Immobilisierung in der Synthesemikrowelle ohne Lösungsmittel .....	130
9.2.5	Aktivitätsbestimmung immobilisierter Metalloporphyrine .....	131
9.3	Versuche zu Abschnitt 4 (Epoxidierungen).....	136
9.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Epoxidierung von Substraten mit biomimetischen Modellsystemen .....	136
9.3.2	Methoden und Messdaten der Umsetzung von Carbamazepin.....	138
9.3.3	Methoden und Messdaten der Umsetzung von Protriptylin .....	143
9.3.4	Methoden und Messdaten der Umsetzung von Methyleugenol .....	146
9.3.5	Methode zur Bestimmung von Acrylamid .....	148
9.3.6	Synthese von <i>cis</i> -1-Propenylphosphonsäure .....	149
9.3.7	Methoden zur Bestimmung von Fosfomycin .....	150
9.4	Versuche zu Abschnitt 5 (Desalkylierungen).....	151
9.4.1	Methodenoptimierung mit <i>N</i> -Hydroxyharnstoff.....	151
9.4.2	Desalkylierung von Roxithromycin und Ceftazidim.....	153
9.4.3	Hydroxylamin als Zwischenprodukt der NO-Freisetzung.....	158
9.5	Versuche zu Abschnitt 6 (Hydroxylierungen).....	161
9.5.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Hydroxylierung von Substraten mit biomimetischen Modellsystemen.....	161
9.5.2	Methoden und Messdaten der Umsetzung von Phenylalanin.....	162
9.5.3	Methode zur Bestimmung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure.....	166
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>167</b>
<b>11</b>	<b>Anhang: Gefahrstoffe.....</b>	<b>175</b>

# 1 Einleitung

Als Biotransformation wird die Umwandlung endogener (z.B. niedermolekulare Signalstoffe, Gallenfarbstoffe) und exogener Substanzen (z.B. Arzneistoffe) durch den Organismus bezeichnet. Diese vorwiegend enzymatischen Prozesse sind besonders für die Eliminierung von meist lipophilen Xenobiotika von großer Bedeutung. Diese würden ohne eine Biotransformation aufgrund ihrer hohen Resorbierbarkeit und durch Rückresorption aus dem hepatischen Kreislauf nicht oder nur langsam aus dem Organismus eliminiert werden. Viele der für Biotransformationsreaktionen verantwortlichen Enzyme befinden sich in den Mikrosomen des endoplasmatischen Retikulums von Hepatozyten. Auch in anderen Organen wie Darm, Niere, Lunge, Haut und Blut finden Biotransformationen statt. Dieser extrahepatische Stoffwechsel spielt aber eine untergeordnete Rolle. Die Xenobiotika werden nach Absorption und Verteilung im Organismus über die Vena portae zur Leber transportiert und diffundieren in die Hepatozyten. Am endoplasmatischen Retikulum erfolgen die Biotransformationsreaktionen. Die hydrophilen Metabolite gelangen dann zurück in das Blut oder in die Gallenkapillaren und werden renal oder biliär eliminiert. Die Biotransformationsreaktionen werden in zwei Gruppen klassifiziert. Die Reaktionen der Phase I führen zu hydrophileren Strukturen, die der Phase II zu Konjugaten der Xenobiotika mit körpereigenen Substanzen des Intermediärstoffwechsels (Abbildung 1-1).

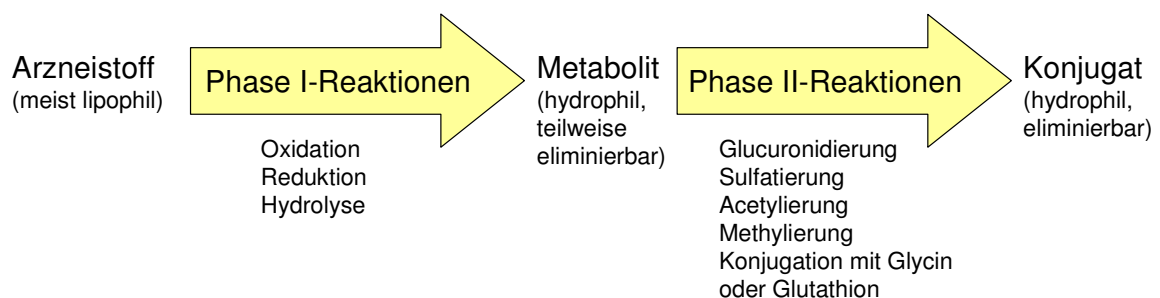


Abbildung 1-1 Biotransformation eines Arzneistoffs im menschlichen Organismus

Während für die Reaktionen der Phase II ausschließlich Transferasen verantwortlich sind, werden die Reaktionen der Phase I überwiegend durch

Dehydrogenasen, Esterasen, Reduktasen und Monooxygenasen des Cytochrom P450-Systems katalysiert.

Die meisten Arzneistoffe erfahren durch die Biotransformation eine Inaktivierung. Es kann aber auch z.B. bei der Gabe von Paracetamol zur Bildung toxischer Metaboliten kommen. Um eine bessere Resorption, längere Wirkungsdauer oder eine erhöhte Selektivität von Arzneistoffen zu erreichen, werden vermehrt pharmakologisch inaktive Prodrugs eingesetzt, die erst durch die Biotransformation aktiviert werden<sup>1</sup>.

## 1.1 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

Die größte Bedeutung bei der Katalyse von oxidativen Biotransformationsreaktionen hat das Cytochrom P450-Enzymsystem. Es katalysiert den größten Teil der Phase I-Reaktionen mit geringer Substratspezifität und ist ubiquitär, vornehmlich jedoch in der Leber konzentriert. Cytochrom P450 gehört zu der Gruppe der Hämthiolatproteine. Das Apoprotein besteht aus etwa 500 Aminosäuren, die prosthetische Gruppe aus einem Eisen-Protoporphyrin IX-Chromophor. Nach Reduktion in Gegenwart von Kohlenmonoxid (CO) zeigt der Eisen(II)-CO-Komplex des Cytochrom P450 ein Absorptionsmaximum bei 450 nm. Die Eisen(II)-CO-Komplexe anderer Hämproteine, wie auch Hämoglobin, zeigen Absorptionsmaxima bei Licht der Wellenlänge 420 nm, da sie anstelle eines elektronenreichen Cysteins als proximalen Liganden ein Histidin tragen. Diese Beobachtung war für Cytochrom P450 namensgebend.

Aufgrund der Unterschiede zwischen den kodierenden Genen werden derzeit 12 Isoenzym-Familien differenziert, die sich ihrerseits jeweils weiter unterteilen lassen und insgesamt mehr als 500 Enzyme umfassen<sup>2</sup>.

Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen katalysieren die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff. Hierbei wird nur ein Sauerstoffatom des Moleküls auf das Substrat übertragen, das andere wird zu Wasser reduziert. Die notwendigen Reduktionsäquivalente werden von NADPH bereitgestellt und von dem Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450-Reduktase übertragen (Abbildung 1-2)<sup>3</sup>.

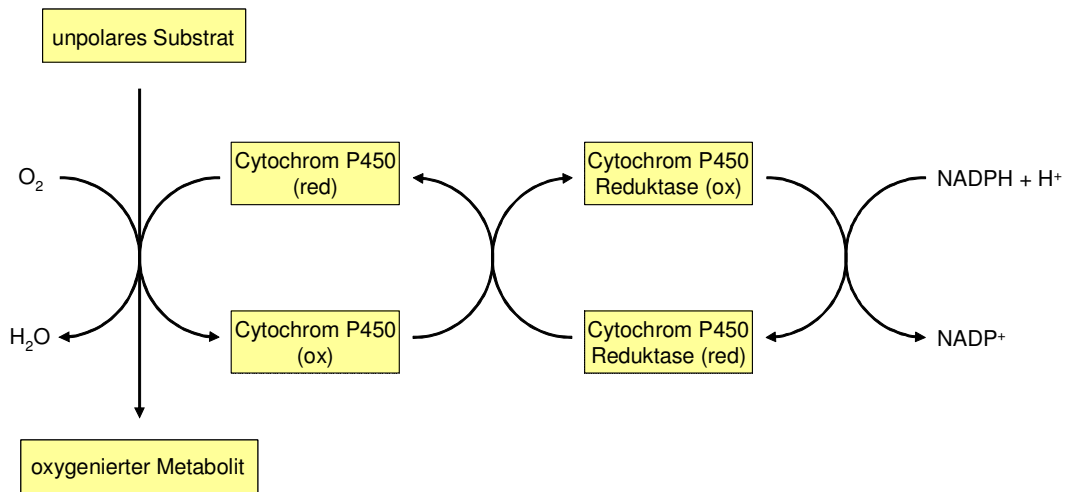
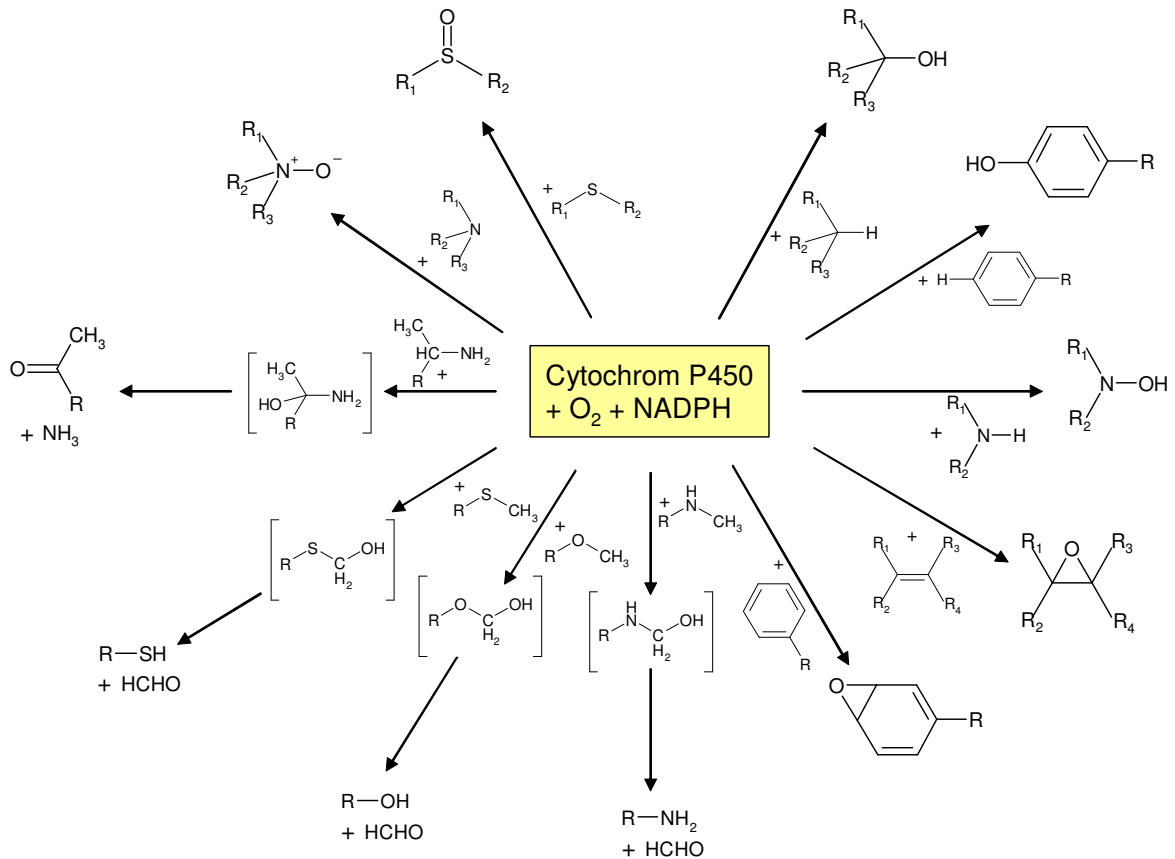


Abbildung 1-2 Elektronenübertragungsschema für die Monooxygenierung von Substraten durch Cytochrom P450 in Mikrosomen der Leber

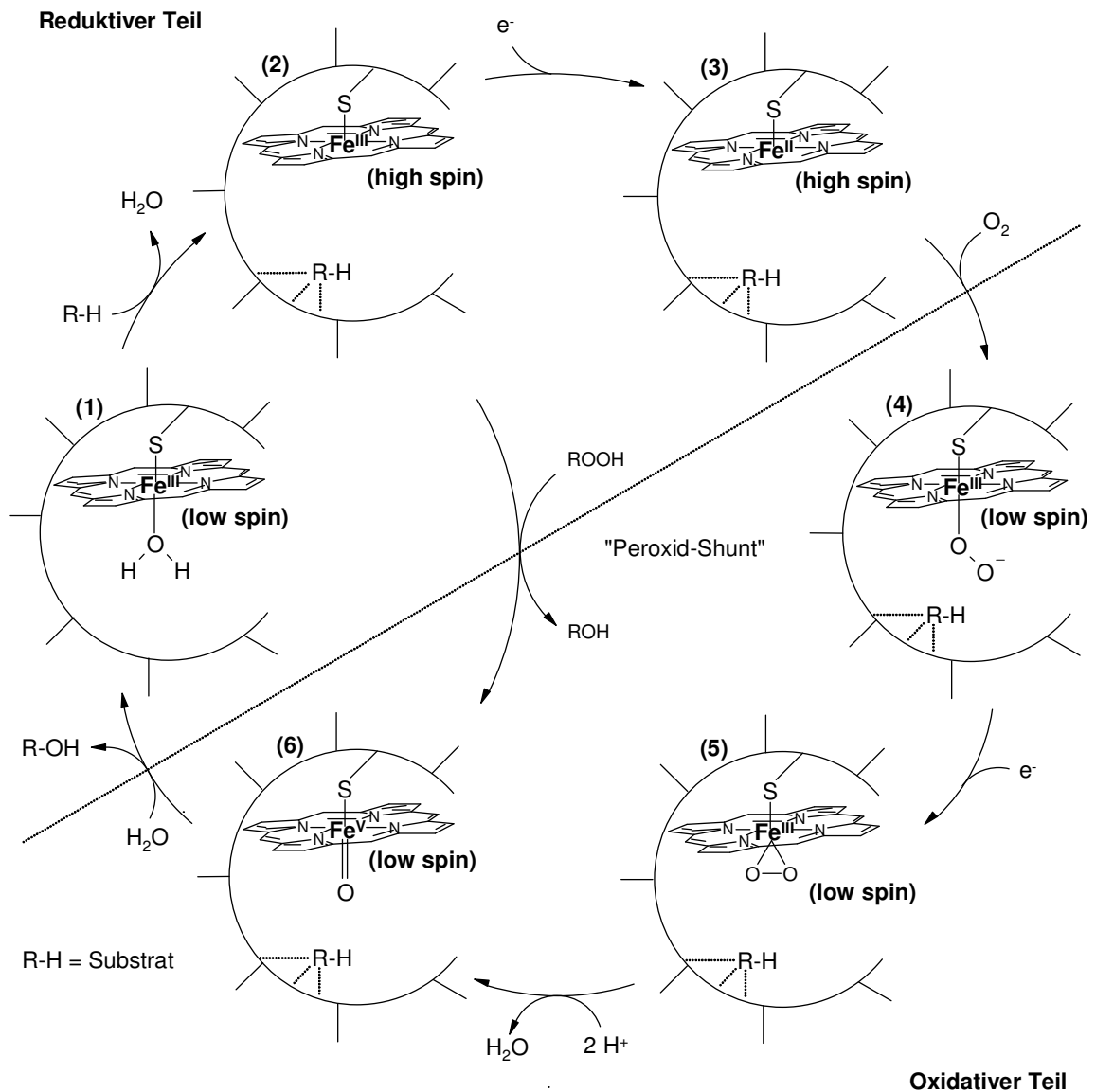
Das Cytochrom P450-Enzymsystem katalysiert aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, N-Hydroxylierungen, Epoxidierungen olefinischer und aromatischer Doppelbindungen, oxidative N-, O- und S-Desalkylierungen, oxidative Desaminierungen und Oxidationen von Thioethern und tertiären Aminen zu Sulfoxiden und N-Oxiden (Schema 1-1)<sup>2</sup>. Die durch Cytochrom P450 gebildeten Epoxide werden zu einem großen Teil direkt zum *trans*-Diol gespalten. Dennoch trägt die Bildung von Epoxiden zur metabolischen Toxifizierung im Organismus bei. Benzo[a]pyren\* als polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff wird erst durch die Epoxidierung zum 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo[a]pyren-9,10-oxid und zum Benzo[a]pyren-4,5-oxid zu einem starken Kanzerogen und Mutagen. Dieser Metabolismus ist für die Pathogenese des Bronchialkarzinoms bei Rauchern verantwortlich<sup>4</sup>.

\* Benzo[a]pyren wird nach IUPAC als Benzo[d,e,f]chrysen bezeichnet. Weitere Synonyme sind 6,7-Benzopyren, 3,4-Pyren, 3,4-Benzpyren sowie 3,4-Benz[a]pyren.



Schema 1-1 Beispiele für Monooxygenasereaktion katalysiert vom mikrosomalen Cytochrom P450

Schema 1-2 zeigt den heute akzeptierten zyklischen Mechanismus der oxidativen Substratumwandlung durch Cytochrom P450<sup>3</sup>. Im ersten Schritt **(1)** wird durch die Bindung des Substrats an eine der Bindungsstellen in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms Wasser als sechster Ligand des Häm-Eisens verdrängt, und Eisen(III) geht unter Anstieg des Redoxpotentials in einen fünffach koordinierten High-spin-Zustand **(2)** über. Durch die Übertragung eines Reduktionsäquivalents von NADPH über die Flavoproteine FAD und FMN der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (siehe Abbildung 1-2) kommt es zur Ausbildung des High-spin-Eisen(II)-Komplexes **(3)**. Die Aufnahme des molekularen Sauerstoffs führt zu der Bildung des Low-spin-Eisen(III)-Superoxo-Komplexes **(4)**. Anschließend wird ein zweites Reduktionsäquivalent von NADPH über die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase unter Bildung des Peroxo-Komplexes übertragen **(5)**.



Schema 1-2 Mechanismus der Oxidation von Kohlenwasserstoffen durch Cytochrom P450 (dargestellt ist die Enzymbindingstasche)

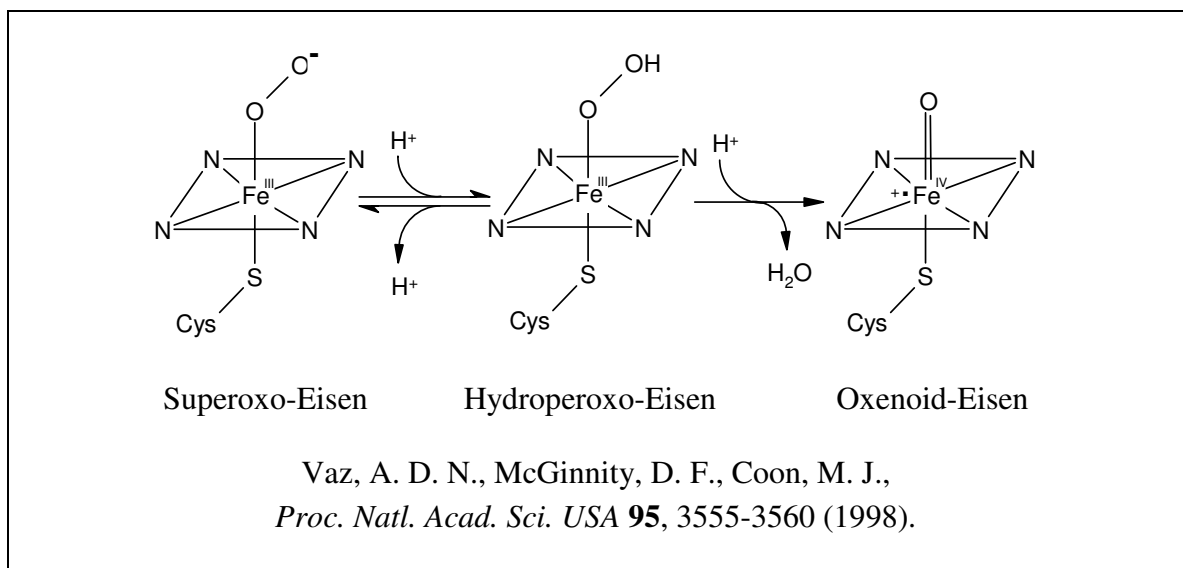
Es kommt mit Hilfe zweier Protonen des oxidierten Flavoproteins zu einer Disproportionierung des Sauerstoffs unter Wasserabspaltung und zur Ausbildung einer hoch-oxidierten Zwischenstufe des Eisens (6), welche als Oxenoid oder Eisen-Oxo-Komplex bezeichnet wird.

Es werden außer der Oxenoid-Spezies von *Vaz und Mitarbeitern*<sup>5</sup> noch zwei weitere zur Oxygenierung von Substraten befähigte Spezies diskutiert. Ihnen werden unterschiedliche katalytische Eigenschaften zugesprochen. So werden durch die Superoxo-Spezies (siehe Schema 1-2, 4) vornehmlich nukleophile Reaktionen, durch die Hydroperoxo-Spezies nukleophile und

elektrophile Reaktionen und durch die Oxenoid-Spezies (6) speziell elektrophile Reaktionen katalysiert.

Das Substrat kann nun mit dem aktivierten Sauerstoff zum oxygenierten Produkt reagieren und dissoziieren, während das Oxyferrylkation unter Wasseranlagerung in den Grundzustand zurückkehrt.

Als ‚Peroxid-Shunt‘ bezeichnet man die Umgehung der Schritte der Reduktion und der Sauerstoffanlagerung, indem man zu Cytochrom P450-Enzymen mit gebundenem Substrat Peroxid (ROOH) hinzufügt, welches unmittelbar zur Bildung der Oxenoid-Zwischenstufe (6) und anschließend zur Substratoxygenierung führt<sup>3</sup>.



Im biomimetischen Modellsystem wird das Cytochrom P450 durch einen niedermolekularen Metallkomplex (Metalloporphyrin, Salen) ersetzt. Das Bereitstellen von aktiviertem Sauerstoff erfolgt durch die Zugabe von chemischen Sauerstoffdonatoren. Dadurch liegt der Sauerstoff formal auf der Oxidationsstufe des Sauerstoffs im Wasser. Man spricht von so genanntem vorreduzierten Sauerstoff. Der mechanistische Ablauf entspricht dem in Schema 1-2 dargestellten und verläuft über den Peroxid-Shunt.



## 1.2 Nutzen biomimetischer Modelle

Biotransformationsstudien sind Bestandteil gesetzlich geregelter Zulassungsverfahren für neue Arzneistoffe. Diese werden zunächst an Tiermodellen durchgeführt, bevor der neue Arzneistoff in den klinischen Phasen der Zulassung am Menschen getestet wird. Da hierfür erhebliche Mengen des zu untersuchenden Arzneistoffs benötigt werden und Tierversuche auf ein Minimum reduziert werden sollten, wurden in den letzten Jahren vermehrt biologische und chemische Modelle für Biotransformationsuntersuchungen etabliert.

Durch Alternativmethoden sind aber nicht alle Tierversuche ersetzbar, da die komplexen Vorgänge im Organismus nicht vollständig simuliert werden können. Dennoch können Untersuchungen an Zell- und Gewebekulturen, Beobachtungen an isolierten Organen, Computersimulationen oder biomimetische Modelle als Ergänzungs- oder Komplementärmethoden dienen. Die biomimetischen Modelle für Monooxygenierungen stellen chemisch-katalysierte Analogsysteme dar. Genaue Vorhersagen über die Bildung von Metaboliten im Organismus sind mit diesen Modellen bisher nur schwer möglich, da Enzyme und chemische Katalysatoren sich grundsätzlich voneinander unterscheiden. Dies betrifft z.B. Aussagen über die Eigenschaften der Substratbindung, der Enzyminduktion und -inhibition. Es besteht aber die Möglichkeit, Informationen über die Reaktivität von Arzneistoffen und deren Stabilität gegenüber oxidativen Angriffen zu erhalten. Des Weiteren ist es realisierbar, größere Mengen von entsprechenden Metaboliten zu gewinnen und zu untersuchen<sup>6</sup>. Die in größeren Mengen erhaltenen möglichen Metabolite können auch zur Identifizierung von Metaboliten in vivo führen.

In den vergangenen Jahren wurden immer effizientere Modellsysteme für Monooxygenierungsreaktionen entwickelt<sup>7-9</sup>. Ziel dieser Arbeit war eine Optimierung dieser Modellsysteme unter Einsatz verschiedener Kombinationen von niedermolekularen Metallkomplexen und Sauerstoffdonatoren in verschiedenen neuen Reaktionen, die ebenfalls Cytochrom P450-katalysierte Biotransformationsreaktionen darstellen.

Unter den niedermolekularen Metallkomplexen, die als Katalysatoren im Modellsystem eingesetzt werden, wurde die Auswahl auf die Gruppe der

Metalloporphyrine begrenzt. Um diese effizienter nutzen zu können, war eine Immobilisierung an Trägermaterialien gefordert. Dadurch kann die Stabilität der Katalysatoren gegenüber oxidativen Angriffen und deren Belastbarkeit erhöht werden. Eine Wiedergewinnung der Metalloporphyrine wird ermöglicht, wofür besonders die hohen Beschaffungskosten sprechen.

Bei der Immobilisierung von Katalysatoren kann ein Verlust der katalytischen Aktivität nicht ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit sollte demzufolge zunächst eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Belegung von Metalloporphyrin am Trägermaterial und anschließend eine Methode zur Bestimmung der Reaktivität des immobilisierten Metalloporphyrins entwickelt werden.

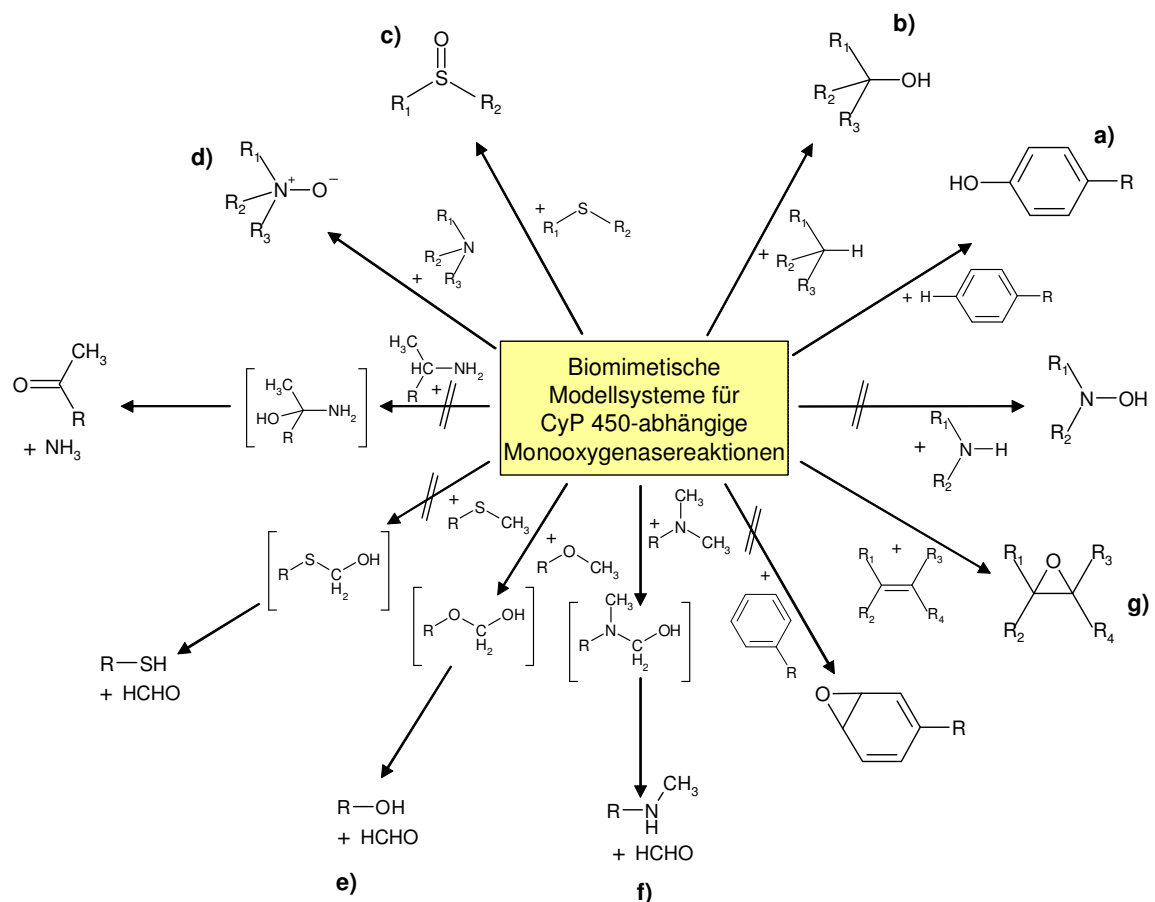
Diese charakterisierten trägergebundenen Katalysatoren sollten dann in verschiedenen Reaktionen zum Einsatz kommen. Durch Variationen der Art und Menge der eingesetzten Sauerstoffdonatoren und der Reaktionsbedingungen sollte die Umsetzung verschiedener Substrate optimiert werden.

Anzumerken sei noch, dass in dieser Arbeit, wie auch unter Enzymologen üblich, zwischen Oxygenierung und Oxidation differenziert wird. Als Oxygenierung wird die Inkorporierung eines Sauerstoffatoms in ein organisches Substrat bezeichnet, als Oxidation die Übertragung von Elektronen von einem organischen Substrat auf ein Oxidans, welches als Elektronenakzeptor fungiert.

## 2 Biomimetische Modellsysteme

### 2.1 Einleitung und Literaturübersicht

In Schema 2-1 ist analog zu den durch Cytochrom P450-katalysierten Monooxygenasereaktionen (Schema 1-1) eine Übersicht über die durch biomimetische Modelle möglichen Reaktionen dargestellt. Bis auf wenige Ausnahmen sind die Modelle in der Lage, den körpereigenen Metabolismus zu imitieren.



Schema 2-1 Beispiele für biomimetische Modelle Cytochrom P450-katalysierter Monooxygenasereaktionen; a) Hydroxylierung von Phenylalanin<sup>10</sup>, b) Hydroxylierung tertiärer Alkane<sup>11</sup>, c) Oxidation von Diphenylsulfid<sup>12</sup>, d) N-Oxidbildung am Lidocain<sup>13</sup>, e) Desmethylierung von Benzylmethylether<sup>12</sup>, f) N-Desalkylierung von Dimethylanilin<sup>12</sup> und g) Epoxidierung von Stilben<sup>14</sup>

*Balogh und Keseru*<sup>15</sup> erstellten eine Übersicht über die Biotransformationsreaktionen einiger Arzneistoffe (Phencyclidin, Nicotin, Paracetamol, Tiagabin, Lidocain, Odapipam, Denaverin-HCl, Diclofenac, Etodolac) in vivo und mit biomimetischen Modellsystemen. Die Biotransformationsreaktionen des Lidocains sind dabei von besonderem Interesse. Im menschlichen Organismus werden die Biotransformationsreaktionen durch drei verschiedene Isoenzyme des Cytochrom P450-Enzymsystems katalysiert (Abbildung 2-1): **(a)** die oxidative N-Desethylierung, welche selten mit Acetaldehyd\* zu einem zyklischen Metaboliten **(b)** führt, wird durch die Cytochrom P450 3A-Unterfamilie katalysiert, **(c)** die Hydroxylierung einer Benzylmethylgruppe durch die Cytochrom P450 2B-Unterfamilie und **(d)** die Hydroxylierung am Aromaten durch die Cytochrom P450 1A-Unterfamilie<sup>16-18</sup>.

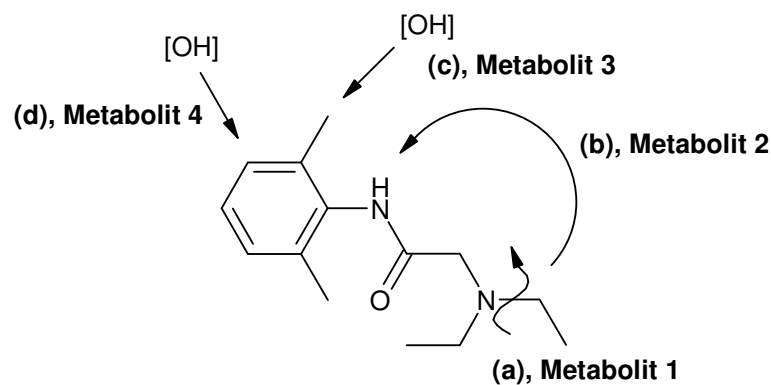
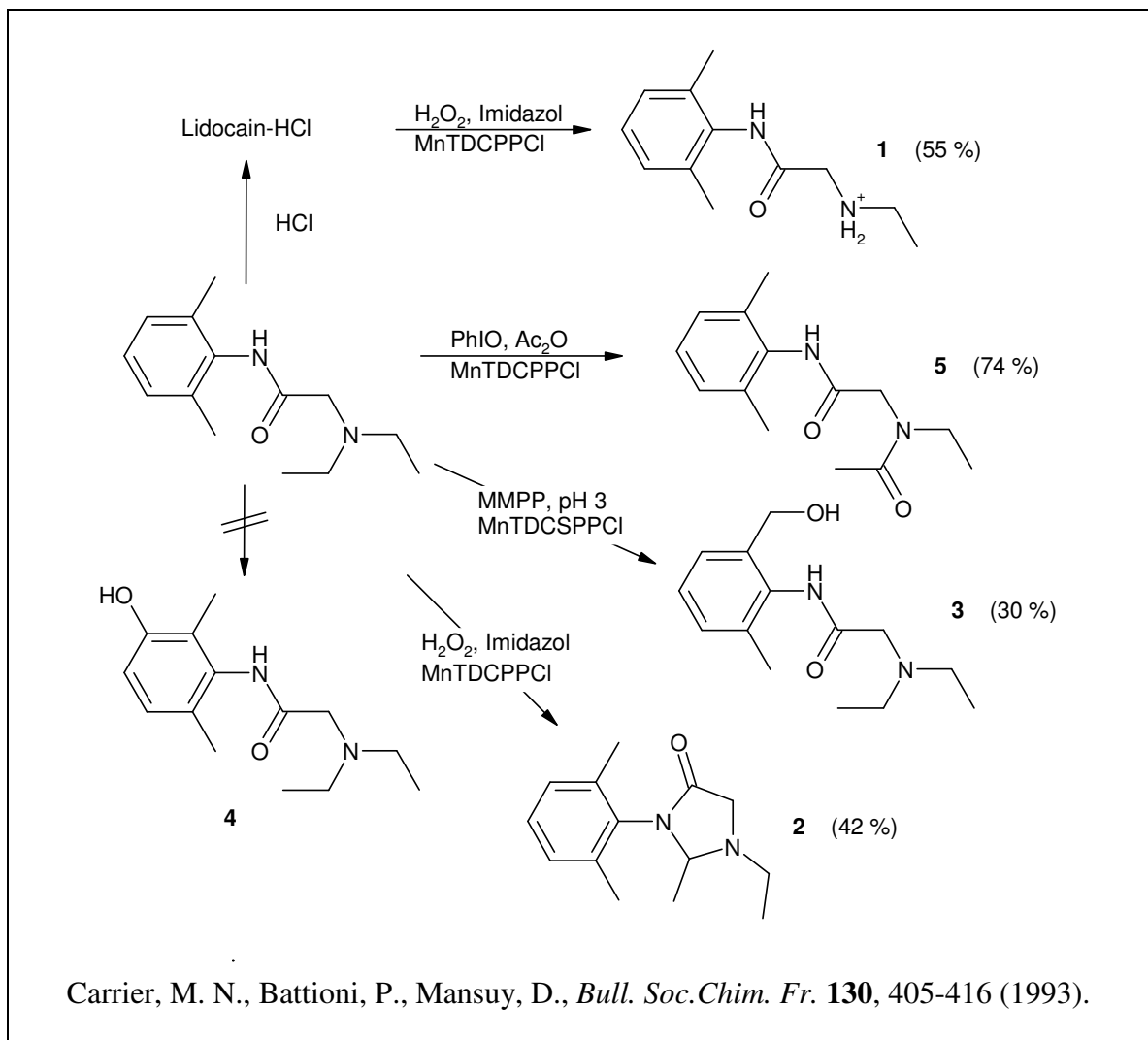


Abbildung 2-1 Biotransformationsreaktionen des Lidocains in vivo

Für die biomimetischen Untersuchungen wurden von *Carrier und Mitarbeitern*<sup>19</sup> verschiedene biomimetische Modellsysteme eingesetzt. Entscheidend für die Gewinnung der verschiedenen Metaboliten war die Kombination von verschiedenen Metalloporphyrinen mit unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren und Lösungsmitteln. Für die selektive Gewinnung des Metaboliten **1** wird das Lidocain-HCl als Substrat benötigt und für die Gewinnung der Metaboliten **2** und **3** die freie Base. Der Metabolit **5** wurde durch die Zugabe von Acetanhydrid gewonnen und konnte in vivo bislang nicht identifiziert werden. Die aromatische Hydroxylierung in *meta*-Position,

\* Acetaldehyd entsteht im menschlichen Organismus in größeren Mengen bei übermäßigem Alkoholkonsum und ist der Hauptmetabolit des Ethanols.

welche zu Metabolit **4** geführt hätte, konnte mit keinem biomimetischen Modellsystem erreicht werden.



Bei allen hier aufgeführten Reaktionen waren kaum Nebenprodukte entstanden. Die teilweise mäßigen Ausbeuten beruhen auf einer geringeren Substratumsetzung.

Metalloporphyrine werden nicht nur als Katalysatoren in biomimetischen Modellsystemen für Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasereaktionen verwendet, sondern auch in artifiziellen Modellsystemen für photochemische Reaktionszentren<sup>20</sup>, für die photodynamische Tumorthherapie<sup>21</sup> und für die photodynamische Therapie des Nachstars, der sich häufig nach Kataraktoperationen ausbildet<sup>22</sup>.

## 2.2 Metalloporphyrine

Das chelatisierte Eisen im Cytochrom P450-Enzymsystem wird im Modellsystem durch einen niedermolekularen Metallkomplex imitiert. In den für diese Arbeit ausgewählten Metallkomplexen ist das Zentralatom in ein Tetraarylporphyrinringgrundgerüst eingebettet. In der Literatur sind auch chelatisierende Gerüste aus Schiffischen Basen beschrieben worden (z.B. Salene<sup>23</sup>). Die Reaktivität des Porphyrinkomplexes ist stark abhängig von der Wahl des Zentralatoms. Eingesetzt werden redoxaktive Übergangsmetallionen, die ein einzelnes Elektron übertragen können. Oft verwendet werden die Redoxpaare Fe(II)/Fe(III), Mn(II)/Mn(III) und Pd(II)/Pd(III), vereinzelt finden auch Co(I)/Co(II) und Cu(I)/Cu(II) Verwendung. Um in dieser Arbeit verschiedene Tetraarylporphyrine in den Modellreaktionen zu untersuchen, wurden zwei Gruppen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt: zum einen die perfluorierten Metalloporphyrine 5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Mangan(III) chlorid (MnTFPPCl, Abbildung 2-2, **1**) und 5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Eisen(III) chlorid (FeTFPPCl, **2**) und zum anderen die kationischen Porphyrine 5,10,15,20-Tetrakis-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Mangan(III) pentachlorid (MnT4MPyCl, **3**) und 5,10,15,20-Tetrakis-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Eisen(III) pentachlorid (FeT4MPyCl, **4**)\*.

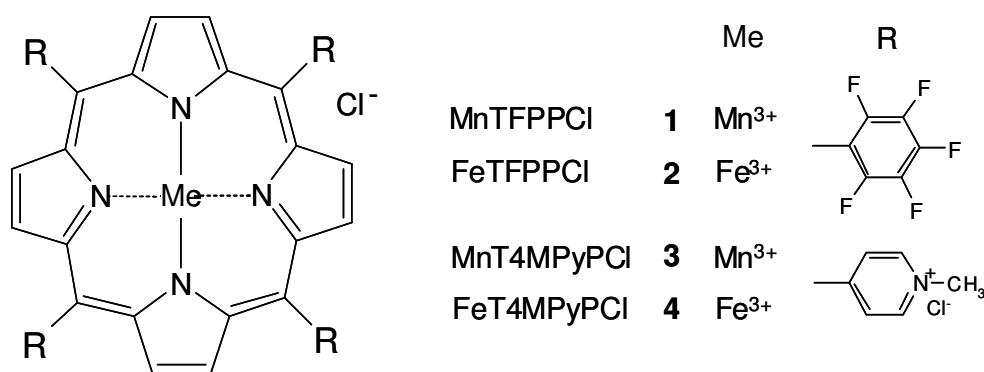
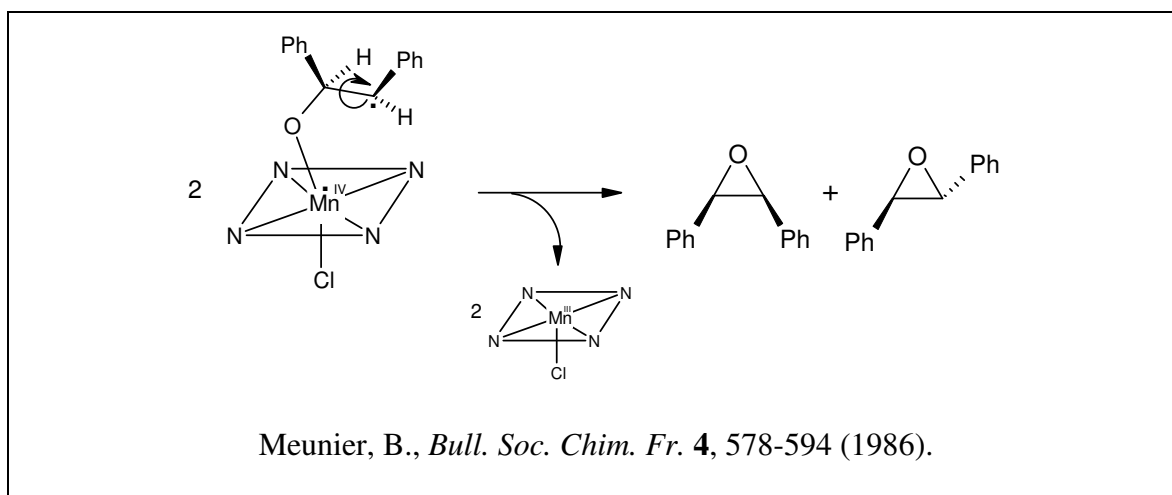


Abbildung 2-2 Für diese Arbeit ausgewählte tetrafunktionalisierte Metalloporphyrine

\* Nomenklatur nach IUPAC: [[4,4',4'',4'''-(21*H*,23*H*-porphyrin-5,10,15,20-tetrayl)-tetrakis-[1-methylpyridiniumato]]-Eisen/Mangan(V)-N21,N22,N23,N24]-pentachlorid

Die Absorptionsmaxima von MnTFPPCl und FeTFPPCl liegen bei Licht der Wellenlänge 475 nm bzw. 415 nm, die von MnT4MPyPCl und FeT4MPyPCl bei 462 nm bzw. 414 nm. Alle vier Metalloporphyrine lassen sich in den meisten organischen Lösungsmitteln lösen, die kationischen auch in wässrigen Lösungen.\* *Ding und Mitarbeiter*<sup>24</sup> beschrieben die manganhaltigen Metalloporphyrine gegenüber den eisenhaltigen als sehr viel reaktiver. Da in unserer Arbeitsgruppe mit dem eisenhaltigen FeTFPPCl allerdings herausragende Ergebnisse erzielt werden konnten<sup>25</sup>, wurden in dieser Arbeit ebenso die eisenhaltigen Metalloporphyrine untersucht. Eisen- und manganhaltige Metalloporphyrine katalysieren dieselben Reaktionen, führen aber häufiger zu stereochemisch unterschiedlichen Produkten. Im Gegensatz zu eisenhaltigen Metalloporphyrinen, die eine Epoxidierung von *cis*-Olefinen zu *cis*-Epoxiden katalysieren, entstehen bei der Katalyse mit manganhaltigen Metalloporphyrinen sowohl *cis*- als auch *trans*-Epoxide, wobei der prozentuale Anteil der *trans*-Epoxide häufig sogar überwiegt. Dieser Verlust an Stereospezifität wurde von *Meunier*<sup>26</sup> durch die Bildung einer radikalischen Spezies erklärt, deren Lebensdauer für Isomerisierungen durch Rotation um die entstandene Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindung ausreicht.



*Zhang und Mitarbeiter*<sup>27</sup> untersuchten die Reaktivität der Oxenoid-Spezies, die aus MnTFPPCl und MnT4MPyPCl gebildet werden. Das MnT4MPyPCl-Oxenoid war die erste spektroskopisch charakterisierte Spezies dieser Art. Die elektronenziehenden Substituenten im MnTFPPCl scheinen die

\* Angaben des Herstellers *Porphyrin Systems (Lübeck, Deutschland)*

Reaktivität für Substratoxygenierungen, die dieser Komplex katalysiert, stark zu erhöhen. Dennoch wurden auch die kationischen Metalloporphyrine in der vorliegenden Arbeit gewählt, da *Battioni und Mitarbeiter*<sup>28</sup> diese für Alkan-Hydroxylierungen und Alken-Epoxydierungen als effektive Katalysatoren beschrieben haben.

### **2.2.1 Theoretische Betrachtung zur Stabilität der ausgewählten Metalloporphyrine**

Die für diese Modellsysteme eingesetzten Metalloporphyrine sollen sowohl effiziente Katalysatoren darstellen, als auch gegenüber starken oxidativen Angriffen durch die eingesetzten Sauerstoffdonatoren stabil sein. Die Abwesenheit des zu oxygenierenden Substrats bei Zugabe des Sauerstoffdonators führt häufig zur vollständigen Zerstörung des Katalysators. Aber auch in dessen Anwesenheit kann eine Zerstörung des Katalysators durch einen zu großen Überschuss an Sauerstoffdonator eintreten. Die Stabilität und die Effektivität der Metalloporphyrine kann durch Einführen von großen oder elektronenziehenden Substituenten an den  $\beta$ -Pyrrolpositionen<sup>29</sup> sowie an den Arylsubstituenten<sup>30</sup> erhöht werden, wobei die Wahl des Sauerstoffdonators und sein molares Verhältnis zum Katalysator ebenfalls eine große Rolle spielen. *Bartoli und Mitarbeiter*<sup>31</sup> beschrieben bei Versuchen zur Regioselektivität verschieden substituierter Metalloporphyrine eine Abhängigkeit des Produktverhältnisses von Epoxid zu Alkohol von der Anzahl der Halogensubstituenten am Porphyringerüst. Hier wurde ein Modell aus Heptan, Cycloocten und Iodosobenzol mit verschiedenen Metalloporphyrinen untersucht. Die Doppelbindung im Cycloocten wird normalerweise leichter epoxidiert, als dass eine Hydroxylierung am Alkan eintritt. Je mehr Halogensubstituenten an das Porphyringerüst gebunden waren (wobei kein Unterschied bestand zwischen Substitution an den Arylgruppen oder den Pyrrolringen), desto stärker verschob sich das Produktverhältnis zu Gunsten der Hydroxylierung des Substrats. Bei Einführung weiterer Halogensubstituenten an den Pyrrolring des FeTFPPCl konnte derselbe Effekt beobachtet werden, allerdings in untergeordnetem Ausmaß. Bezogen auf das MnTFPPCl war der Effekt etwas größer. Daraus lässt sich schließen, dass die perfluorierten Metalloporphyrine eher zur Substrathydroxylierung eingesetzt werden sollten und



die kationischen Metalloporphyrine eher für Epoxidierungen, wie in den folgenden Abschnitten dargestellt wird.

Für weitere Betrachtungen wurden von den verwendeten Metalloporphyrinen in Zusammenarbeit mit Lemcke (Abt. Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) molekulare Modelle generiert. Ausgehend von Porphyrinmodellen von *Prince und Körner*<sup>32</sup> und *Zakrzewski und Mitarbeitern*<sup>33</sup> wurden mit dem SYBYL Molecular Modelling Paket<sup>34</sup> weitere Liganden entfernt, formale Ladungen festgelegt (Zentralatom +1, Pyridyl-Stickstoff +1) und nach Gasteiger-Hückel Ladungen für das gesamte Molekül berechnet. Mit dem SYBYL Modul Molcad<sup>®</sup> konnten im Anschluss Conolly-Oberflächen berechnet werden, auf die dann das elektrostatische Potential ‚gemapt‘ wurde (Abbildung 2-3).

Dargestellt ist das elektrostatische Potential von FeTFPPCl (links) und MnT4MPyPCl (rechts). Versuche mit diesen beiden Metalloporphyrinen und mit Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator in Kombination mit Imidazol (siehe Abschnitt 4.2.4) zeigten, dass die kationischen Metalloporphyrine bereits durch Zugabe von Wasserstoffperoxid im molaren Verhältnis von 1:20 vollständig zerstört wurden, während die perfluorierten Metalloporphyrine eine Zugabe von Wasserstoffperoxid im molaren Verhältnis von über 1:100 unbeschadet überstanden. Durch Filtration wurden die Metalloporphyrine wiedergewonnen und erbrachten in erneuten Reaktionen die gleiche katalytische Aktivität. Betrachtet man die in Abbildung 2-3 gezeigten elektrostatischen Potentiale, so fällt das im Gegensatz zum FeTFPPCl deutlich elektropositivere katalytische Zentrum des MnT4MPyPCl auf. Es ist denkbar, dass ein verstärkter nukleophiler Angriff des Wasserstoffperoxids eine Zerstörung des Komplexes verursacht, wobei die Art des Zentralatoms scheinbar eine bedeutende Rolle spielt. Nur Komplexe mit Metallionen mit hohen Reduktionspotentialen wie Eisen(III), Mangan(III) und Cobalt(III) werden durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zerstört, Komplexe mit beispielsweise Cr(III), Cu(II) und Zn(II) bleiben stabil<sup>35</sup>. *Schaefer und Mitarbeiter*<sup>36</sup> beschrieben die oxidative Zerstörung von Protoporphyrin IX und einem synthetischen Metalloporphyrin zu Maleinsäureimid und verschiedenen Pyrrol-Spezies, bei der nicht nur Wasserstoffperoxid, sondern auch die entstandene Oxenoid-Spezies die Zerstörung des Komplexes forciert.

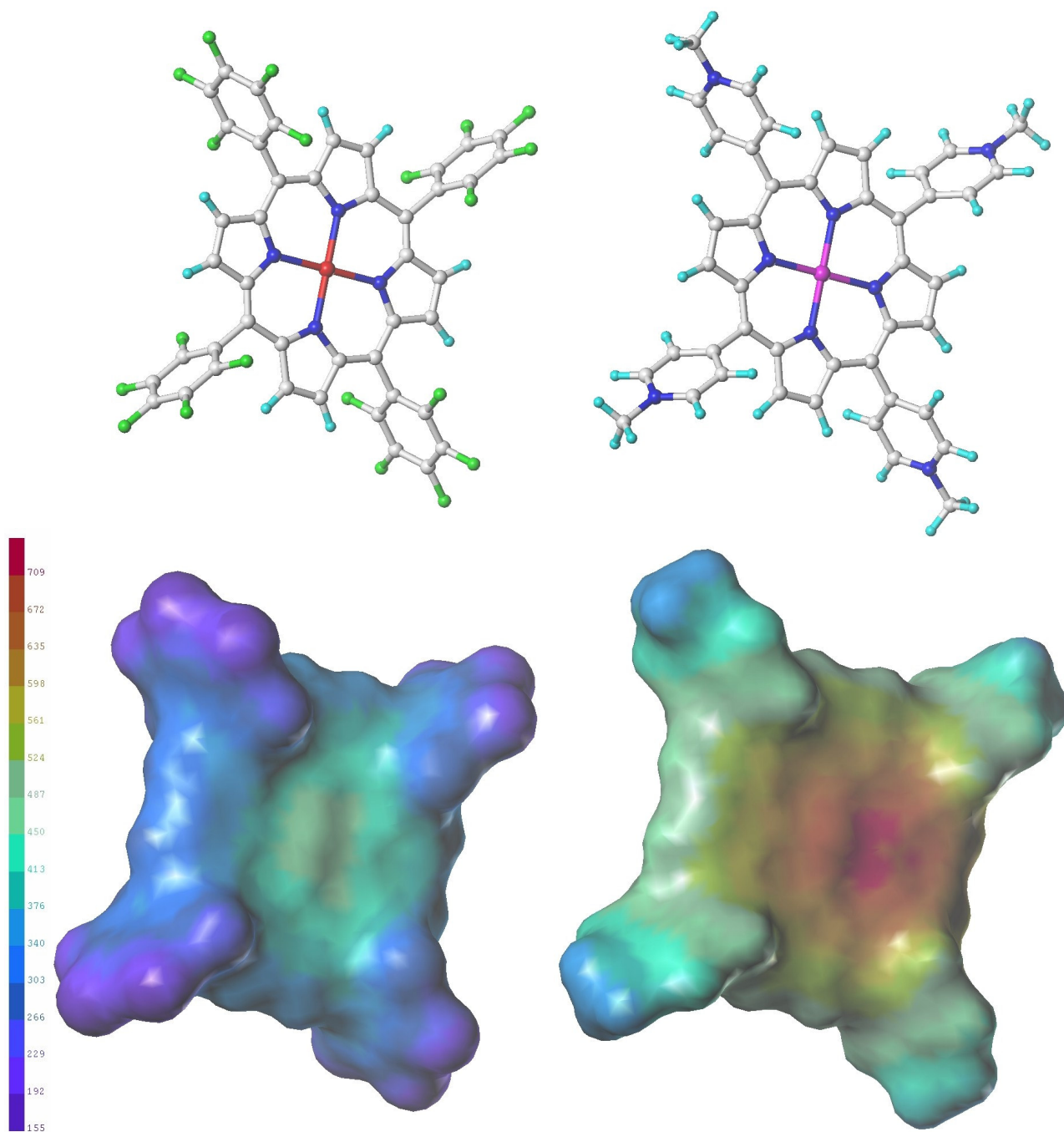


Abbildung 2-3 Elektrostatiches Potential von FeTFPPCl (links) und MnT4MPyCl (rechts), berechnet von Lemcke mit dem SYBYL Molecular Modelling Paket<sup>34</sup>. Auffallend ist das deutlich positivere elektrostatiches Potential des MnT4MPyCl, welches eine Zerstörung durch den oxidativen Angriff eines Sauerstoffdonators begünstigt.

## 2.3 Sauerstoffdonatoren und Cofaktoren

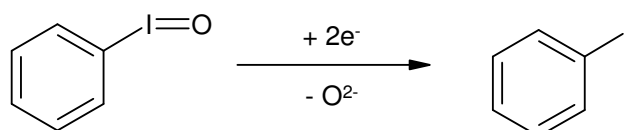
Um den oxidativen Teil des katalytischen Zyklus des Cytochrom P450 zu imitieren, werden synthetische Sauerstoffdonatoren eingesetzt, die bereits aktivierten Sauerstoff liefern. Dadurch wird der katalytische Zyklus über den Peroxid-Shunt abgekürzt.

Als Sauerstoffdonatoren werden Peroxoverbindungen (Peroxide, Periodate, Persulfate, Persäuren), hypervalente Iodverbindungen (Iodosobenzol, Pentafluoriodosobenzol), Hypochlorite und N-Oxide eingesetzt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Sauerstoffdonatoren und Cofaktoren sind im Folgenden aufgeführt.

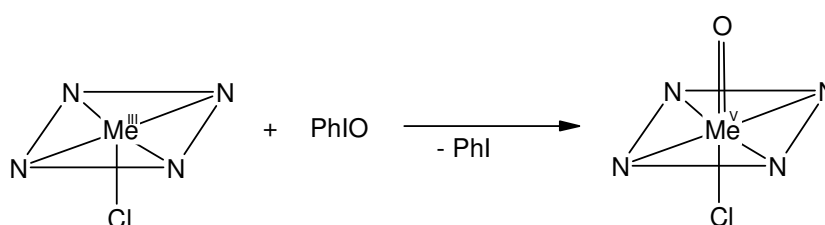
### 2.3.1 Iodosobenzol

Iodosobenzol ist eine hypervalente instabile Iodverbindung, die bereits nach einigen Stunden bei Raumtemperatur in Iodbenzol und Iodylbenzol disproportioniert<sup>37</sup>. Es ist ein starkes Oxidationsmittel und kann den Sauerstoff leicht unter Aufnahme von zwei Elektronen abgeben.



Schema 2-2 Reaktion des Sauerstoffdonors Iodosobenzol (PhIO) zu Iodobenzol (PhI)

Bei der Reaktion mit einem Metalloporphyrin wird dieses über den Peroxid-Shunt in die Oxenoid-Spezies überführt (siehe Abschnitt 1.1, Schema 1-2).



Jørgensen, K. A., *Chem. Rev.* **89**, 431-458 (1989).

Iodosobenzol wurde bereits 1976 als einer der ersten Sauerstoffdonatoren in biomimetischen Modellreaktionen von *Lichtenberger und Mitarbeitern*<sup>38</sup> eingesetzt. Für die Aufklärung von intermediär auftretenden Metall-Sauerstoffkomplexen mit spektroskopischen Methoden wurde Iodosobenzol bevorzugt eingesetzt, da es selbst nur äußerst gering und sein Abbauprodukt Iodbenzol nicht oxidierbar ist<sup>39</sup>.

### 2.3.2 *m*-Chlorperoxybenzoesäure

Die Persäure *m*-Chlorperoxybenzoesäure ist als Sauerstoffdonator anderen Peroxiden und Persäuren in der Reaktivität, der Stereoselektivität sowie in der Reinheit und Ausbeute der Produkte weit überlegen. Sie wird bevorzugt für Epoxidierungen, aber auch für Hydroxylierungen und für die Bildung von N- und S-Oxiden eingesetzt<sup>13</sup>.

### 2.3.3 Magnesiummonoperoxyphthalat-Hexahydrat

Magnesiummonoperoxyphthalat wird als Sauerstoffdonator bei Hydroxylierungen von Alkanen und Arenen, bei Epoxidierungen von Alkenen sowie für die Bildung von Chinonen eingesetzt und ist im Gegensatz zu vielen anderen Sauerstoffdonatoren nicht stoß- und schlagempfindlich. Es handelt sich um ein starkes Oxidationsmittel mit schwach sauren Eigenschaften, wodurch das Arbeiten ohne gepufferte Systeme ermöglicht wird<sup>40</sup>.

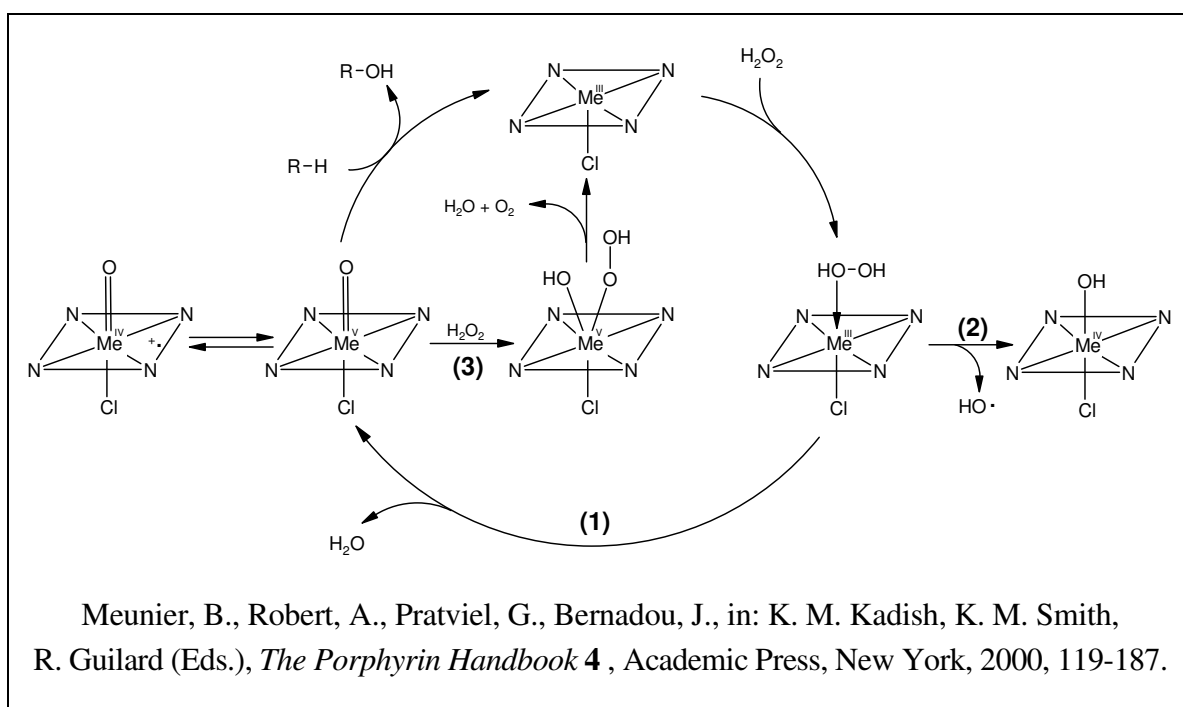
### 2.3.4 Tetra-*N*-butylammoniumperiodat

Bei Tetra-*N*-butylammoniumperiodat handelt es sich um einen potenten Sauerstoffdonator, der besonders im neutralen Milieu und unter homogenen Reaktionsbedingungen eingesetzt wird. *Takata und Ando*<sup>41</sup> beschrieben damit bereits 1983 Sulfoxid-Bildungen und Desmethylierungen von N-methylierten Anilinen.

### 2.3.5 Wasserstoffperoxid

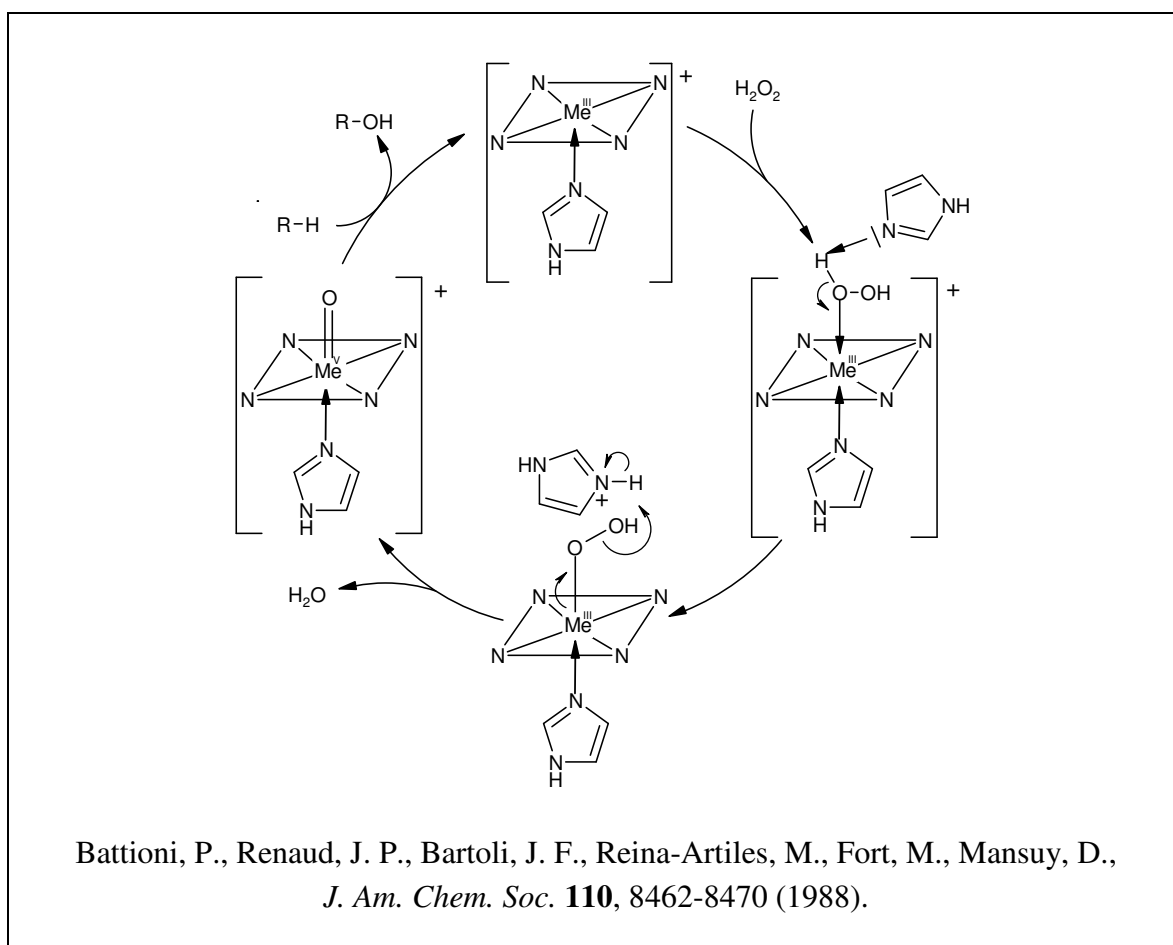
Wasserstoffperoxid ist in Gegenwart von Übergangsmetallkomplexen sehr reaktiv und wird bevorzugt als Sauerstoffdonator eingesetzt, da die Zerfallsprodukte Sauerstoff und Wasser das Isolieren und Reinigen von Reaktionsprodukten erleichtern.

Von *Meunier und Mitarbeitern*<sup>13</sup> sind verschiedene Wege der Aktivierung von Wasserstoffperoxid durch Metalloporphyrine beschrieben worden. Die Bildung der Oxenoid-Spezies, die für die Sauerstoffübertragung auf ein Substrat benötigt wird, erfolgt nach einer heterolytischen Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung des Wasserstoffperoxids und Interaktion mit dem Zentralatom **(1)**. Es erfolgen aber auch zwei unerwünschte Abläufe, zum einen die homolytische Spaltung, die zu einem hydroxylierten Komplex und einem Hydroxylradikal führt **(2)** und zum anderen die Anlagerung eines zweiten Wasserstoffperoxidmoleküls an die Oxenoid-Spezies, wodurch Wasser und molekularer Sauerstoff entstehen **(3)**. Diese verschiedenen Reaktionswege verlaufen parallel, so dass die Bildung der Oxenoid-Spezies Konkurrenzreaktionen unterworfen ist. Dies mindert die Effektivität von Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator.



### 2.3.6 Imidazol

Die Stickstoffbase Imidazol wird besonders bei Einsatz des Sauerstoffdonators Wasserstoffperoxid dem Modellsystem zugesetzt. Sie dient als fünfter Ligand am Metalloporphyrin-Komplex und imitiert den Effekt der Thiolatgruppe des Cytochrom P450-Enzyms. Imidazol fungiert als axialer Ligand (proximaler Effekt) und als Säure-Base-Katalysator zur Erleichterung der heterolytischen Spaltung der Peroxidbindung<sup>13</sup>.



### **2.3.7 Kupfer(II)-Ionen**

Kupfer stellt für den Organismus ein essentielles Spurenelement dar, der Kupfer-Serumgehalt liegt bei 12-24  $\mu\text{mol/L}$ <sup>42</sup>. Kupferionen spielen eine Rolle bei der Oxidation von Nitroxylanionen ( $\text{NO}^-$ ), welche unter anderem aus Angeli's Salz und Hydroxylamin freigesetzt werden<sup>43</sup>. Kupfer(II)-sulfat wurde in dieser Arbeit zur Steigerung der Freisetzung oxidiertes Stickstoffspezies aus verschiedenen Substraten verwendet.

## **2.4 Lösungsmittel**

Für die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Modellsysteme wurde als Lösungsmittel ein Phosphatpuffer mit dem physiologischen pH-Wert von 7,4 verwendet. Vereinzelt wurden auch ein Citratpuffer pH 4,5 und ein Boratpuffer pH 9,0 für Untersuchungen der  $\text{NO}^-$ , Nitrit- und Nitrat-Freisetzung eingesetzt.

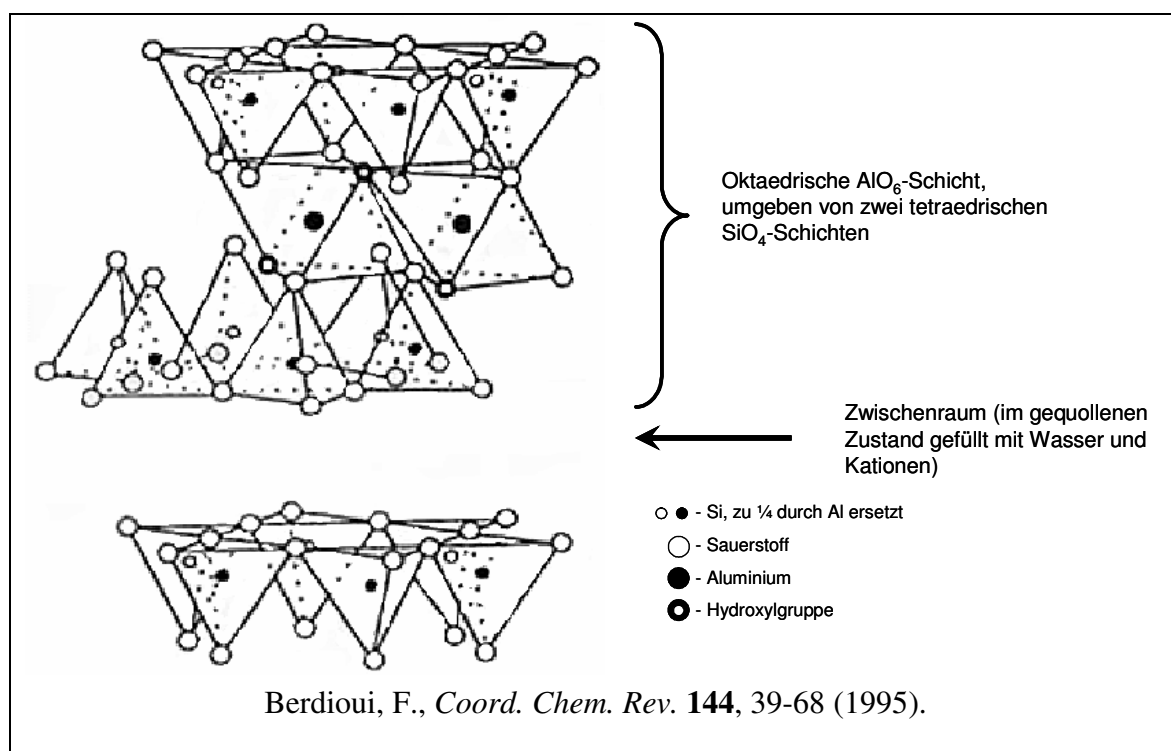
### 3 Immobilisierung von Metalloporphyrinen

#### 3.1 Einleitung und Literaturübersicht

Aufgrund der hohen Löslichkeit von Metalloporphyrinen in polaren und apolaren Lösungsmitteln, wurde in dieser Arbeit zwecks erleichterten Abtrennens der Katalysatoren aus Reaktionsansätzen und der erhöhten Stabilität unter oxidativen Bedingungen eine Immobilisierung gefordert. Eine Immobilisierung sollte eine möglichst hohe verbleibende Aktivität der Metalloporphyrine und einen wiederholter Einsatz nach dem Abtrennen ermöglichen, wofür ebenso die hohen Anschaffungskosten sprechen.

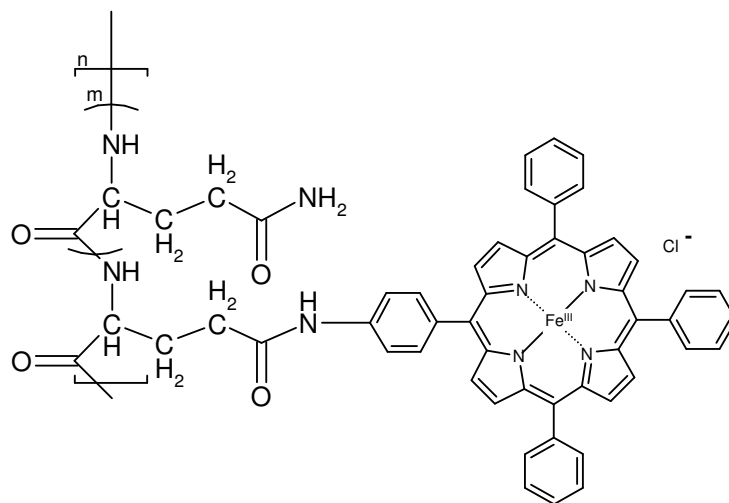
Immobilisierungen von Enzymen, enzymproduzierenden Mikroorganismen oder Zellen als Biokatalysatoren sind besonders im Bereich der Biotechnologie weit verbreitet. Dies dient insbesondere der Stabilisierung, Erhöhung der Belastbarkeit und Wiedergewinnung der oft teuren Substrate<sup>44, 45</sup>.

Die Immobilisierung von Metalloporphyrinen an Tonmineralien wurde von *Bedioui*<sup>46</sup> beschrieben. Montmorillonit findet am häufigsten Verwendung. Hierbei handelt es sich um ein dreischichtiges Aluminosilikat, welches sich durch die Fähigkeit auszeichnet, kationische Substanzen einlagern zu können.



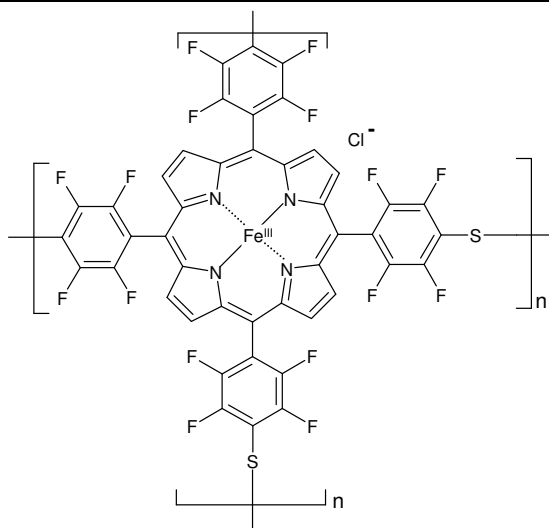


*Mori und Mitarbeiter*<sup>47</sup> konnten durch die Polymerisierung eines Porphyrins mit einem Polypeptid für die Hydroxylierung von Anilin mit Wasserstoffperoxid einen effektiveren und selektiveren Katalysator schaffen.



Mori, T., Santa, T., Hirobe, M., *Tetrahedron Lett.* **26**, 5555-5558 (1985).

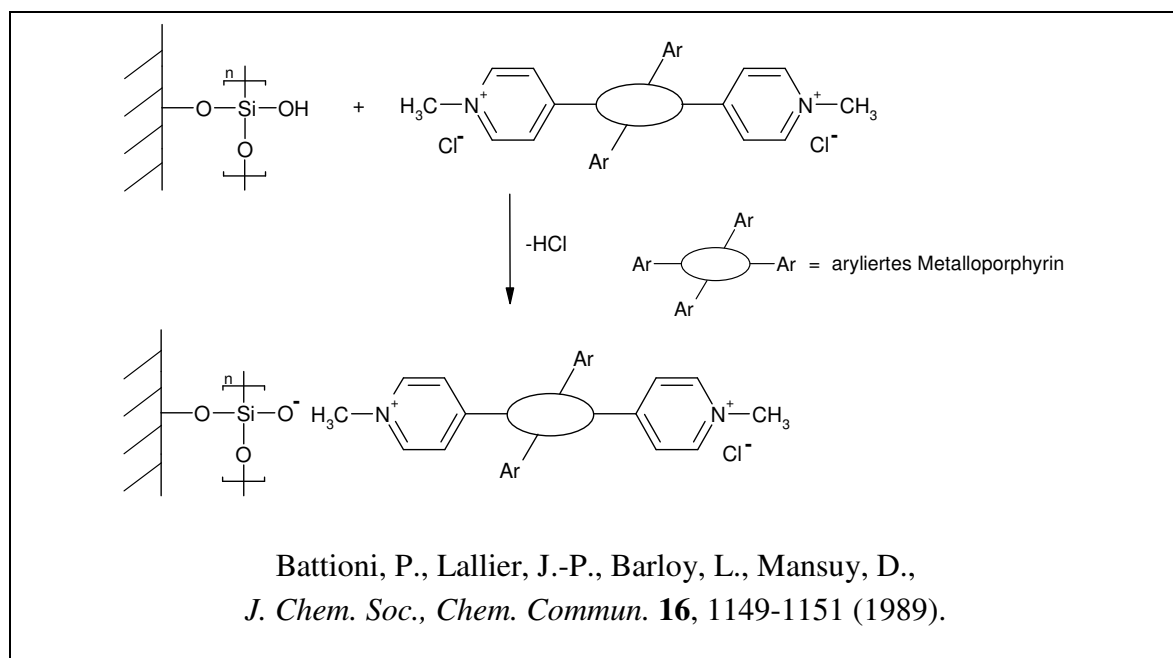
Durch nukleophile Substitution können polyhalogenierte Porphyrine quervernetzt werden. *Traylor und Mitarbeiter*<sup>29</sup> gelang eine Polymerisierung von FeTFPPCl mit Natriumsulfid.



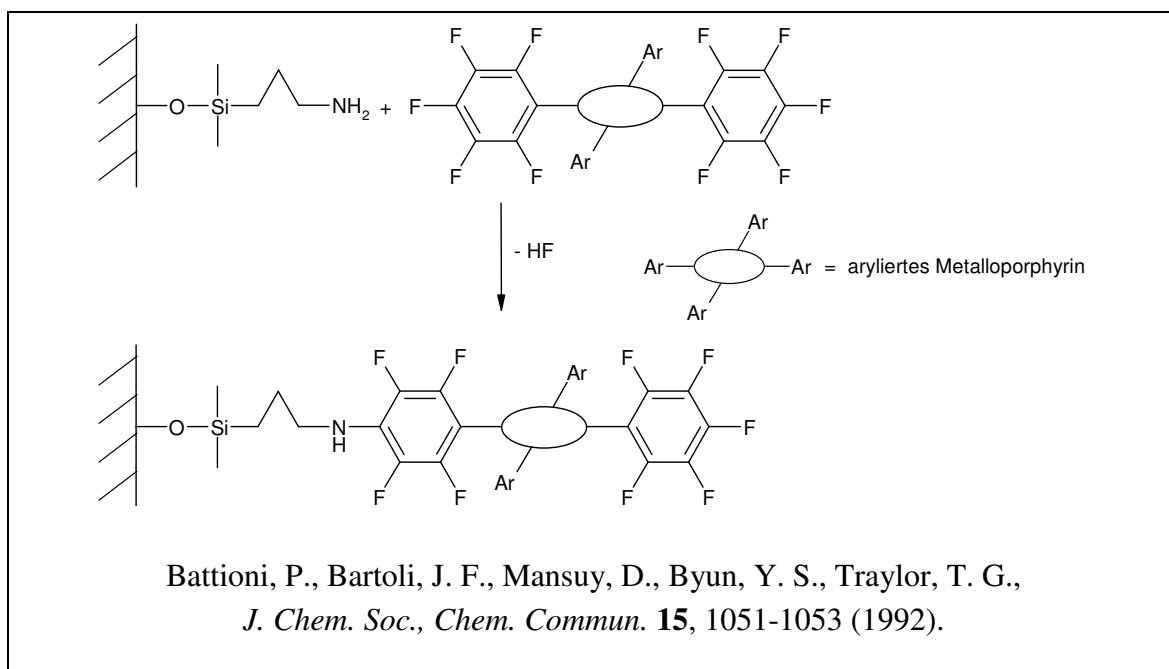
Traylor, G. T., Byun, Y. S., Traylor, P. S., Battioni, P., Mansuy, D.,  
*J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7821-7823 (1991).

Kieselgele spielen eine große Rolle als Adsorptions- und Trägermaterial, da sie gegenüber den meisten Medien äußerst beständig sind. Sie können durch an der Oberfläche angeordnete Siloxan- und Silanolgruppen kationische Porphyrine adsorbieren. Starke Wechselwirkungen stabilisieren das Porphyrin, wodurch dieses in den meisten organischen Lösungsmitteln nicht, oder nur sehr langsam vom Trägermaterial wieder abgelöst wird.

*Battioni und Mitarbeiter*<sup>28</sup> beschrieben diese Immobilisierung mit MnT4MPyPcI, *Nenoff und Mitarbeiter*<sup>48</sup> für FeT4MPyPcI nach derselben Methode. Mit Hilfe von Elementaranalysen geben *Battioni und Mitarbeiter* für MnT4MPyPcI eine Belegung von 10 % (m/m) am Kieselgel an, *Nenoff und Mitarbeiter* beschreiben für MnT4MPyPcI hingegen nur eine Belegung von 4,3 % (m/m) und für FeT4MPyPcI eine Belegung von 4,0 % (m/m).



Perfluorierte Metalloporphyrine gehen in *para*-Position eine nukleophile Substitution ein, die bereits bei der Polymerisierung mit Natriumsulfid angewendet wurde. Eine kovalente Bindung kann ebenfalls bei der Immobilisierung mit modifizierten Kieselgelen erhalten werden. *Battioni und Mitarbeiter*<sup>49</sup> beschrieben die Immobilisierung von MnTFPPcI und FeTFPPcI an aminopropyliertem Kieselgel in Diethylenglycoldimethylether. Für MnTFPPcI wird eine Belegung von 6,0 % (m/m) und für FeTFPPcI von 9,7 % (m/m) angegeben.



Da Kieselgele als Trägermaterial für die Immobilisierung von Metalloporphyrinen weit verbreitet sind und sich unkompliziert verarbeiten lassen, sollten die beiden zuletzt beschriebenen Methoden in dieser Arbeit verwendet und verbessert werden.

Alle Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben ( $n = 3$ ). Die statistischen Bewertungen erfolgen nach Fishers F-Test und dem Student t-Test mit einem Vertrauensbereich von 95 %.

### 3.2 Immobilisierungen nach Literaturvorschriften

Die Immobilisierung aller Metalloporphyrine erfolgte zunächst streng nach den Literaturvorschriften von *Battioni und Mitarbeitern*<sup>28, 49</sup>.

Für die Immobilisierung von MnT4MPyPcI und FeT4MPyPcI wurde jeweils aus Metalloporphyrin und Kieselgel 60 (40 – 63  $\mu\text{m}$ ) in Methanol eine Suspension hergestellt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Rückstandes wurde dieser mit Dichlormethan und Acetonitril gewaschen.

Die perfluorierten Metalloporphyrine MnTFPPcI und FeTFPPcI wurden jeweils mit Aminopropyl-Kieselgel in Diethylenglycoldimethylether drei Stunden unter Argon bei 140 °C gerührt. Der nach Filtrieren erhaltene

Rückstand wurde auf dem Filterpapier mit Dichlormethan, Cyclohexan, Dimethylformamid, Acetonitril, Ethanol sowie Diethylether und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur nochmals mit Dichlormethan gewaschen. Danach erfolgte das Trocknen der immobilisierten Metalloporphyrine für 24 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank. Nach diesen Vorgaben wurden die Immobilisierungen der Metalloporphyrine wiederholt. Um eine verlässliche quantitative Aussage über die absolute Belegung eines Metalloporphyrins an seinem Trägermaterial treffen zu können, sollte hierfür zunächst eine UV/VIS-spektroskopische Methode entwickelt werden.

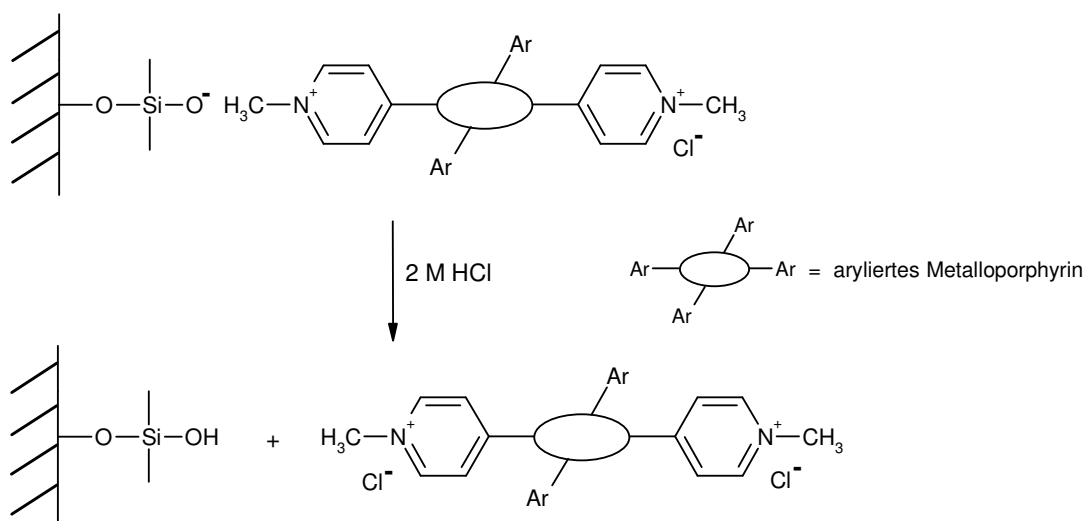
### **3.3 UV/VIS-spektroskopische Quantifizierung immobilisierter Metalloporphyrine**

Da alle hier eingesetzten Metalloporphyrine Absorptionsmaxima im visuellen Spektralbereich des Lichts aufweisen, wurde eine UV/VIS-spektroskopische Bestimmung in Lösung entwickelt. Nach Ablösen des jeweiligen Metalloporphyrins vom Trägermaterial konnte mit Hilfe einer Kalibrierkurve eine quantitative Bestimmung erfolgen.

#### **3.3.1 Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeT4MPyPCL**

Da MnT4MPyPCL und FeT4MPyPCL aufgrund ihrer Ladungen an der Oberfläche des Kieselgels adsorbiert sind, lassen sie sich durch Zugabe von verdünnten Säuren leicht wieder ablösen. Für diese Methode wurde eine definierte Menge an immobilisiertem Metalloporphyrin durch Zusatz von 2 M HCl vom Kieselgel gelöst, wie in Schema 3-1 dargestellt ist. Auf dem Boden des Probengefäßes verblieb das weiße Kieselgel, und der gefärbte Überstand konnte nach dem Erstellen einer Kalibrierkurve gegen 2 M HCl vermessen werden.

Die erhaltenen Lösungen zeigten Absorptionsmaxima entsprechend den vom Hersteller *Porphyrin Systems* (Lübeck, Deutschland) angegebenen Werten von 462 nm für MnT4MPyPCL und von 414 nm für FeT4MPyPCL.



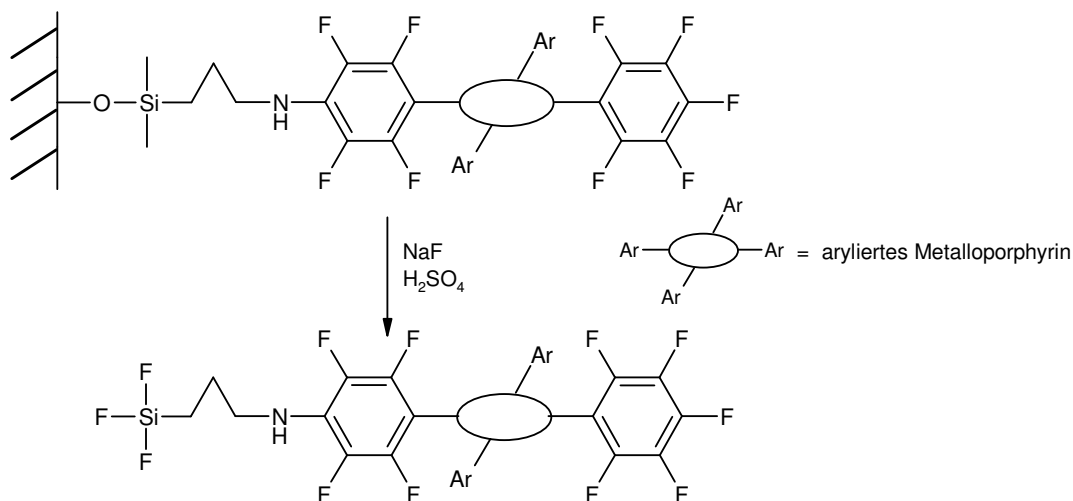
Schema 3-1 Lösen der kationischen Metalloporphyrine vom Trägermaterial

### 3.3.2 Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeTFPPCl

Die perfluorierten Metalloporphyrine MnTFPPCl und FeTFPPCl wurden durch eine nukleophile Substitution an das Aminopropyl-Kieselgel unter Ausbildung einer kovalenten Bindung immobilisiert. Diese Bindung lässt sich nicht durch Zugabe einer verdünnten Mineralsäure spalten. *Battioni und Mitarbeiter* führten einem schwefelsauren Ansatz des immobilisierten  $\text{H}_2\text{TFPP}^*$  40 %ige Flusssäure zu, extrahierten das gelöste Porphyrin in deuteriertem Dichlormethan und nahmen  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchungen vor, um die kovalente Bindung zu charakterisieren<sup>49</sup>. *Gaget* beschrieb das entstandene farbige Produkt als Porphyrin-NH[CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SiF<sub>3</sub>-Teilstück, welches unter vollständiger Zerstörung des Trägers erhalten wurde<sup>50</sup>.

Zur Abtrennung der perfluorierten Metalloporphyrine vom Trägermaterial wurde in dieser Arbeit mit Natriumfluorid in konzentrierter Schwefelsäure gearbeitet. Unter strenger Einhaltung der Reaktionszeit wurde unter Rückflusskühlung auf 70 °C erwärmt (Schema 3-2). Bei Überschreiten der Reaktionszeit oder Zugabe einer größeren Menge Natriumfluorid entfärbte sich die Lösung vollständig, und es kam zur Zerstörung des Porphyringerüsts.

\* Hierbei handelt es sich um ein perfluoriertes Porphyrin ohne zentrales Metallatom.



Schema 3-2 Abtrennung der perfluorierten Metalloporphyrine vom Trägermaterial

Zeigten die Lösungen der beiden abgelösten kationischen Metalloporphyrine die gleichen Absorptionsmaxima wie die jeweiligen Lösungen der nicht-immobilisierten Metalloporphyrine, so war bei den perfluorierten Metalloporphyrinen ein deutlicher Unterschied auffallend. Die Lösungen der nicht-immobilisierten Metalloporphyrine zeigten eine rot-braune Färbung in Schwefelsäure, ebenso waren die an Kieselgel immobilisierten Metalloporphyrine gefärbt. Die vom Hersteller *Porphyrin Systems* (Lübeck, Deutschland) für MnTFPPCl mit 475 nm und für FeTFPPCl mit 415 nm angegebenen Absorptionsmaxima konnten in unserem Labor bestätigt werden. Die Lösungen zeigten nach Reaktion mit Natriumfluorid in Schwefelsäure in beiden Fällen eine kräftige grüne Färbung. Da die Spektren der Lösungen dieselben Absorptionsmaxima zeigten (siehe Abbildung 3-1), ist eine Desmetallierung der Komplexe anzunehmen.

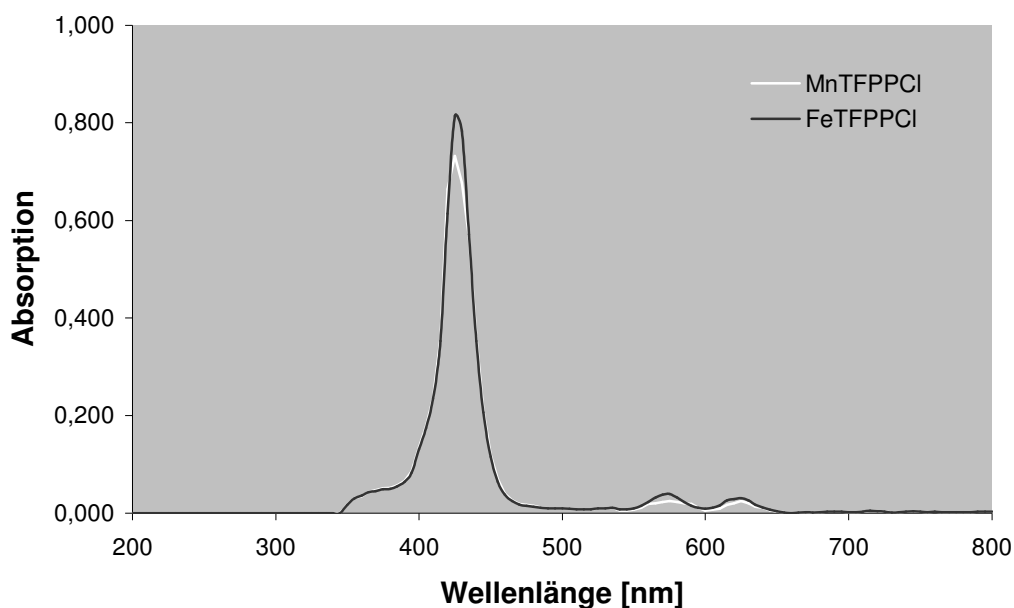


Abbildung 3-1 UV/VIS-Spektren der Lösungen von MnTFPPCl und FeTFPPCl nach Abtrennung vom Trägermaterial mit NaF in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; die Maxima liegen bei 427 nm

Im Falle einer vollständigen Desmetallierung der Metalloporphyrinkomplexe müssen die aus dem Komplex gelösten Metallkationen durch qualitative Farbreaktionen nachzuweisen sein.

Mangan(III)-Ionen sind in Lösung starke Oxidationsmittel und sehr instabil. Daher war zu erwarten, dass eine Reduktion von Mangan(III)-Ionen zu Mangan(II)-Ionen in der Untersuchungslösung erfolgen würde. Durch Zugabe von Ammoniumsulfid zur Untersuchungslösung und anschließendem Alkalisieren mit Ammoniak kam es zur Fällung von fleischfarbenem Mangan(II)-sulfid und Schwefel, wodurch ein bräunlich gefärbtes Gemisch entstand. In alkalischer Lösung wird das Mangan(II)-Ion leicht durch Luftsauerstoff zum Mangan(IV)-Ion oxidiert. Beim langsamen Alkalisieren der Untersuchungslösung zeigte sich dies durch eine braune Färbung und Fällung von Braunstein. Es wurden mit wässrigen Lösungen der Metalloporphyrine ohne Natriumfluorid/Schwefelsäure-Zusatz Blindversuche durchgeführt.

Für die Identifizierung von Eisen(III)-Ionen wurden der Nachweis als Berliner-Blau und die Fällung mit Ammoniumsulfid durchgeführt. Die Untersuchungslösung von FeTFPPCl in Natriumfluorid/Schwefelsäure zeigte

nach Zusatz von gelbem Blutlaugensalz eine sich vertiefende blaue Färbung. Die Zugabe von Ammoniumsulfid nach Alkalisieren der Untersuchungslösung mit Ammoniak ergab den schwarzen Niederschlag von Eisensulfid und eine gelbliche Trübung durch entstandenen Schwefel. Die Blindwerte zeigten keinerlei Farbreaktion, da die Metallkationen in den Komplexen fest eingebunden sind.

Da die durchgeführten Nachweise anzeigen, dass beide perfluorierten Metalloporphyrine bei der Ablösung vom Trägermaterial desmetalliert wurden, konnte bei der quantitativen Bestimmung sowohl für MnTFPPCl als auch FeTFPPCl dieselbe Kalibrierkurve verwendet werden.

### 3.3.3 Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen

In Tabelle 3-1 sind die mit der spektroskopischen Methode bestimmten prozentualen Werte für die Belegung des jeweiligen Metalloporphyrins am Träger und die in der Literatur genannten Werte aufgeführt.

	<i>Lit.</i> <sup>28, 48, 49</sup>	Belegung <sub>n. Literaturvorschr.</sub>
MnT4MPyPcI	4,3 %*	5,45 % s = 0,93 %
FeT4MPyPcI	4,0 %	6,38 % s = 0,77 %
MnTFPPCl	6,0 %	6,36 % s = 1,19 %
FeTFPPCl	9,7 %	4,85 % s = 0,98 %

Tabelle 3-1 Prozentuale Belegung von Metalloporphyrinen am Träger nach Literaturangabe und eigener Umsetzung nach Literaturvorschrift

Bis auf die Belegung von FeTFPPCl am Trägermaterial konnten alle Literaturangaben bestätigt und sogar übertroffen werden.

Im Folgenden sollten diese Methoden nun optimiert werden.

---

\* Der von *Battioni und Mitarbeitern* angegebene Wert von 10,0 % wird hier vernachlässigt, da er durch *Nenoff und Mitarbeiter*<sup>48</sup> und durch unsere Versuche nicht bestätigt werden konnte.



### 3.4 Optimierung der Methoden zur Immobilisierung

Die Anwendung der Mikrowellentechnologie in der chemischen Synthese hat sich in den letzten Jahren immer weiter verbreitet. Das Prinzip der auf Mikrowellen basierenden Reaktionen ist das ‚dielectric heating‘, welches gegenüber dem konventionellen Aufheizen vollkommen andere physikalische Bedingungen darstellt. Mikrowellenenergie besteht aus einem elektrischen und einem magnetischen Feld, wobei das elektrische Feld die Energie zum Aufheizen einer Substanz liefert. Polare Moleküle wechseln infolge des oszillierenden elektrischen Feldes ihre Ausrichtung. Dieses bewirkt eine Rotationsanregung von Dipolen. Die Frequenz der Mikrowellenstrahlung muss zum einen ausreichend gering sein, damit Dipole mit Rotation auf das sich verändernde Feld reagieren können, zum anderen darf keine dauerhafte Ausrichtung im elektrischen Feld und dadurch Wanderung der Dipole eintreten. Eine Molekularbewegung durch die Wanderung von Ionen oder ionischen Molekülen führt durch vermehrt auftretende Kollisionen zu einer Umwandlung von kinetischer Energie in Wärme. Es kommt so zu einer enorm raschen Aufwärmung von Dielektrika durch intermolekulare Reibung. Die Mikrowellentechnologie ermöglicht Reaktionen mit einem homogenen Wärmeprofil, was im Gegensatz zur konventionellen Reaktion bedeutend kürzere Reaktionszeiten mit sich bringt<sup>51, 52</sup>.

Die durch Mikrowellen unterstützte Immobilisierung wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung der an das Trägermaterial gebundenen Porphyrinmenge wurde die in Abschnitt 3.3 beschriebene spektroskopische Methode verwendet.

#### 3.4.1 Immobilisierung unter Einsatz der Synthesemikrowelle

##### Immobilisierung von Mn/FeT4MPyPCL

Um optimale Bedingungen für diese Reaktion zu erproben, wurden exemplarisch zunächst die Reaktionszeit und anschließend die Reaktionstemperatur bei der Immobilisierung von MnT4MPyPCL variiert.

Kieselgel, MnT4MPyPCL und Methanol wurden in die speziell für die Synthesemikrowelle vorgesehenen Probengefäße gegeben, mit Argon anaerobisiert und mit den dazugehörigen Septen verschlossen. Die Reaktionszeit ist, ausgehend von der in der Literatur beschriebenen

Temperatur von 25 °C, variiert worden. Damit diese nicht übermäßig durch die Energiezufuhr ansteigt, konnte eine zusätzliche Kühlung des Mikrowellengefäßes in der Synthesemikrowelle durch Trockeneis erreicht werden. Die Reaktionsansätze wurden jeweils 5, 10 und 15 Minuten der Mikrowellenenergie ausgesetzt (Tabelle 3-2). Hierbei resultierte eine Leistung von 15 W.

MnT4MPyPCL	Belegung <sub>MW</sub>
5 min	10,94 % s = 0,50 %
10 min	12,05 % s = 0,41 %
15 min	11,66 % s = 0,77 %

Tabelle 3-2 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPCL am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle (MW) bei unterschiedlichen Reaktionszeiten und 25 °C

Es zeigte sich nach 10 Minuten Reaktionszeit ein Optimum, und die prozentual Belegung von MnT4MPyPCL am Kieselgel ist deutlich gegenüber dem Literaturwert von 4,3 % (m/m) und dem unter Literaturbedingungen erhaltenen Wert von 5,45 % (m/m) gestiegen.

Bei der Optimierung der Reaktionstemperatur wurde die Reaktion für 10 Minuten bei 60 °C mit einer resultierenden Leistung von 25 W und bei 100 °C mit einer resultierenden Leistung von 150 W durchgeführt (Tabelle 3-3).

MnT4MPyPCL	Belegung <sub>MW</sub>
30 °C	12,05 % s = 0,41 %
60 °C	13,73 % s = 0,38 %
100 °C	11,62 % s = 0,60 %

Tabelle 3-3 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPCL am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle (MW) für 10 Minuten bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen

Die höchste Belegung von Metalloporphyrin am Träger war mit 13,73 % (m/m) nach 10 Minuten bei 60 °C erreicht.

Die Immobilisierung von FeT4MPyPcI wurde nur bei den mit MnT4MPyPcI ermittelten optimalen Bedingungen untersucht (Tabelle 3-4).

FeT4MPyPcI	Belegung <sub>MW</sub>
10 min / 60 °C	14,40 % s = 0,78 %

Tabelle 3-4 Prozentuale Belegung von FeT4MPyPcI am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 Minuten bei 60 °C

Auch hier konnte mit 14,40 % (m/m) eine deutliche Steigerung der Belegung von Metalloporphyrin am Trägermaterial gegenüber dem Literaturwert von 4,0 % (m/m) erreicht werden.

Obwohl es sich bei der Immobilisierung dieser kationischen Metalloporphyrine um ein Adsorptionsphänomen mit Stabilisierung durch starke Wechselwirkungen handelt, konnte durch den Einsatz der Mikrowellentechnologie eine deutliche Steigerung der Belegung beider Metalloporphyrine am Trägermaterial gezeigt werden (Tabelle 3-5).

	<i>Lit.</i> <sup>28, 48, 49</sup>	Belegung <sub>n. Literaturvorschr.</sub>	Belegung <sub>MW</sub>
MnT4MPyPcI	4,3 %	5,45 % s = 0,93 %	13,73 % s = 0,38 %
FeT4MPyPcI	4,0 %	6,38 % s = 0,77 %	14,40 % s = 0,78 %

Tabelle 3-5 Übersicht über die prozentuale Belegung der kationischen Metalloporphyrine am Trägermaterial nach Literaturangabe, Literaturvorschrift und Optimierung der Methode unter Einsatz der Synthesemikrowelle

### Immobilisierung von Mn/FeTFPPCl

Um die optimalen Bedingungen für diese Reaktion zu erproben, wurden für die Immobilisierung der perfluorierten Metalloporphyrine exemplarisch am Beispiel des MnTFPPCl die Reaktionszeit und anschließend die Reaktionstemperatur variiert.

Aminopropyl-Kieselgel, MnTFPPCl und Diethylenglycoldimethylether wurden in die speziell für die Synthesemikrowelle vorgesehenen Probengefäße gegeben, mit Argon anaerobisiert und mit den dazugehörigen Septen verschlossen. Die Reaktionszeit konnte nicht, ausgehend von der in der Literatur vorgegebenen Temperatur von 140 °C, variiert werden, da die maximale Leistung der Synthesemikrowelle von 300 W bereits bei einer Temperatur von 110 °C erreicht wurde. Daher wurden die Reaktionsansätze bei dieser maximal erreichbaren Temperatur 5, 10 und 15 Minuten der Mikrowellenenergie ausgesetzt (Tabelle 3-6). Hierbei resultierte eine Leistung von 300 W (n = 1).

MnTFPPCl	Belegung <sub>MW</sub>
5 min	12,99 %
10 min	13,44 %
15 min	12,85 %

Tabelle 3-6 Prozentuale Belegung von MnTFPPCl am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle bei unterschiedlichen Reaktionszeiten und 10 °C in Diethylenglycoldimethylether

Es zeigte sich nach 10 Minuten Reaktionszeit ein Optimum, und die prozentuale Belegung von MnTFPPCl am Aminopropyl-Kieselgel ist mit 13,44 % (m/m) deutlich gegenüber dem Literaturwert von 6,0 % (m/m) und dem unter Literaturbedingungen erhaltenen Wert von 6,36 % (m/m) gestiegen.

Für die Optimierung der Reaktionstemperatur wurde die Reaktion für 10 Minuten bei 90 °C mit einer resultierenden Leistung von 150 W und bei 70 °C mit einer resultierenden Leistung von 100 W durchgeführt (n = 1) (Tabelle 3-7).

MnTFPPCl	Belegung <sub>MW</sub>
70 °C	13,10 %
90 °C	14,29 %
110 °C	13,44 %

Tabelle 3-7 Prozentuale Belegung von MnTFPPCl am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 Minuten bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen in Diethylenglycoldimethylether

Hier zeigte sich ein Optimum bereits bei 90 °C mit einer prozentualen Belegung von 14,29 % (m/m).

Es ist anzunehmen, dass Diethylenglycoldimethylether als Lösungsmittel aufgrund seines hohen Siedepunktes von 162 °C gewählt wurde. Da gezeigt wurde, dass eine hohe Temperatur unter Einsatz der Mikrowelle für eine Steigerung der Ausbeute nicht notwendig ist und auch Lösungsmittel oberhalb ihres Siedepunktes eingesetzt werden könnten, wurde diese Optimierung in Dibutylether, einem kostengünstigeren Ether, wiederholt.\*

Tabelle 3-8 zeigt die Ergebnisse der Immobilisierung von MnTFPPCl bei unterschiedlichen Reaktionszeiten und 80 °C in Dibutylether. Hierbei resultierte eine Leistung von 200 W.

MnTFPPCl	Belegung <sub>MW</sub>
5 min	14,11 % s = 0,20 %
10 min	15,32 % s = 0,45 %
15 min	15,06 % s = 0,10 %

Tabelle 3-8 Prozentuale Belegung von MnTFPPCl am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle bei unterschiedlichen Reaktionszeiten und 80 °C in Dibutylether

---

\* Als Lösungsmittel ist auch Dichlormethan eingesetzt worden, wobei der Misserfolg der Reaktion bereits visuell anhand der nur schwach braunen Färbung des Kieselgels festgestellt wurde und sich jegliche weitere Analytik erübrigte.

Am zeitlichen Optimum von 10 Minuten wurde die Reaktion bei 60 °C und 100 °C wiederholt, wobei eine Leistung von 180 W beziehungsweise eine Leistung von 300 W auftraten.

MnTFPPCl	Belegung <sub>MW</sub>
60 °C	12,88 % s = 0,41 %
80 °C	15,32 % s = 0,45 %
100 °C	14,13 % s = 0,31 %

Tabelle 3-9 Prozentuale Belegung von MnTFPPCl am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen in Dibutylether

Mit MnTFPPCl konnte bei 80 °C für 10 Minuten eine deutliche Steigerung der Belegung am Trägermaterial mit 15,32 % (m/m) gegenüber dem Literaturwert von 6,0 % (m/m) erreicht werden, wobei die Verwendung eines anderen Ethers nur eine geringe Steigerung erbrachte.

FeTFPPCl wurde dann bei den mit MnTFPPCl ermittelten optimalen Bedingungen untersucht (Tabelle 3-10).

FeTFPPCl	Belegung <sub>MW</sub>
10 min / 80 °C	11,87 % s = 0,89 %

Tabelle 3-10 Prozentuale Belegung von FeTFPPCl am Trägermaterial nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 Minuten bei 80 °C in Dibutylether

Auch hier konnte mit 11,87 % (m/m) eine deutliche Steigerung der Belegung von Metalloporphyrin am Trägermaterial gegenüber dem ohne Einsatz der Mikrowelle erreichten Wert von 4,85 % (m/m) erzielt werden. Die Steigerung gegenüber der Literaturangabe von 9,7 % (m/m) ist allerdings nur gering.

Durch den Einsatz der Mikrowellentechnologie konnte eine deutliche Steigerung der Belegung von MnTFPPCl am Trägermaterial gezeigt werden, wie in der Übersicht (Tabelle 3-11) dargestellt. Im Fall der Immobilisierung

des FeTFPPCl konnte durch die Steigerung der Belegung mit der optimierten Methode der in der Literatur beschriebene Wert nur knapp überschritten werden.

	<i>Lit.</i> <sup>28, 48, 49</sup>	Belegung <sub>n. Literaturvorschr.</sub>	Belegung <sub>MW</sub>
MnTFPPCl	6,0 %	6,36 % s = 1,19 %	15,32 % s = 2,92 %
FeTFPPCl	9,7 %	4,85 % s = 0,98 %	11,87 % s = 0,89 %

Tabelle 3-11 Übersicht über die prozentuale Belegung der perfluorierten Metalloporphyrine am Trägermaterial nach Literaturangabe, eigener Umsetzung nach Literaturvorschrift und Optimierung der Methode unter Einsatz der Synthesemikrowelle (MW)

### 3.4.2 Immobilisierung ohne Lösungsmittel

Durch den Einsatz der Mikrowellentechnologie sind durch die besondere Übertragung von Energie auch lösungsmittelfreie Reaktionen möglich. In der Literatur sind bereits Reaktionen beschrieben, bei denen Edukt und Oxidans zusammen mit Kieselgel oder Montmorillonit in einem lösungsmittelfreien Ansatz in einer Synthesemikrowelle zur Reaktion gebracht wurden. Nach Beenden der Reaktion wurde das Produkt mit unterschiedlichen Lösungsmitteln vom Trägermaterial extrahiert<sup>53-55</sup>.

Die Immobilisierung der verwendeten Metalloporphyrine ohne Lösungsmittel wurde im Folgenden exemplarisch an MnT4MPyPcI und MnTFPPCl durchgeführt.

Beide Metalloporphyrine wurden nach derselben Vorschrift behandelt.

Das entsprechende Kieselgel wurde mit einem Magnetrührkern in einem Mikrowellengefäß vorgelegt. Das Metalloporphyrin wurde in wenigen Tropfen Methanol gelöst, um dann ebenfalls in das Gefäß überführt zu werden. Das Methanol wurde nach Durchmischen über einem Magnetrührer umgehend unter vermindertem Druck entfernt, so dass das Metalloporphyrin nur wenige Sekunden in Kontakt mit einem Lösungsmittel stand. Ein Durchmischen ohne Lösungsmittel erwies sich als ungeeignet, da auftretende Stäube einen zu großen Verlust an Katalysator bedeuteten.

Beide Ansätze wurden dann für jeweils 10 Minuten bei 300 W der Mikrowellenenergie ausgesetzt. Dabei resultierte für die Reaktion mit MnT4MPyPcI eine Temperatur von 65 °C und für die Reaktion mit MnTFPPcI eine Temperatur von 68 °C. Die weitere Bearbeitung erfolgte, wie zuvor beschrieben. Wie aus Tabelle 3-12 ersichtlich, konnte keine große Steigerung der Belegung am Trägermaterial erreicht werden (siehe auch Tabelle 3-11).

	Belegung <sub>tr.</sub>
MnT4MPyPcI	13,91 % s = 0,13 %
MnTFPPcI	15,44 % s = 0,22 %

Tabelle 3-12 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI am Träger nach Immobilisierung ohne Lösungsmittel (tr.) in der Synthesemikrowelle

Dennoch zeichnet sich diese Methode durch eine sauberere Handhabung der Ansätze aus.

### 3.4.3 Abschließende Betrachtung zur Immobilisierung von Metalloporphyrinen

Durch die beschriebenen Methoden konnte eine drastische Steigerung der Belegung der hier verwendeten Metalloporphyrine am Trägermaterial erreicht werden. Tabelle 3-13 stellt eine Gesamtübersicht der Ergebnisse dar.

	Lit. <sup>28, 48, 49</sup>	Belegung <sub>lit.</sub> Literaturvorschr.	Belegung <sub>MW</sub>	Belegung <sub>tr.</sub>
MnT4MPyPcI	4,3 %	5,45 % s = 0,93 %	13,73 % s = 0,38 %	13,91 % s = 0,13 %
FeT4MPyPcI	4,0 %	6,38 % s = 0,77 %	14,40 % s = 0,78 %	-
MnTFPPcI	6,0 %	6,36 % s = 1,19 %	15,32 % s = 2,92 %	15,44 % s = 0,22 %
FeTFPPcI	9,7 %	4,85 % s = 0,98 %	11,87 % s = 0,89 %	-

Tabelle 3-13 Gesamtübersicht über die prozentuale Belegung aller Metalloporphyrine am Trägermaterial nach Literaturangabe und Literaturvorschrift unter Einsatz der Mikrowelle mit und ohne Lösungsmittel



Betrachtet man die statistische Signifikanz dieser Ergebnisse, so bewirkt der Einsatz der Mikrowellentechnologie für diese Reaktion einen deutlichen Vorteil. Gegenüber den Ansätzen nach den entsprechenden Literaturvorschriften, zeigte sich eine signifikante Steigerung der Belegung, wie in Abbildung 3-2 grafisch dargestellt ist. Eine statistische Aussage gegenüber den Literaturwerten ist nicht zulässig, da diese Werte ohne Angabe eines Fehlers beschrieben wurden. Dennoch wird durch die Ausbeutesteigerung von bis zu 360 % im Falle des FeT4MPyPCI der Nutzen dieser neuen Methode deutlich. Die Immobilisierung ohne Lösungsmiteleinsatz zeigte zwar leicht erhöhte Werte gegenüber der Immobilisierung mit Lösungsmittel und Einsatz der Mikrowellentechnologie, jene waren allerdings nicht signifikant erhöht.

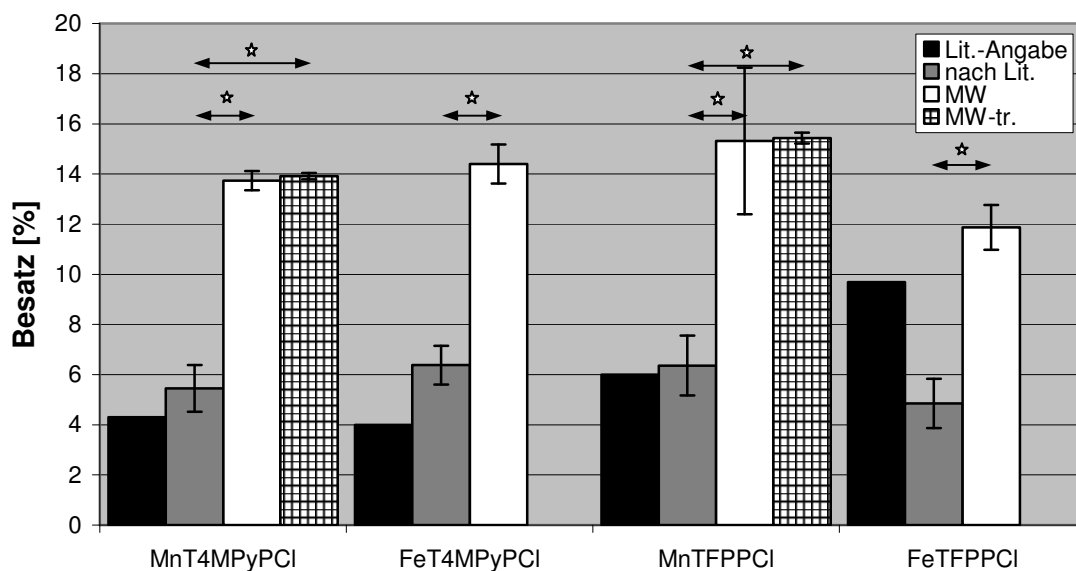


Abbildung 3-2 Gesamtübersicht der erreichten prozentualen Belegung aller Metalloporphyrine am Trägermaterial

Durch den Einsatz der Mikrowellentechnologie können die Reaktionsbedingungen im Gegensatz zur konventionellen Methode im Ölbad konstant gehalten werden (Abbildung 3-3). Dies erklärt eine geringere Standardabweichung der Messergebnisse, sieht man von der Standardabweichung bei der Immobilisierung von MnTFPPCI ab.

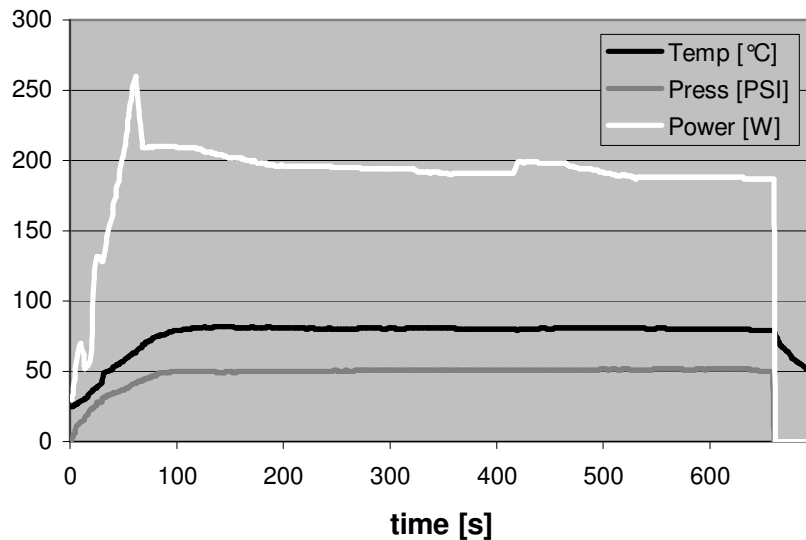


Abbildung 3-3 Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung der perfluorierten Metalloporphyrine in Dibutylether mit einer Vorlaufzeit von 60 Sekunden

Besonders auffällig ist die deutlich geringere Standardabweichung bei der Immobilisierung ohne Lösungsmittel. Dies stellt einen weiteren beachtlichen Vorteil dieser Methode dar.

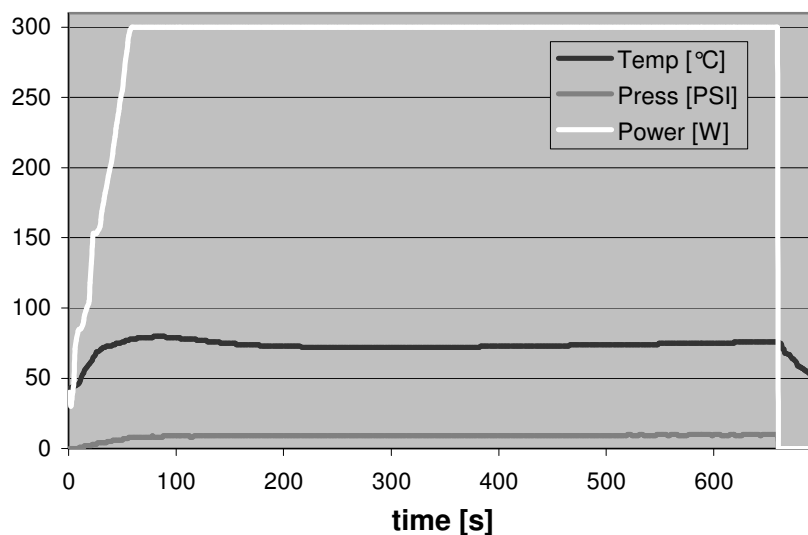


Abbildung 3-4 Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung von MnTFPPCl ohne Lösungsmittel mit einer Vorlaufzeit von 60 Sekunden

Auch hier waren die Reaktionsbedingungen konstant (Abbildung 3-4), und es konnte bei relativ geringen Temperaturen die maximale Leistung von 300 W erreicht werden. Die Immobilisierung ohne Lösungsmittel in der

Synthesemikrowelle ist demzufolge der Immobilisierung mit Lösungsmittel und Einsatz der Mikrowellentechnologie vorzuziehen.

### **3.5 Aktivitätsbestimmung immobilisierter Metalloporphyrine**

Für den Einsatz immobilisierter Metalloporphyrine ist die nach der Immobilisierung verbleibende Aktivität als Katalysator von großer Bedeutung. Hierfür wurde eine Chemilumineszenz-Methode entwickelt, die über die Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung aus einem NO-Donator einen direkten Vergleich zwischen immobilisierten und nicht-immobilisierten Metalloporphyrinen ermöglicht.

#### **3.5.1 Prinzip der Chemilumineszenzmessung**

Die Chemilumineszenzmessung stellt eine direkte Nachweismethode für NO dar. Hierbei reagiert NO mit aus Carbogen generiertem Ozon unter Sauerstoffausschluss zu NO<sub>2</sub> in einem angeregten Zustand. Bei der Rückkehr in den Grundzustand werden Lichtquanten ausgesendet, deren Intensität proportional zu der freigesetzten NO-Menge ist. Diese Methode wurde bereits von *Runge*<sup>56</sup> ausführlich beschrieben.

Neben NO können auch Nitrit und Nitrat bestimmt werden. Entstandenes Nitrit wird mit Kaliumiodid im sauren Milieu zu NO quantitativ umgesetzt. Die quantitative Reduktion von Nitrat zu NO erfolgt mit Vanadium(III)-chlorid in Salzsäure.

Der apparative Versuchsaufbau ist in Abbildung 3-5 gezeigt.

Das aus einer Probe freigesetzte NO wird mittels Argon als Trägergas aus dem auf 37 °C temperierten Reaktionsgefäß in das Messgerät gespült. Dort kann mit Hilfe eines Photomultipliers die auftretende Chemilumineszenz detektiert werden. Die Konzentrationsberechnungen erfolgten über die Integration der erhaltenen Peakflächen mit Hilfe der entsprechenden Kalibrierkurve. Die Kalibrierung erfolgte aufgrund der quantitativen Umsetzung von Nitrit in essigsaurer Kaliumiodidlösung zu NO mit einer 50 µM Kaliumnitritlösung. Für die Nitrat-Bestimmung erfolgte die Kalibrierung durch Zugabe einer 100 µM Kaliumnitratlösung zu einer gesättigten Vanadium(III)-chloridlösung in 1 M Salzsäure bei 95 °C.

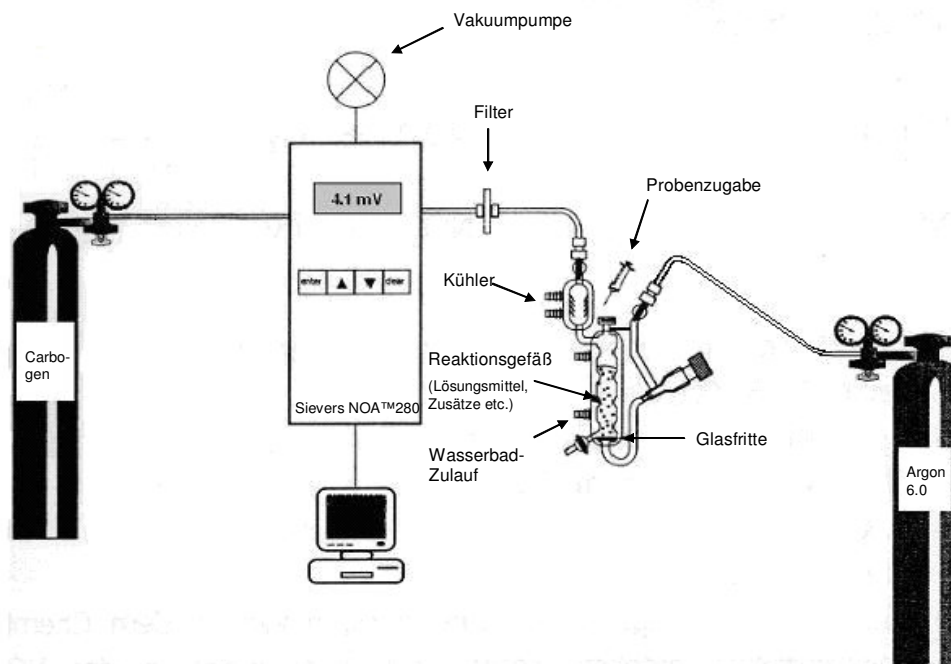


Abbildung 3-5 Versuchsaufbau für die NO-Messung mit dem NOAnalyzer™ der Firma Sievers (Boulder, USA) mit Glasapparatur

Die Reaktionen können sowohl in dem Reaktionsgefäß der Glasapparatur (Liquid-Methode) als auch in einem externen Probengefäß durchgeführt werden, wobei der Gasüberstand des Reaktionsansatzes mit einer gasdichten Spritze in das Reaktionsgefäß überführt wird (Headspace-Methode).

### 3.5.2 Suche nach einem geeigneten Modellsystem für die Chemilumineszenzmethode

Die zu Grunde liegende Idee dieser Methode war es, ein Modellsystem zu konstruieren, welches aus einem NO-Donator, einem Sauerstoffdonator und einem Metalloporphyrin besteht und oxidativ NO freisetzt. Über die freigesetzte Menge NO sollte dann auf die Aktivität des eingesetzten Metalloporphyrins geschlossen werden können. Für eine geeignete Modellschubstanz bestand die Bedingung, dass die oxidative NO-Freisetzung durch alle verwendeten Metalloporphyrine deutlich gesteigert werden sollte. In der Literatur wurden bereits vielfach Substanzen mit Hydroxyiminopartialstruktur beschrieben, die unter oxidativen Bedingungen NO freisetzen<sup>57</sup>. Zu dieser Gruppe gehören Oxime, die ebenso als NO-Donatoren beschrieben wurden<sup>58-60</sup>.

Aufgrund weiterführender Studien von *Rickerts*<sup>43</sup> wurde Cyclohexanonoxim für dieses Modell ausgewählt. Zunächst wurden nach der Liquid-Methode alle hier verwendeten Metalloporphyrine als Katalysatoren für die Reaktion von Cyclohexanonoxim mit Iodosobenzol als Sauerstoffdonator eingesetzt, um ein Ansprechen auf die Modells substanz zu erproben (n = 6).

Die Freisetzung von NO wird in einem prozentualen Verhältnis von der gemessenen molaren Menge NO zur eingesetzten molaren Menge Cyclohexanonoxim angegeben.

Unter nicht-oxidativen Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von Iodosobenzol, zeigte Cyclohexanonoxim keine Freisetzung von NO (Abbildung 3-6). Zusammen mit Iodosobenzol, aber ohne Katalysator konnten etwa 3 % NO detektiert werden. Durch Zugabe eines der vier verwendeten Metalloporphyrine konnte in jedem Fall eine statistisch signifikante Steigerung der NO-Freisetzung gegenüber dem nicht-katalysierten Ansatz erreicht werden. MnTFPPCl steigerte die Freisetzung sogar um den Faktor 2,5. Ebenfalls wurde deutlich, dass die beiden manganhaltigen Metalloporphyrine die NO-Freisetzung statistisch signifikant gegenüber den beiden eisenhaltigen Metalloporphyrinen erhöht haben.

Diese Untersuchung bestätigte die Tauglichkeit des Modellsystems.

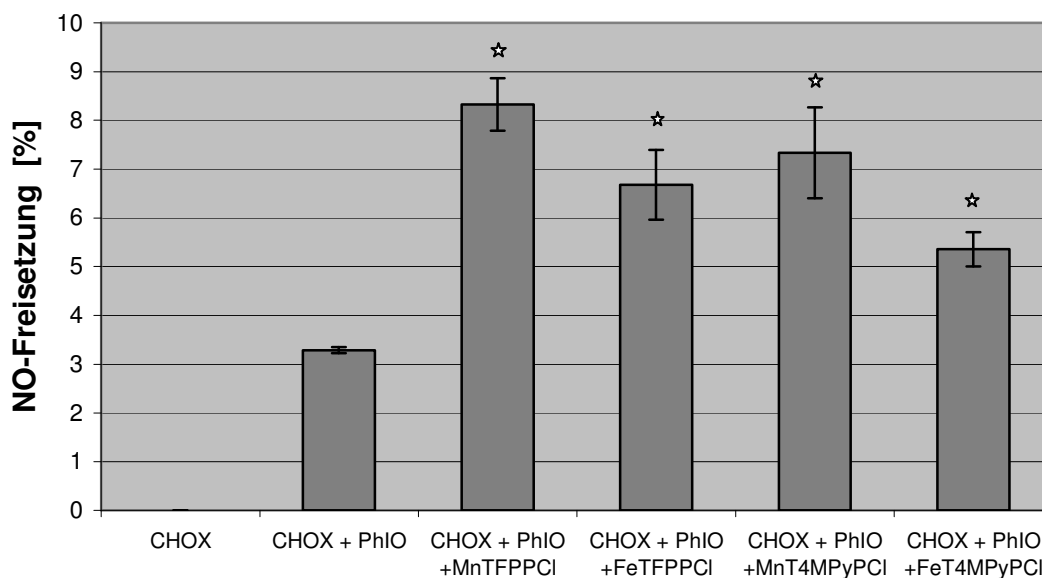


Abbildung 3-6 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim (CHOX) mit Iodosobenzol unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine (Liquid-Methode)

### 3.5.3 Untersuchung der immobilisierten Metalloporphyrine

Nachdem die Zweckmäßigkeit der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim durch die verwendeten Metalloporphyrine mit der Liquid-Methode bestimmt wurde, ist der direkte Vergleich von löslichen und immobilisierten Metalloporphyrinen mit der Headspace-Methode durchgeführt worden, da das Kieselgel als Träger der immobilisierten Metalloporphyrine zu Verstopfungen der Glasfritte des NOA<sup>TM</sup> führen kann. Im Vorwege sei anzumerken, dass ein direkter Vergleich der prozentualen Ergebnisse aus Liquid- und Headspace-Methode nicht möglich ist, da es sich bei der Liquid-Methode um eine erschöpfende Freisetzung aus dem Substrat handelt und bei der Headspace-Methode um eine Freisetzung bis zur Einstellung eines physikochemischen Gleichgewichts im externen Probengefäß. Daher sind die prozentualen Ausbeuten bei Arbeiten nach der Headspace-Methode zwangsläufig geringer. Durch die Quantifizierung der Belegung von Metalloporphyrin am Trägermaterial in Abschnitt 3.3 war es möglich, gleiche Mengen an löslichem und immobilisiertem Metalloporphyrin einzusetzen, welches die Voraussetzung für einen Vergleich darstellte.

In Abbildung 3-7 sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der nach der Literaturvorschrift immobilisierten Metalloporphyrine dargestellt. Es war ein statistisch signifikanter Aktivitätsverlust der immobilisierten perfluorierten Metalloporphyrine zu erkennen. Der Verlust betrug bei MnTFPPCl etwa ein Drittel, bei FeTFPPCl etwa zwei Drittel der ursprünglichen Aktivität. Die NO-Freisetzung, die durch die kationischen Metalloporphyrine katalysiert wurde, unterschied sich nicht statistisch signifikant zwischen immobilisiertem und löslichem Metalloporphyrin. Die Ergebnisse, die verhältnismäßige NO-Freisetzung betreffend (Abschnitt 3.5.2, Abbildung 3-6), konnten hier bestätigt werden.

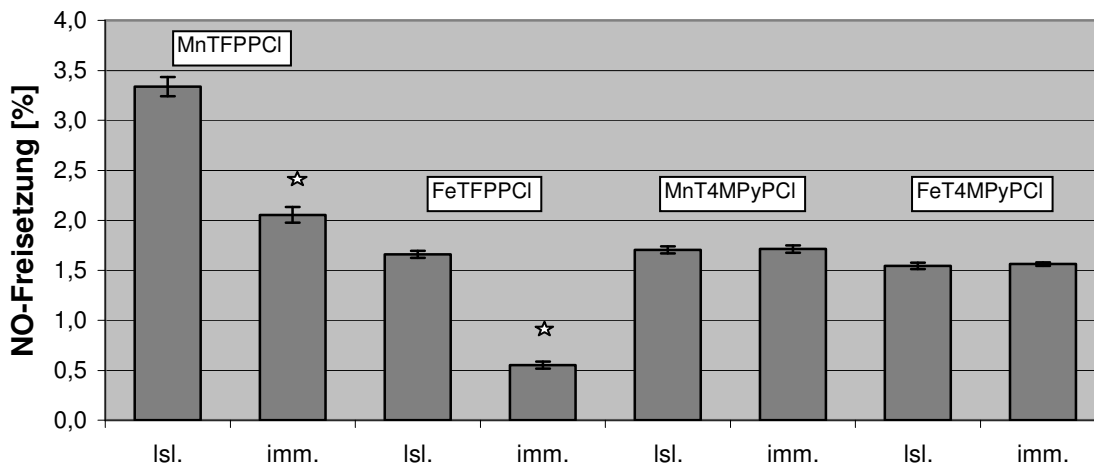


Abbildung 3-7 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim mit Iodosobenzol unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, gelöst (Isl.) und immobilisiert (imm.) (Headspace-Methode)

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der unter Einsatz der Mikrowellentechnologie immobilisierten Metalloporphyrine sind in Abbildung 3-8 dargestellt. Auffallend war, dass es bei der Immobilisierung der perfluorierten Metalloporphyrine keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitäten gab. Die Immobilisierung der kationischen Metalloporphyrine in Methanol bewirkte eine statistisch signifikante Abnahme der Aktivität, wohingegen mit der Immobilisierung ohne Lösungsmittel statistisch nicht verschiedene Werte erreicht wurden.

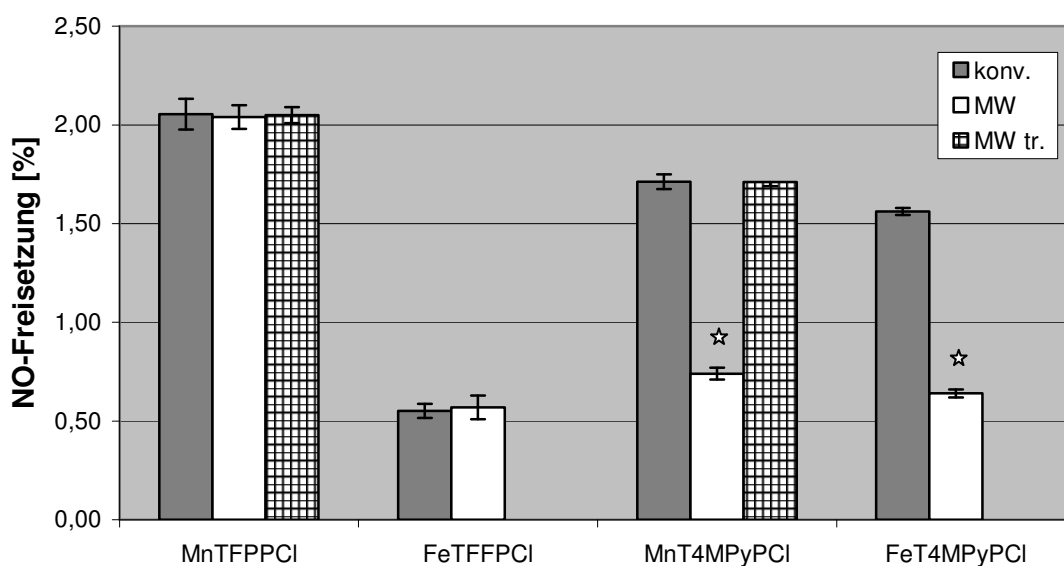


Abbildung 3-8 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim mit Iodosobenzol, katalysiert mit nach verschiedenen Methoden immobilisierten Metalloporphyrinen

### 3.6 Abschließende Betrachtung

Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung der nach verschiedenen Methoden immobilisierten Metalloporphyrine lassen sich Aussagen über die Effektivität der Immobilisierungen machen. Die Immobilisierung nach der konventionellen, in der Literatur beschriebenen Methode bewirkte bei den perfluorierten Metalloporphyrinen im Gegensatz zu den kationischen einen deutlichen Aktivitätsverlust. Dies war für unsere weiteren biomimetischen Reaktionsansätze insofern zu beachten, als dass ein direkter Vergleich mit Literaturwerten von Reaktionen mit löslichen Metalloporphyrinen nicht zulässig war.

Der Einsatz der Mikrowellentechnologie ist ebenfalls kritisch zu betrachten. Zwar konnte die prozentuale Belegung der Metalloporphyrine am Trägermaterial beträchtlich gesteigert werden, die Aktivitätsbestimmung zeigte aber, dass nur die immobilisierten Metalloporphyrine MnTFPPCl und FeTFPPCl ohne Defizite in ihrer Aktivität erhalten wurden. Die beiden kationischen Metalloporphyrine erlitten erhebliche Einbußen, wenn sie in Methanol immobilisiert wurden. MnT4MPyPCL zeigte nach der Immobilisierung ohne Lösungsmittel die gleiche Aktivität wie nach der konventionellen Methode.

Als optimale Methode ließ sich aus diesen Ergebnissen die Immobilisierung ohne Lösungsmittel erkennen. Hier konnte unter gleich bleibender katalytischer Aktivität die Ausbeute gegenüber der konventionellen Methode statistisch signifikant erhöht werden. Des Weiteren zeichnete sich diese Methode durch eine einfachere, sauberere Handhabung aus und ist für diese Arbeit als Standard-Methode eingesetzt worden.

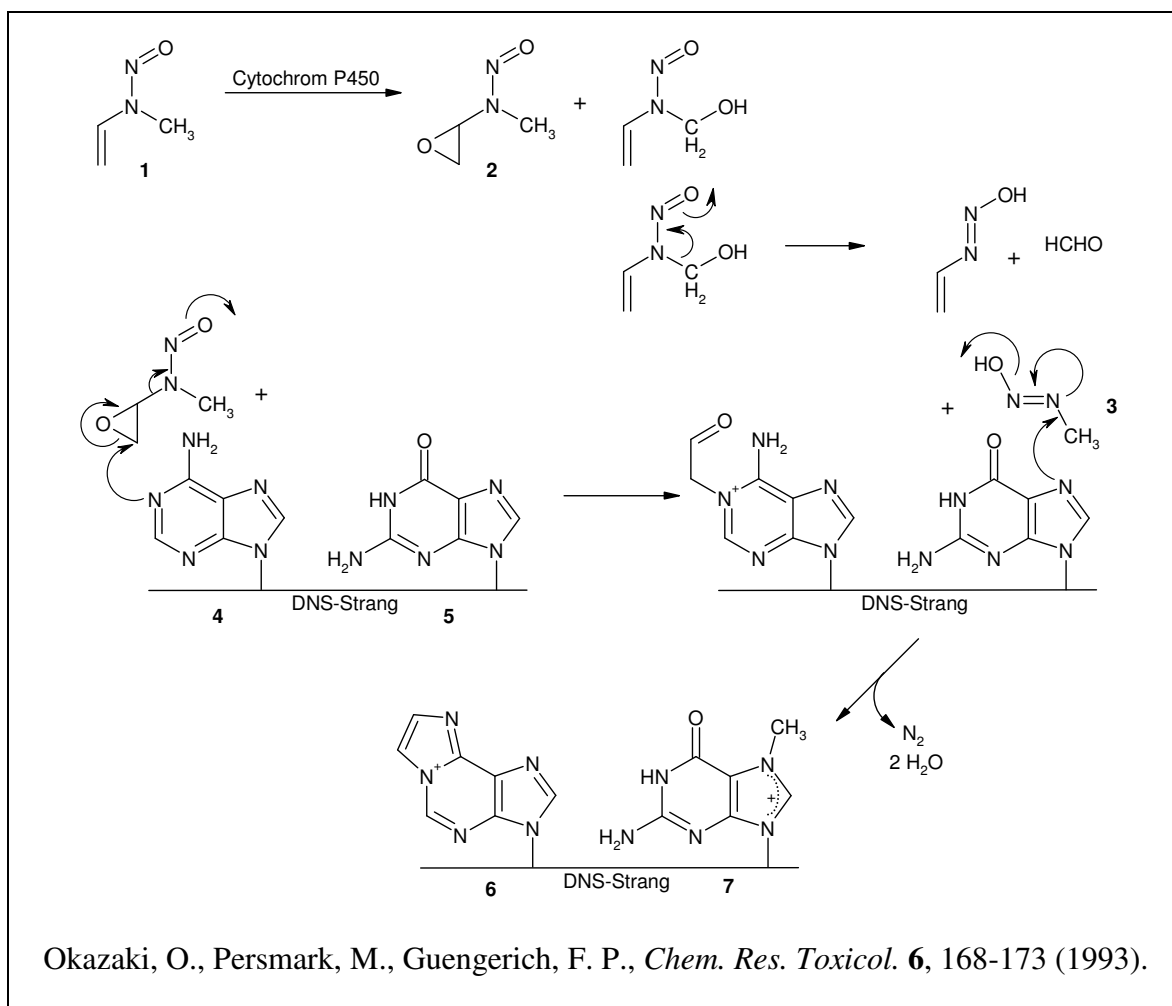


## 4 Modellsysteme für Epoxidierungen

### 4.1 Einleitung und Literaturübersicht

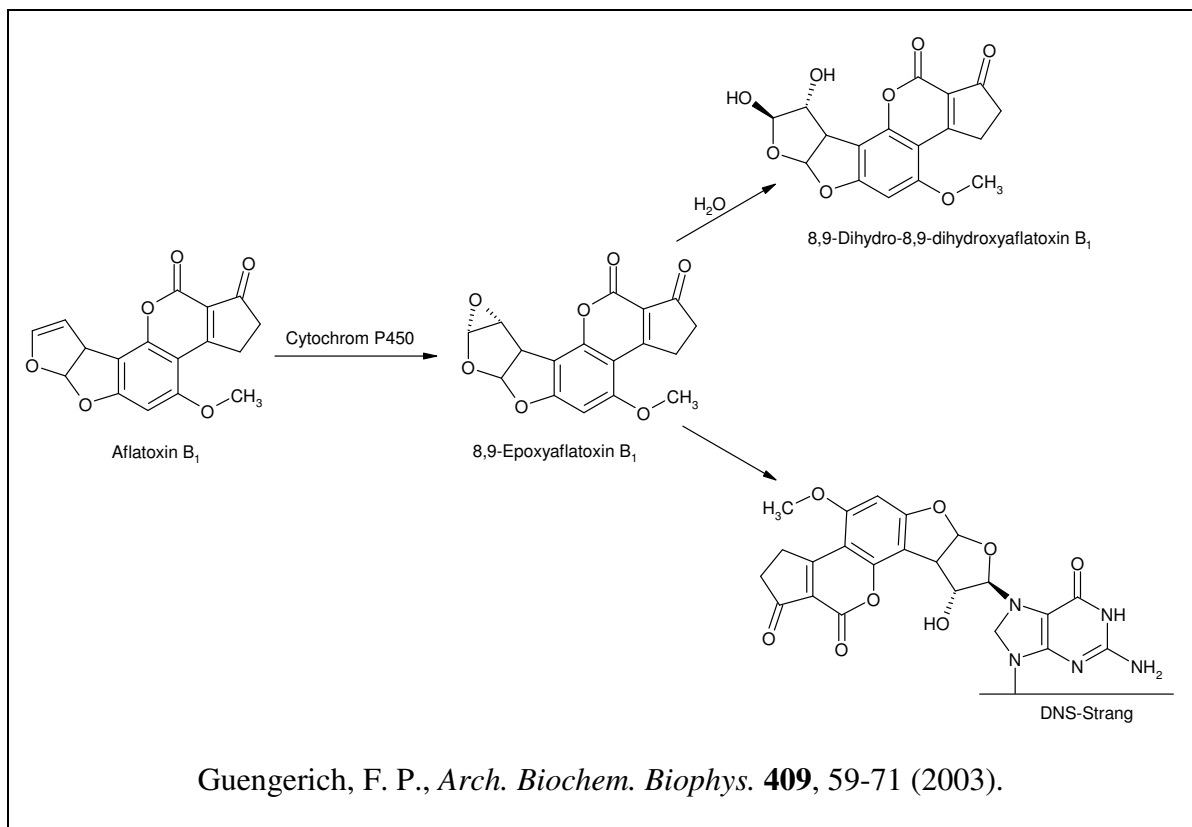
Die Aktivierung von Promutagenen durch die Bildung von Epoxiden bzw. Oxiranen liefert stark elektrophile Intermediate, die zur Reaktion mit den nukleophilen Zentren der DNS und denen von Proteinen fähig sind. Die metabolische Toxifizierung im Organismus durch die Bildung von 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo[a]pyren-9,10-oxid und Benzo[a]pyren-4,5-oxid als Kanzerogene und Mutagene aus Benzo[a]pyren wurde in Abschnitt 1.1 bereits vorgestellt.

*Okazaki und Mitarbeiter*<sup>61</sup> beschrieben die stark mutagene Wirkung von *N*-Nitroso-*N*-methylvinylamin (**1**), welches durch Cytochrom P450 sowohl epoxidiert als auch hydroxyliert wird und die DNS-Basen auf zwei verschiedene Arten modifiziert.



Das entstandene 1-(*N*-Nitrosomethylamino)-oxiran (**2**) reagiert mit Adenin (**4**) zum 1,*N*<sup>6</sup>-Ethenoadenin (**6**), das Methyl Diazohydroxid (**3**) methyliert Guanin (**5**) zu *N*<sup>7</sup>-Methylguanin (**7**).

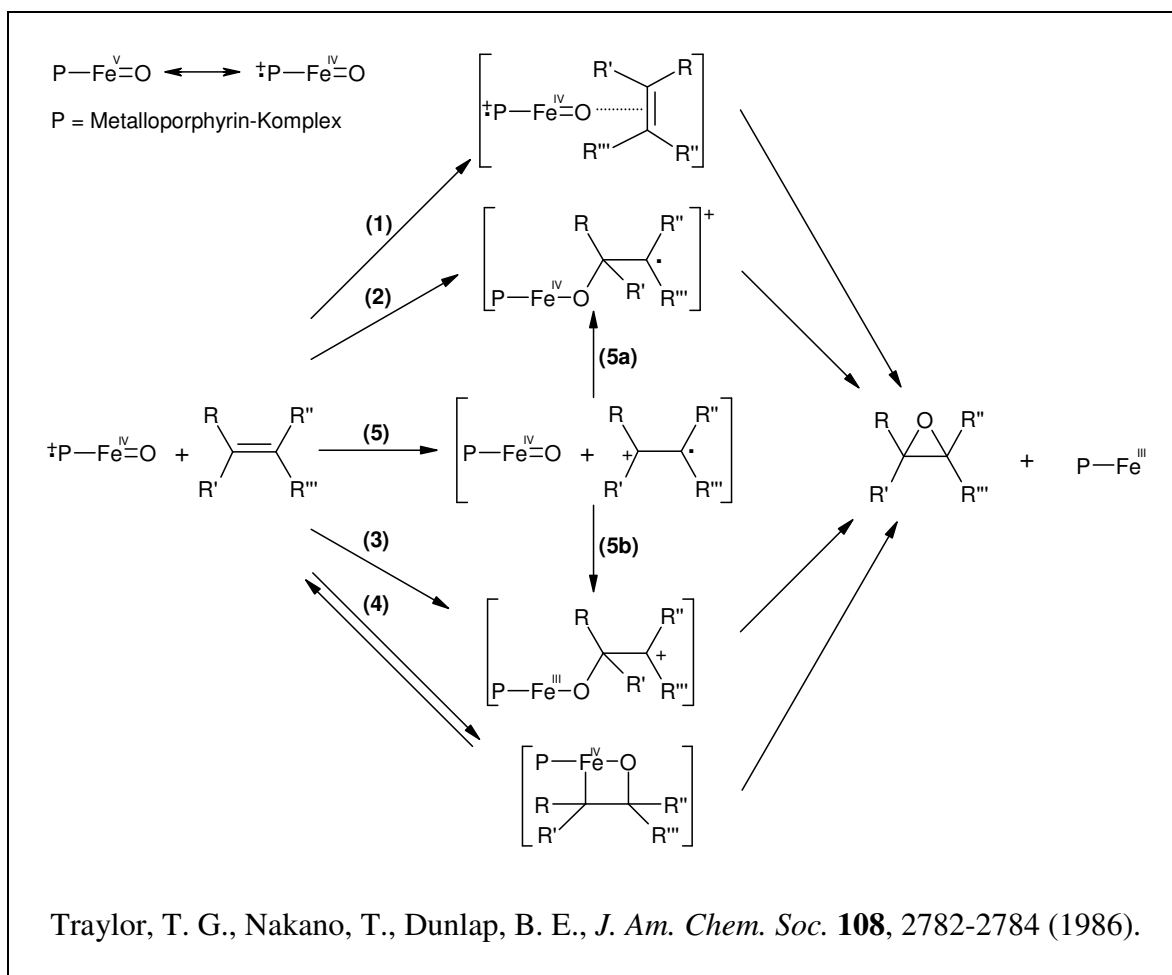
Das stärkste bekannte chemische Prokanzerogen ist Aflatoxin B<sub>1</sub>, welches durch die Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* in beträchtlichen Mengen produziert wird, und u. A. in Erdnüssen, Mais, Reis, Soja, Weizen und Milchprodukten vorkommt. Seine vorwiegend hepatokanzerogene Wirkung beruht ebenfalls auf der Epoxidierung durch Cytochrom P450. Hauptsächlich bildet das 8,9-Epoxyaflatoxin B<sub>1</sub> eine kovalente Bindung zum Guanin aus, ein geringer Teil wird zum Diol hydrolysiert<sup>62</sup>.



Wood und Mitarbeiter<sup>63</sup> fanden als Modell für diesen Metabolismus ein geeignetes System aus dem Metalloporphyrin FeTPPCl und Iodosobenzol in einer Natriumacetatlösung bei pH 6,0. In Anwesenheit der DNS-Base Guanin wurde als Produkt dieser Reaktion das in vivo entstehende Aflatoxin B<sub>1</sub>-Guanin-Addukt gewonnen. Ohne Zusatz der DNS-Base zum Modellsystem konnte allerdings kein 8,9-Epoxyd, sondern das entsprechende

8,9-Dihydro-8,9-dihydroxyafolatoxin B<sub>1</sub> und 8,9-Dihydro-8-methoxy-9-hydroxyafolatoxin B<sub>1</sub> isoliert werden. Dennoch postulierten *Wood und Mitarbeiter* das 8,9-Epoxid als sehr instabile reaktive Zwischenstufe der Guanin-Adduktbildung.

Für Epoxidierungen durch Modellsysteme wurden von *Traylor und Mitarbeitern*<sup>64</sup> verschiedene Mechanismen diskutiert. Denkbar ist eine direkte Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Olefin (**1**), ein radikalischer Angriff (**2**) oder eine elektrophile Addition (**3**), gefolgt von einem schnellen Ringschluss, eine reversible Ausbildung eines electrocyclischen Metallooxetans (**4**) und eine Elektronenübertragung (**5**), gefolgt von einem Zerfall zu einer radikalischen Zwischenstufe (**5a**) oder zu einem Carbokation (**5b**).



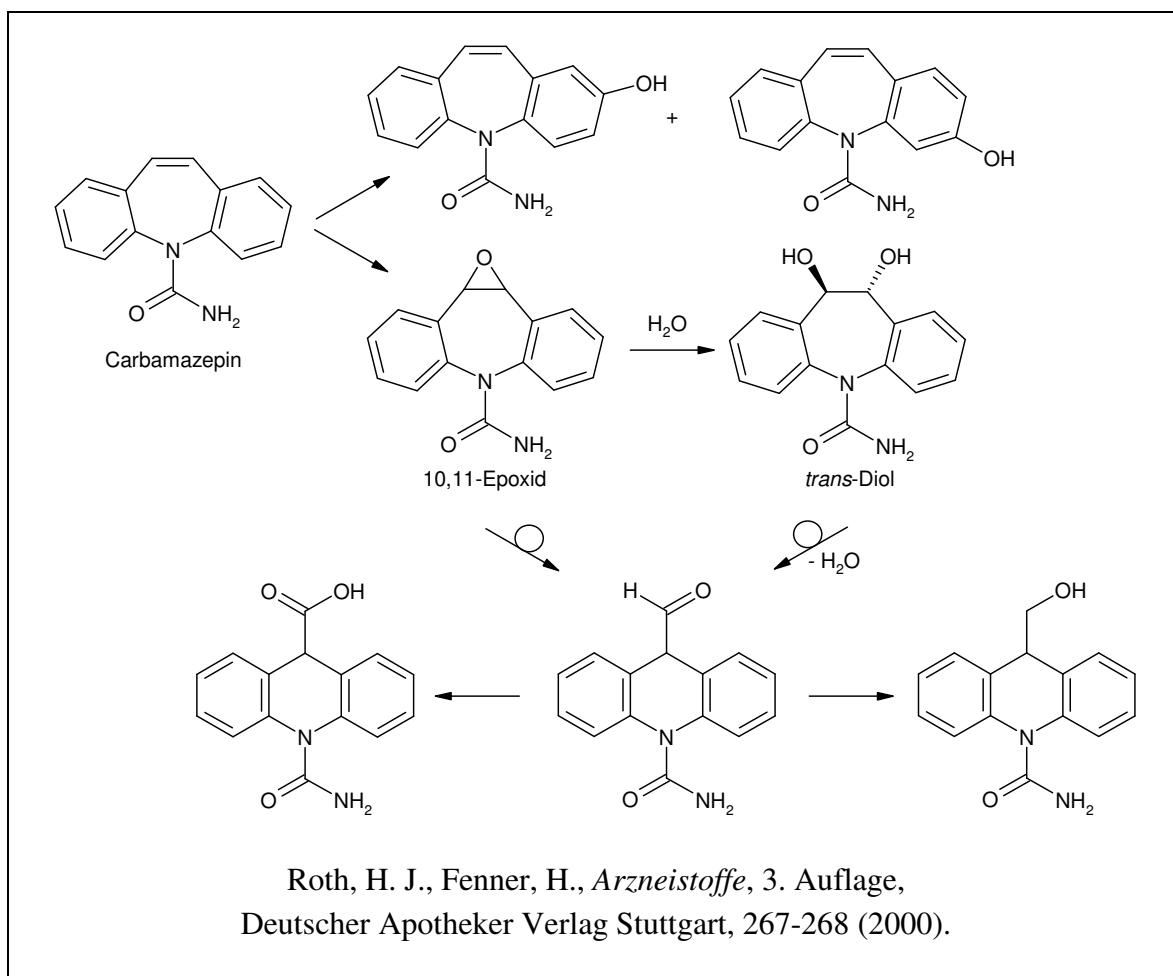
## 4.2 Methodenoptimierung mit Carbamazepin

Für die Optimierung der Methode zur Epoxidierung von Olefinen wurde Carbamazepin als Substrat gewählt, da in der Literatur bereits verschiedene Modellsysteme zur Epoxidierung von Carbamazepin ohne Nebenprodukte beschrieben wurden. Das entstehende Epoxid war stabil und konnte isoliert werden. Diese Reaktion war eine der wenigen Metalloporphyrin-katalysierten Oxygenierungsreaktionen, die in verschiedenen Lösungsmitteln gute Ausbeuten lieferte<sup>65</sup>.

### 4.2.1 Pharmakologische Eigenschaften

Carbamazepin ist ein in seiner Struktur mit den trizyklischen Antidepressiva verwandtes Antiepileptikum. Während der Trizyklus der Dibenzazepine und Dihydrobenzazepine in den antidepressiven Wirkstoffen eine charakteristische Seitenkettenstruktur aufweist, ist bei Carbamazepin eine Harnstoffstruktur inkorporiert. Eine im epileptischen Fokus vorliegende übersteigerte Aktivität synchronisierter Neuronengruppen kann symptomatisch durch Pharmaka behandelt werden, welche die inhibitorischen Einflüsse stärken, die exzitatorischen Einflüsse abschwächen und dadurch die Neigung zur elektrischen Übererregung unterbinden, wobei Carbamazepin aktionsabhängig die potentialgesteuerten Natrium-Kanäle am Neuron blockiert („use dependence“).

Carbamazepin zeigt eine sehr komplexe Biotransformation, die im Falle des Epoxids zu einem aktiven Metaboliten führt, im Übrigen aber als Inaktivierung aufzufassen ist. Hauptmetabolit ist das *trans*-Diol, das durch Hydrolyse des Carbamazepin-10,11-epoxids gebildet wird. Jenes wiederum stellt nicht nur eine postulierte Zwischenstufe dar, sondern ist im Plasma und Urin nachweisbar und somit ungewöhnlich stabil<sup>1</sup>. Untersuchungen zur Mutagenität des Epoxids an Zellkulturen von *Salmonella typhimurium* (Ames-Test) konnten keine Hinweise auf eine mögliche Mutagenität liefern<sup>66</sup>.



#### 4.2.2 Versuchsplanung

Da in der Literatur bereits mehrere Methoden zur Epoxidierung von Carbamazepin mit Modellsystemen beschrieben sind, wurde zu Beginn eine Methode ausgewählt und anschließend optimiert. *Groves und Mitarbeiter*<sup>65</sup> beschrieben die Umsetzung von Carbamazepin mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure in einem wässrigen Milieu. Sie erreichten Ausbeuten an Epoxid von 35 % (m/m). Als Lösungsmittel wurde in dieser Arbeit zumeist ein Phosphatpuffer mit dem pH-Wert 7,4 eingesetzt (AAV 10). Dies sollte zum einen das physiologische Milieu im Organismus imitieren. Zum anderen beeinflusst der pH-Wert auch die Redoxaktivität der Oxenoid-Spezies des Metalloporphyrins. Die zur Bildung der reaktiven Oxenoid-Spezies notwendige heterolytische Spaltung der Peroxid-Bindung (5, Abschnitt 1.1, Schema 1-2) wird bevorzugt in dem pH-Bereich von 4-7,5 erreicht<sup>67</sup>.

### 4.2.3 Analytik

Für die Analytik von Carbamazepin und Carbamazepin-10,11-epoxid wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die beiden Analyten konnten zusammen mit Acetanilid als internem Standard auf einer RP-18 Säule mit einem Elutionsmittelgemisch von Methanol/Wasser (50:50) getrennt (Abbildung 4-1) und bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert werden. Für das Epoxid stand eine Referenzsubstanz (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) zur Verfügung, mit deren Hilfe eine Kalibrierung vorgenommen wurde.

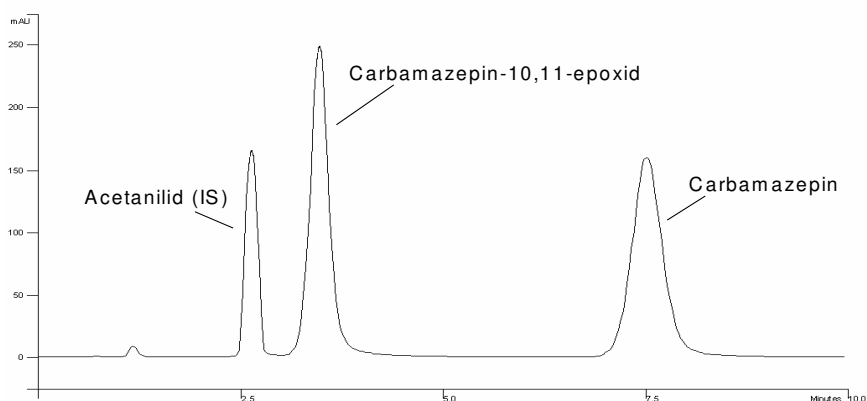


Abbildung 4-1 Chromatographische Trennung von Carbamazepin und Carbamazepin-10,11-Epoxid (Acetanilid als interner Standard)

Des Weiteren wurden die Reaktionsansätze massenspektrometrisch (ESI-MS/MS+) untersucht. Da als Lösungsmittel für die durchgeführten Epoxidierungen ein natriumhaltiger Puffer verwendet wurde, konnten hauptsächlich die entsprechenden Natriumaddukte im Massenspektrum identifiziert werden (Abbildung 4-2).

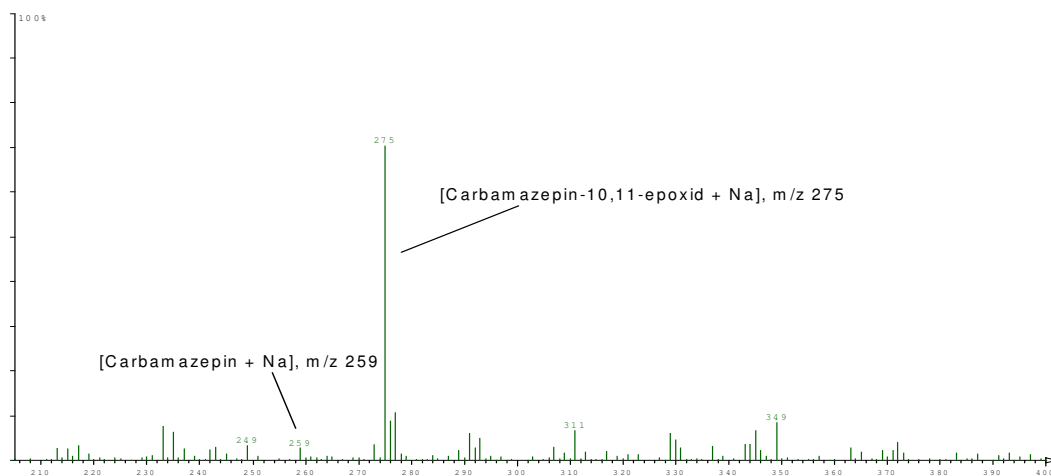


Abbildung 4-2 Massenspektrum des Reaktionsansatzes von Carbamazepin nach AAV 10

#### 4.2.4 Einfluss der Metalloporphyrine und Sauerstoffdonatoren

Zu Beginn der Untersuchungen für das optimale Modellsystem wurden die vier eingesetzten Metalloporphyrine mit verschiedenen Sauerstoffdonatoren kombiniert und nach AAV 10 (siehe Abschnitt 9.3.1) umgesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 dargestellt ( $n = 3$ ). Die höchste Ausbeute von 36,12 % an Carbamazepin-10,11-epoxid konnte mit der in der Literatur<sup>65</sup> beschriebenen Kombination von MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure erhalten werden. Mit Ausnahme der Reaktion mit Wasserstoffperoxid zeigte sich beim Einsatz aller Sauerstoffdonatoren eine ähnliche Abhängigkeit der Umsetzung vom eingesetzten Metalloporphyrin. Die kationischen Metalloporphyrine MnT4MPyPcI und FeT4MPyPcI erzielten die besten Ergebnisse, wobei das manganhaltige Metalloporphyrin eine geringfügig bessere Ausbeute lieferte. Bei den perfluorierten Metalloporphyrinen MnTFPPcI und FeTFPPcI war diese Beobachtung umgekehrt. Mit Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator konnte keine Epoxid-Bildung bei Einsatz der kationischen Metalloporphyrine detektiert werden, da diese vom Sauerstoffdonator oxidativ zerstört wurden (vgl. Abschnitt 2.2.1).

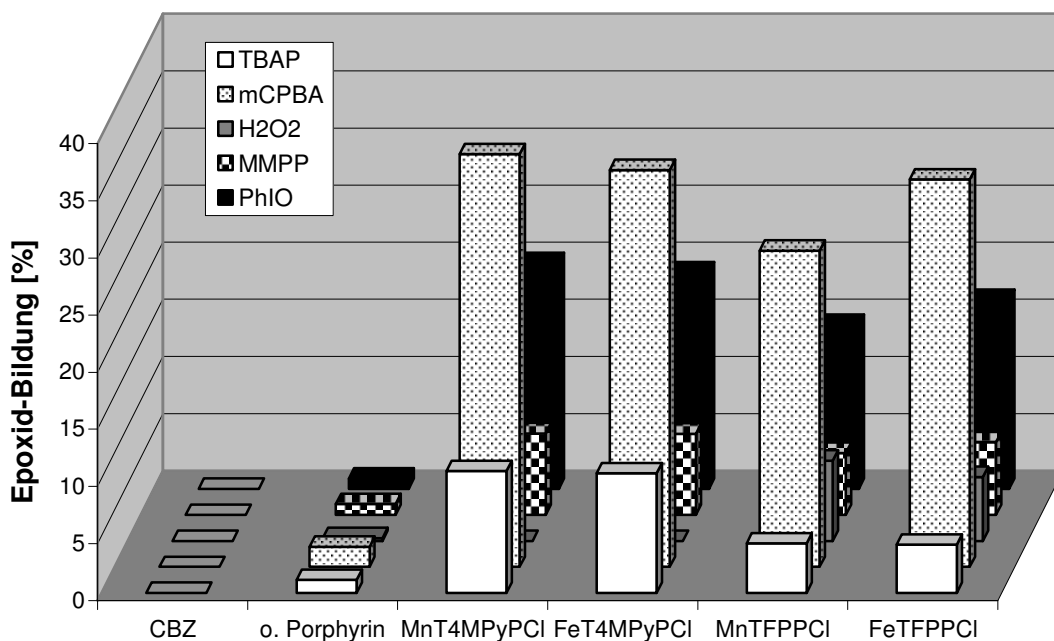


Abbildung 4-3 Übersicht der Epoxid-Bildung aus Carbamazepin (CBZ) mit verschiedenen Kombinationen aus Metalloporphyrin und Sauerstoffdonator

Bei dieser Reaktion wurden bislang keine Nebenprodukte beschrieben. Die Darstellung der detektierten Edukt- und Produktmengen (Abbildung 4-4,  $n = 3$ ) zeigt aber, dass etwa 6-12 % des eingesetzten Carbamazepins nicht mehr erfasst werden konnten. Ein Verlust an Edukt oder Produkt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen konnte ausgeschlossen werden, da in Ansätzen ohne Zusatz von Metalloporphyrin und Sauerstoffdonator 99,99 % Carbamazepin gefunden werden konnten (Tabelle 9-19, Abschnitt 9.3.2). Im Chromatogramm der Reaktionsansätze wurden neben dem Epoxid keine weiteren Substanzen detektiert. Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf ein Nebenprodukt, insbesondere nicht auf das nach Hydrolyse des Epoxids entstehende *cis*-Diol.

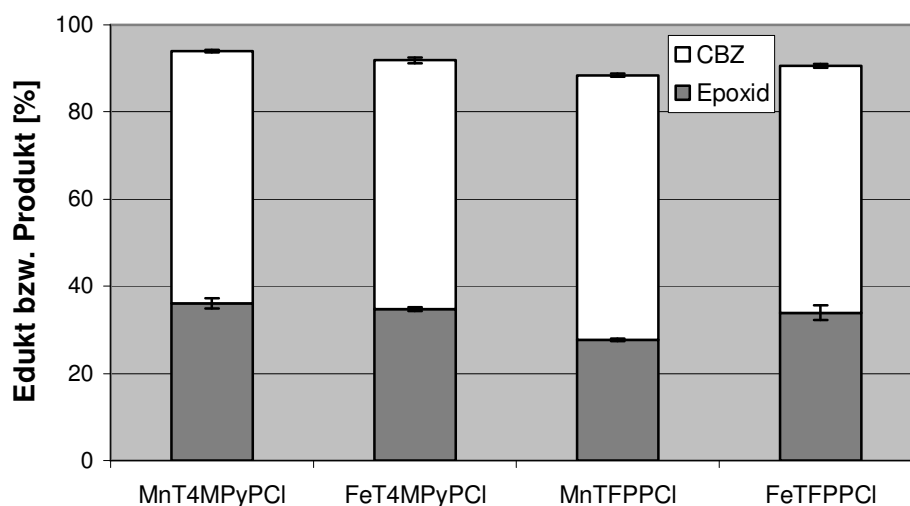


Abbildung 4-4 Darstellung der detektierten Mengen an Edukt (Carbamazepin, CBZ) und Produkt (Carbamazepin-10,11-epoxid, Epoxid) mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure als Sauerstoffdonator nach AAV 10

Um die Diol-Bildung zu forcieren, wurde das Epoxid als Substrat nach AAV 10 mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure und MnT4MPyPcI umgesetzt. Mit einer massenspektrometrischen Analyse konnte aber kein Diol nachgewiesen werden. Nach Zugabe von 10-500  $\mu\text{L}$  0,1 M Ameisensäure oder 0,1 M Natronlauge zum Reaktionsansatz entstand ebenfalls kein Diol, das Epoxid wurde aber vollständig zerstört.



#### 4.2.5 Einfluss des Ansatzverhältnisses

Die Arbeitsvorschriften AAV 10-12 unterscheiden sich im molaren Ansatzverhältnis von Metalloporphyrin zu Substrat zu Sauerstoffdonator. In der Literatur<sup>65</sup> (AAV 10) wurde der Sauerstoffdonator nicht im Überschuss zum Substrat eingesetzt. In vorangegangenen Arbeiten wurde häufig ein Ansatzverhältnis verwendet, bei dem der Sauerstoffdonator im zehnfachen Überschuss zum Substrat eingesetzt wurde<sup>43,56</sup>. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Vorschrift AAV 11 umgesetzt. In Vorschrift AAV 12 ist der Sauerstoffdonator im 50fachen Überschuss zum Substrat eingesetzt worden, was allerdings zu Schwierigkeiten führte. Damit keine vollständige Zerstörung von Edukt und Produkt erfolgte, war es notwendig von dem Sauerstoffdonator eine ethanolische Stammlösung herzustellen. Der für die Reaktion vorgeschriebene Volumenanteil musste äußerst langsam unter Schwenken zum Reaktionsansatz zugegeben werden. In Abbildung 4-5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt ( $n = 3$ ). Durch die Steigerung der zugesetzten Menge des Sauerstoffdonators konnte eine maximale Ausbeute an Carbamazepin-10,11-epoxid von über 80 % erreicht werden. Aus diesen Ergebnissen wurde auch deutlich, dass die Standardabweichung mit zunehmender Menge des Sauerstoffdonators größer wurde.

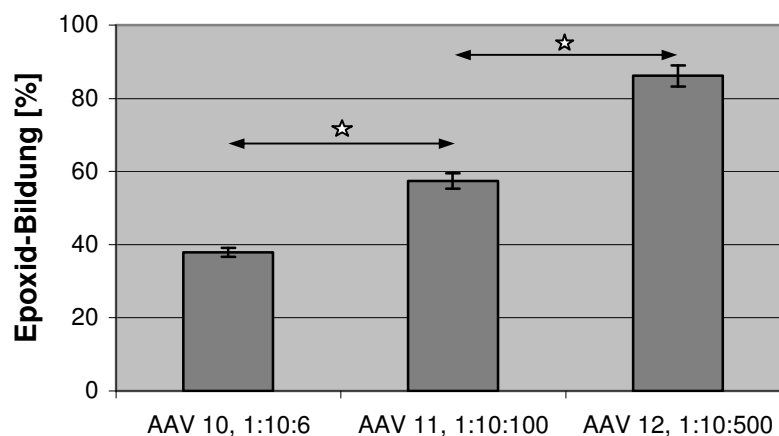


Abbildung 4-5 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Carbamazepin (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure

Bei den hier verwendeten Sauerstoffdonatoren handelt es sich um sehr reaktive Substanzen. Daher war die Reihenfolge der Zugabe der entsprechenden Komponenten des Modellsystems von besonderer Bedeutung. Bei Einsatz höherer Mengen an Sauerstoffdonator (AAV 11 und 12) konnte nach Vorlage von Metalloporphyrin und Sauerstoffdonator bei Zugabe des Lösungsmittels eine heftige Reaktion beobachtet werden, die eine Zerstörung des Metalloporphyrins zur Folge hatte. In Abschnitt 2.2.1 wurde auf diese Zerstörung in Abwesenheit eines Substrates bereits hingewiesen. Bei der Zugabe von Ethanol (200  $\mu\text{L}$ ) zu Metalloporphyrin (2,5  $\mu\text{mol}$ ) und *m*-Chlorperoxybenzoesäure (250  $\mu\text{mol}$ ) war eine ähnlich starke Reaktion zu beobachten. Versetzte man dieses Reaktionsgemisch mit einer geringen Menge (100  $\mu\text{L}$ ) konzentrierter Schwefelsäure, so war nach einigen Minuten ein starker klebstoffartiger Geruch wahrnehmbar. Dies ließ auf die Anwesenheit von Ethylacetat schließen, welches sich aus Ethanol und Essigsäure in Anwesenheit von wasserziehenden Säuren bildet. Einige Tropfen des Reaktionsgemisches ergaben mit Lanthannitrat, Kaliumiodid/Iod-Lösung und Ammoniak einen blauen Niederschlag, der einen positiven Nachweis auf Acetat darstellte. Ethanol wurde also nicht zum Acetaldehyd, sondern direkt zur Essigsäure oxidiert.

#### **4.2.6 Einfluss des Einsatzes der Synthesemikrowelle**

Nachdem der Einsatz der Synthesemikrowelle bei der Immobilisierung der Metalloporphyrine Anwendung fand, wurde auch der Einfluss auf die Oxygenierungsreaktionen mit den biomimetischen Modellsystemen untersucht. Wie bei der Optimierung in Abschnitt 3.4.1 wurden auch bei dieser Reaktion nach AAV 11 zunächst die Reaktionszeit und anschließend die Reaktionstemperatur variiert. In der Summe konnten etwa 91 % Carbamazepin und Carbamazepin-10,11-epoxid detektiert werden (Abbildung 4-6). Nach zwei Minuten war bereits eine ähnliche Ausbeute an Epoxid zu erhalten, wie bei der konventionellen Methode. Nach zehn Minuten trat keine Steigerung der Epoxid-Bildung mehr ein. Im Vergleich zu diesen Werten wurde die Epoxid-Bildung nur unter Zusatz des Sauerstoffdonators und ohne Metalloporphyrin durchgeführt und zeigte etwa eine Verdopplung des gebildeten Epoxids im Vergleich zur entsprechenden

konventionellen Methode ohne Einsatz der Synthesemikrowelle (Abbildung 4-3, Abschnitt 4.2.4).

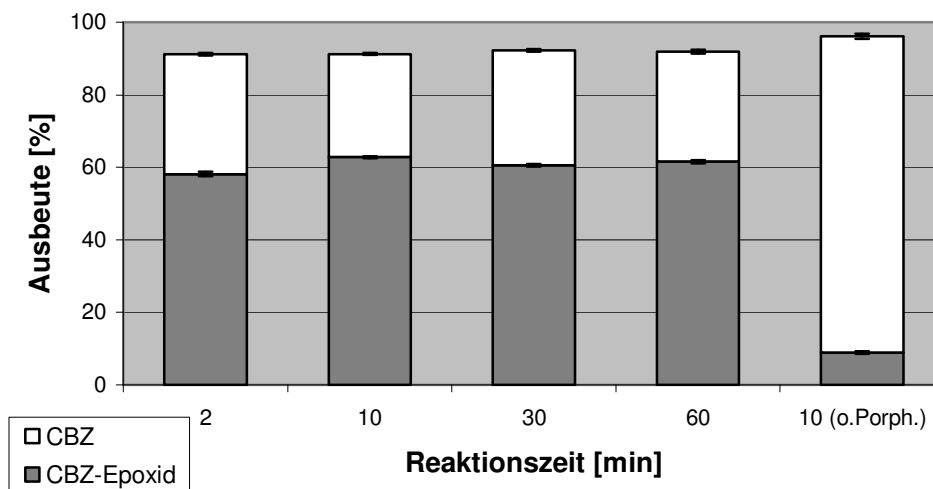


Abbildung 4-6 Detektierte Mengen an Carbamazepin (CBZ) und Carbamazepin-10,11-epoxid (CBZ-Epoxid) nach Reaktion in der Synthesemikrowelle bei 25 °C und verschiedenen Reaktionszeiten nach AAV 11

Die Variation der Reaktionstemperatur zeigte eine deutliche Temperaturempfindlichkeit der Analyten. Mit höheren Temperaturen nahm nicht nur die detektierbare Menge an Epoxid ab, sondern auch die Summe beider Analyten verringerte sich stetig (Abbildung 4-7). Es konnte also mit höheren Temperaturen keine Verbesserung der Ausbeute an Carbamazepin-10,11-epoxid erreicht werden.

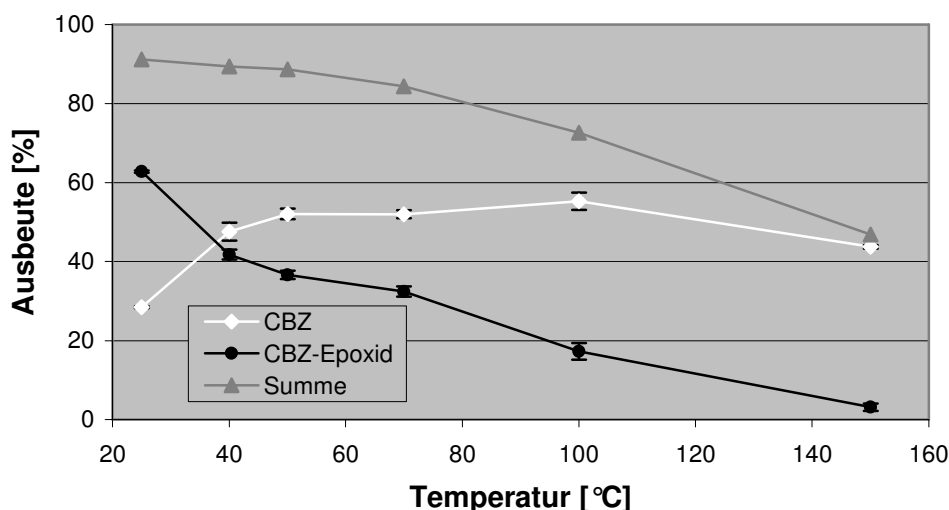


Abbildung 4-7 Detektierte Mengen an Carbamazepin (CBZ) und Carbamazepin-10,11-epoxid (CBZ-Epoxid) und die Summe der jeweiligen Werte nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 min bei 25 °C und verschiedenen Reaktionszeiten nach AAV 11

Als optimale Parameter ergaben sich demnach eine Reaktionszeit von 10 Minuten und eine Reaktionstemperatur von 25 °C bei 25 Watt Leistung. Mit den optimierten Parametern der Synthesemikrowelle wurden anschließend die drei verschiedenen Ansatzverhältnisse untersucht. In der Gegenüberstellung mit den Ergebnissen, die nach der konventionellen Methode erhalten wurden (Abbildung 4-8, bzw. Abbildung 4-5, Abschnitt 4.2.5), ist nur eine geringe Steigerung der Ausbeute an Carbamazepin-10,11-epoxid zu erkennen. Als maximale Ausbeute konnten etwa 93 % erreicht werden. Auffällig ist indessen die geringere Standardabweichung.

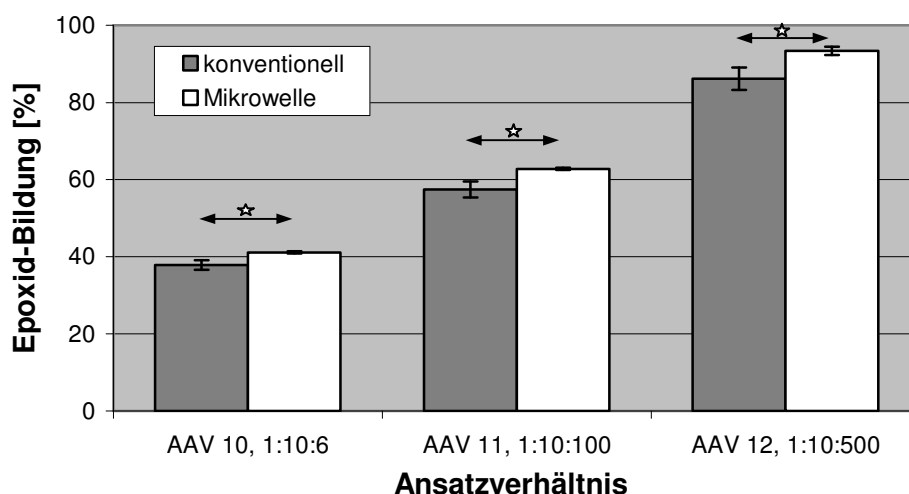


Abbildung 4-8 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Carbamazepin (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure mit und ohne Einsatz der Synthesemikrowelle

#### 4.2.7 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass von der verwendeten Auswahl an Metalloporphyrinen und Sauerstoffdonatoren mit der in Literatur<sup>65</sup> beschriebenen Kombination aus MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure die höchsten Ausbeuten an Carbamazepin-10,11-epoxid erhalten werden konnte. Der unverkennbare Vorteil des kationischen Metalloporphyrins MnT4MPyPcI gegenüber dem perfluorierten MnTFPPcI für die Katalyse von Epoxidierungen in biomimetischen Modellen bestätigte die Vermutung, dass kationische Metalloporphyrine ohne weitere Halogensubstituenten für diese Reaktion

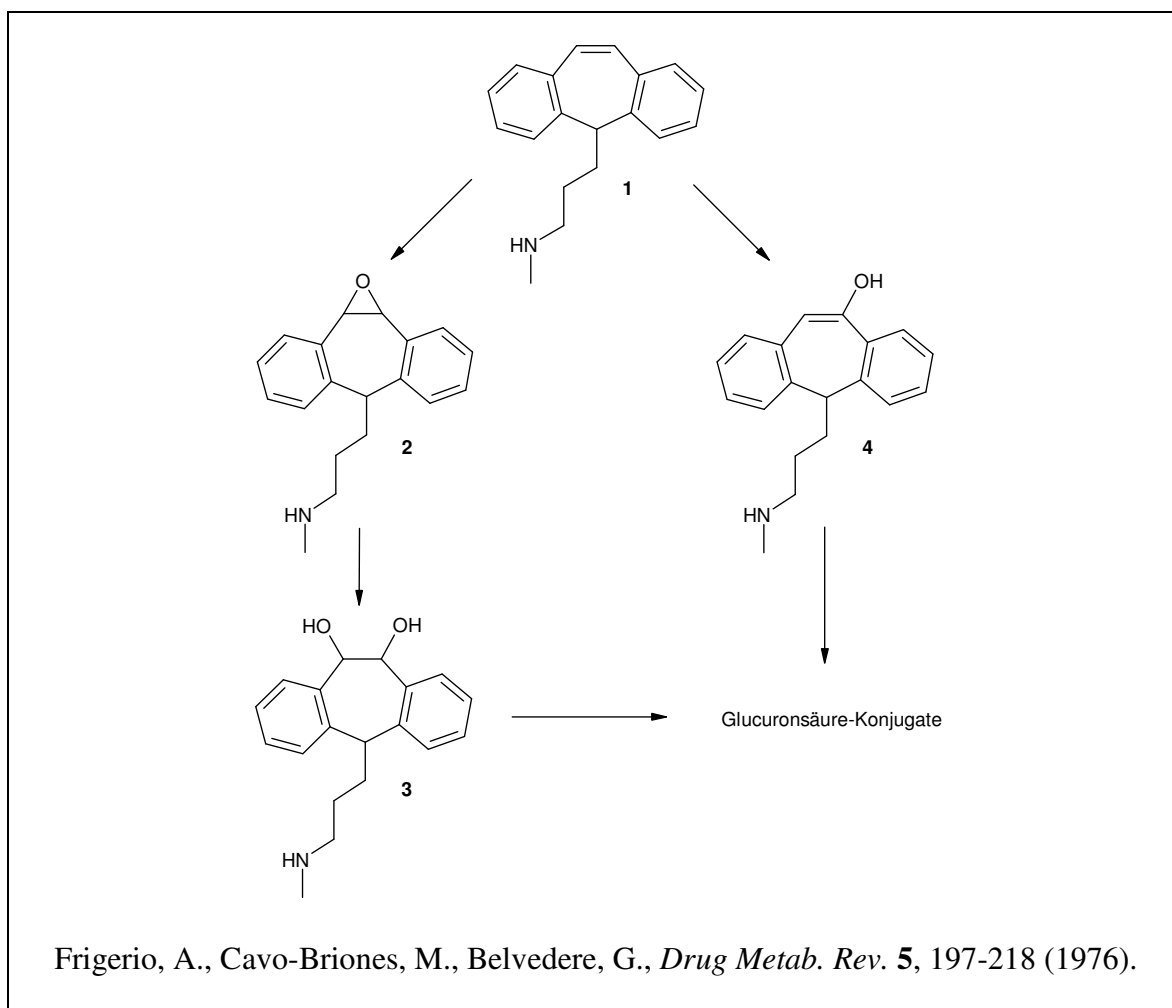
besser geeignet sind (Abschnitt 2.2.1). Den Vorteil der perfluorierten Metalloporphyrine bei biomimetischen Hydroxylierungen galt es noch zu überprüfen. Die Kombination von Wasserstoffperoxid mit den kationischen Metalloporphyrinen hatte eine vollständige Zerstörung des Porphyringerüsts zur Folge. Daher konnte keine Epoxid-Bildung detektiert werden.

Die anteilige Erhöhung der Menge des Sauerstoffdonators im Ansatzverhältnis konnte eine signifikante Steigerung der Bildung des Carbamazepin-10,11-epoxids erbringen (Abschnitt 4.2.5, Abbildung 4-5). Die Reaktion in der Synthesemikrowelle konnte ebenso signifikant höhere Ausbeuten liefern. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der konventionellen Methode zeigte sich in den geringeren Standardabweichungen und dadurch in der besseren Reproduzierbarkeit, die bereits bei der Immobilisierung der Metalloporphyrine beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.4.3). Mit dieser optimierten Methode zur Epoxidierung mit biomimetischen Modellsystemen wurden weitere Substrate umgesetzt.

## **4.3 Protriptylin**

### **4.3.1 Pharmakologische Eigenschaften**

Protriptylin ist ein trizyklisches Antidepressivum und strukturell mit Amitriptylin und Nortriptylin verwandt, die im Gegensatz zu Protriptylin keine Doppelbindungen zwischen C10 und C11 aufweisen. Die Ursache von depressiven Störungen liegt nach heutigem Kenntnisstand in einem relativen Mangel an Monoaminen (Dopamin, Noradrenalin, Serotonin) im zentralen Nervensystem, wodurch eine gesteigerte Empfindlichkeit prä- und postsynaptischer Rezeptoren gegenüber den Neurotransmittern resultiert. Die antidepressive Wirkung des Protriptylins scheint auf der behinderten Wiederaufnahme von vorwiegend Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt zu beruhen. Es wirkt antriebssteigernd, aber erst nach längerer Einnahme stimmungsaufhellend und dämpfend<sup>1, 66</sup>.



*Frigerio und Mitarbeiter*<sup>66</sup> identifizierten in vivo drei Metaboliten des Protriptylins (1): das Protriptylin-10,11-epoxid (2), das daraus entstehende Protriptylin-10,11-dihydrodiol (3) und das 10-Hydroxyprotriptylin (4). In Phase II der Biotransformationsreaktionen werden diese Metabolite mit Glucuronsäure konjugiert.

Das Protriptylin-10,11-epoxid wurde als stabil beschrieben und konnte aus Urin isoliert werden. Untersuchungen an Zellkulturen von *Salmonella typhimurium* (Ames-Test) konnten keine Hinweise auf eine Mutagenität liefern. Die hohe Stabilität dieses Epoxids könnte auf der niedrigen elektrophilen Reaktivität des Moleküls beruhen, welche eine kovalente Bindung an Proteine und andere Makromoleküle im Organismus verhindert, wodurch ein geringeres Risiko für mutagene und karzinogene Veränderungen bestehen sollte.

### 4.3.2 Analytik

Für die Analytik von Protriptylin und Protriptylin-10,11-epoxid wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Beide Analyten konnten mit einer RP-18 Phase und einem Elutionsmittelgemisch von Wasser pH 9,0 (mit  $\text{NH}_3$ )/Acetonitril (99:1) getrennt und bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert werden (Abbildung 4-9).

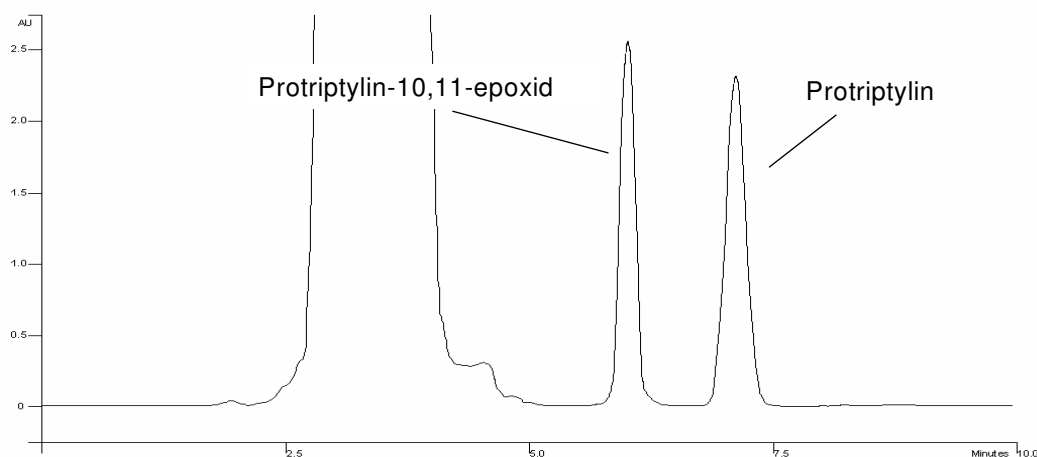


Abbildung 4-9 Chromatographische Trennung von Protriptylin und Protriptylin-10,11-epoxid

Des Weiteren wurden die Reaktionsansätze massenspektrometrisch (ESI-MS/MS+) untersucht. Obwohl als Lösungsmittel für die durchgeführten Epoxidierungen ein natriumhaltiger Puffer verwendet wurde, konnten hier hauptsächlich die entsprechenden Protonenaddukte im Massenspektrum identifiziert werden (Abbildung 4-10).

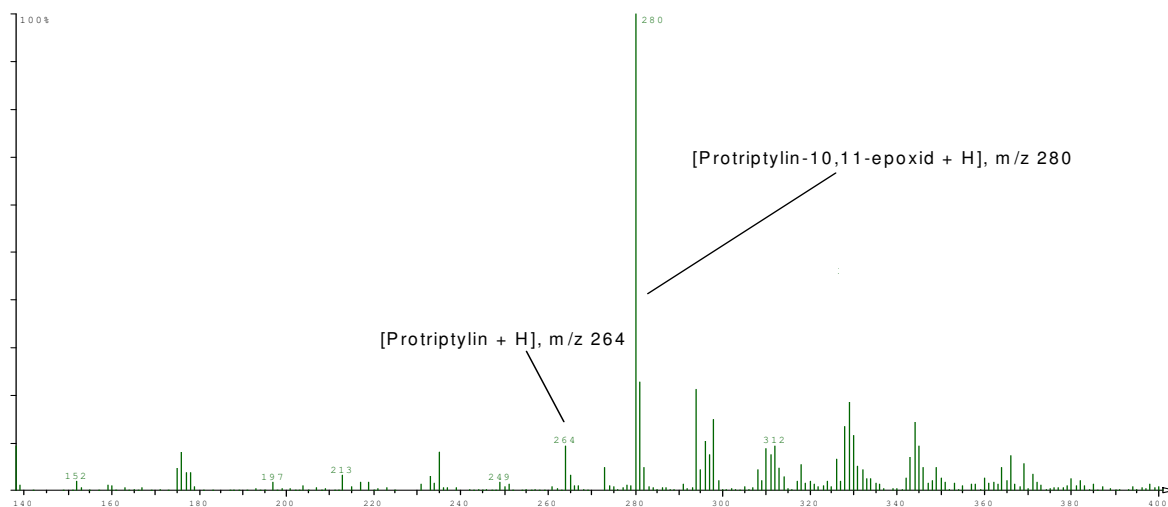


Abbildung 4-10 Massenspektrum des Reaktionsansatzes von Protriptylin nach AAV 10

Zur weiteren Identifizierung wurde die Masse 280 m/z in der Ionenfalle fragmentiert. Das erhaltene Spektrum ist in Abbildung 4-11 dargestellt.

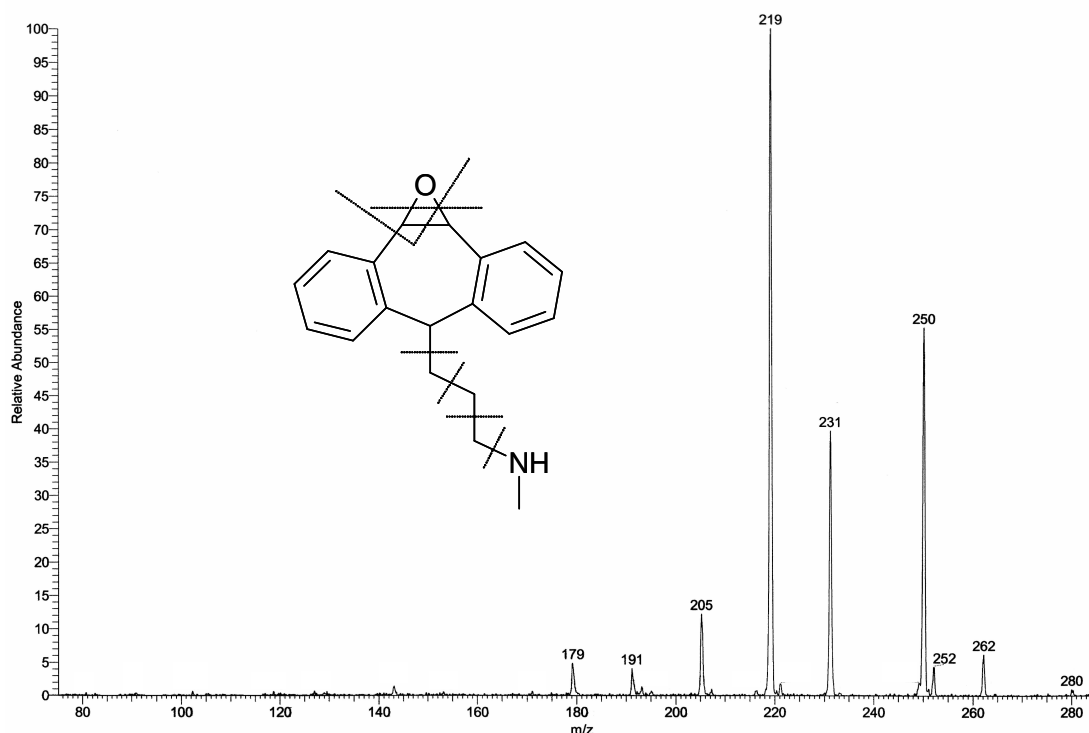
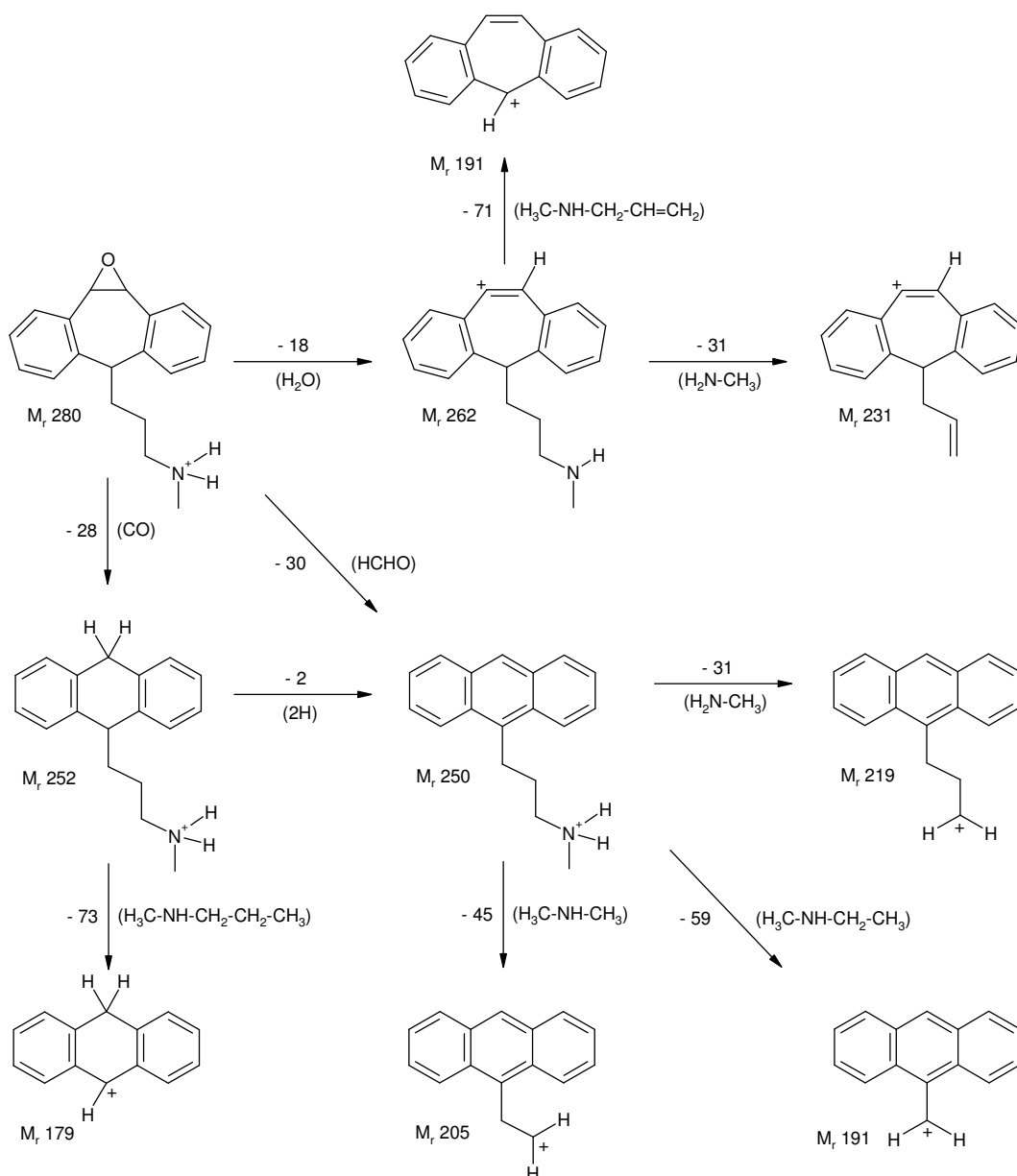


Abbildung 4-11 Fragmentierung des Protriptylin-10,11-epoxids in der Ionenfalle

Für die detektierten Fragmentionen sind in der folgenden Abbildung spekulative Ionenstrukturen zur Rationalisierung des Zerfalls in der Ionenfalle dargestellt (Schema 4-1). Die formale Abspaltung von Wasser und Kohlenstoffmonoxid bzw. Formaldehyd lassen Fragmente mit einem Anthracen-Grundkörper entstehen, dessen Seitenkette stufenweise durch den Verlust von unterschiedlichen Aminstrukturen verkürzt wird.





Schema 4-1 Spekulative Ionenstrukturen des Zerfalls von Protriptylin-10,11-epoxid

### 4.3.3 Umsetzung von Protriptylin

Das am Substrat Carbamazepin entwickelte Modellsystem wurde bei der Umsetzung von Protriptylin angewendet. Durch die massenspektrometrischen Untersuchungen konnte als einziges Produkt Protriptylin-10,11-epoxid identifiziert werden. Die Änderung des Ansatzverhältnisses bei dem Substrat Protriptylin zeigte im Gegensatz zum Carbamazepin eher einen exponentiellen Anstieg der Epoxid-Ausbeute als einen linearen. Die Größe

der Standardabweichung der einzelnen Messungen nahm ebenfalls stärker zu als beim Carbamazepin. Mit Umsetzung nach AAV 12 konnte eine maximale Ausbeute an Protriptylin-10,11-epoxid von etwa 33 % erreicht werden (Abbildung 4-12). Eine Steigerung der Ausbeute durch Zusatz einer noch höheren Menge an Sauerstoffdonator war nicht möglich, da eine oxidative Zerstörung von Edukt und Produkt eintrat und keine Analyten detektiert werden konnten.

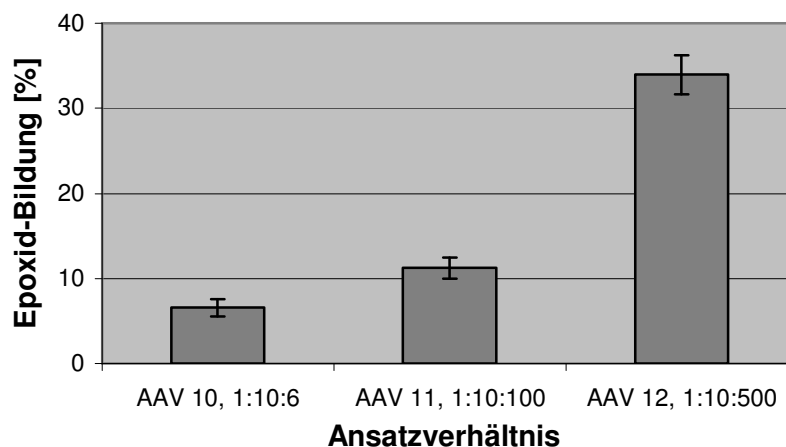


Abbildung 4-12 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Protriptylin (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure

Der Einsatz der Synthesemikrowelle erbrachte deutliche Steigerungen der Ausbeute an Protriptylin-10,11-epoxid bei allen drei Ansatzverhältnissen. Die größte Zunahme von 34 % auf 45 % konnte mit der Versuchsvorschrift AAV 12 erreicht werden. Die Standardabweichungen der unterschiedlichen Ansatzverhältnisse nahmen auch bei den Ansätzen in der Synthesemikrowelle zu, je höher der Anteil an Sauerstoffdonator war, waren aber deutlich geringer als die der Ansätze nach der konventionellen Methode (Abbildung 4-13).

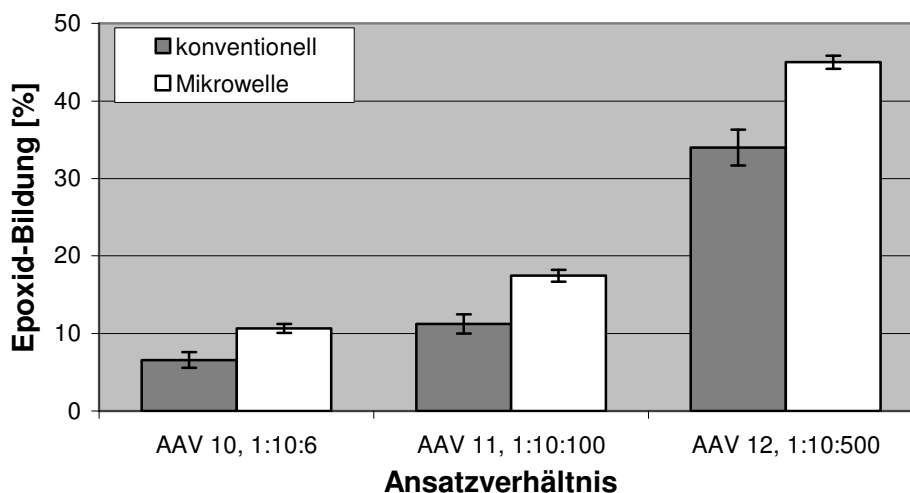


Abbildung 4-13 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Protriptylin (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure mit und ohne Einsatz der Synthesemikrowelle

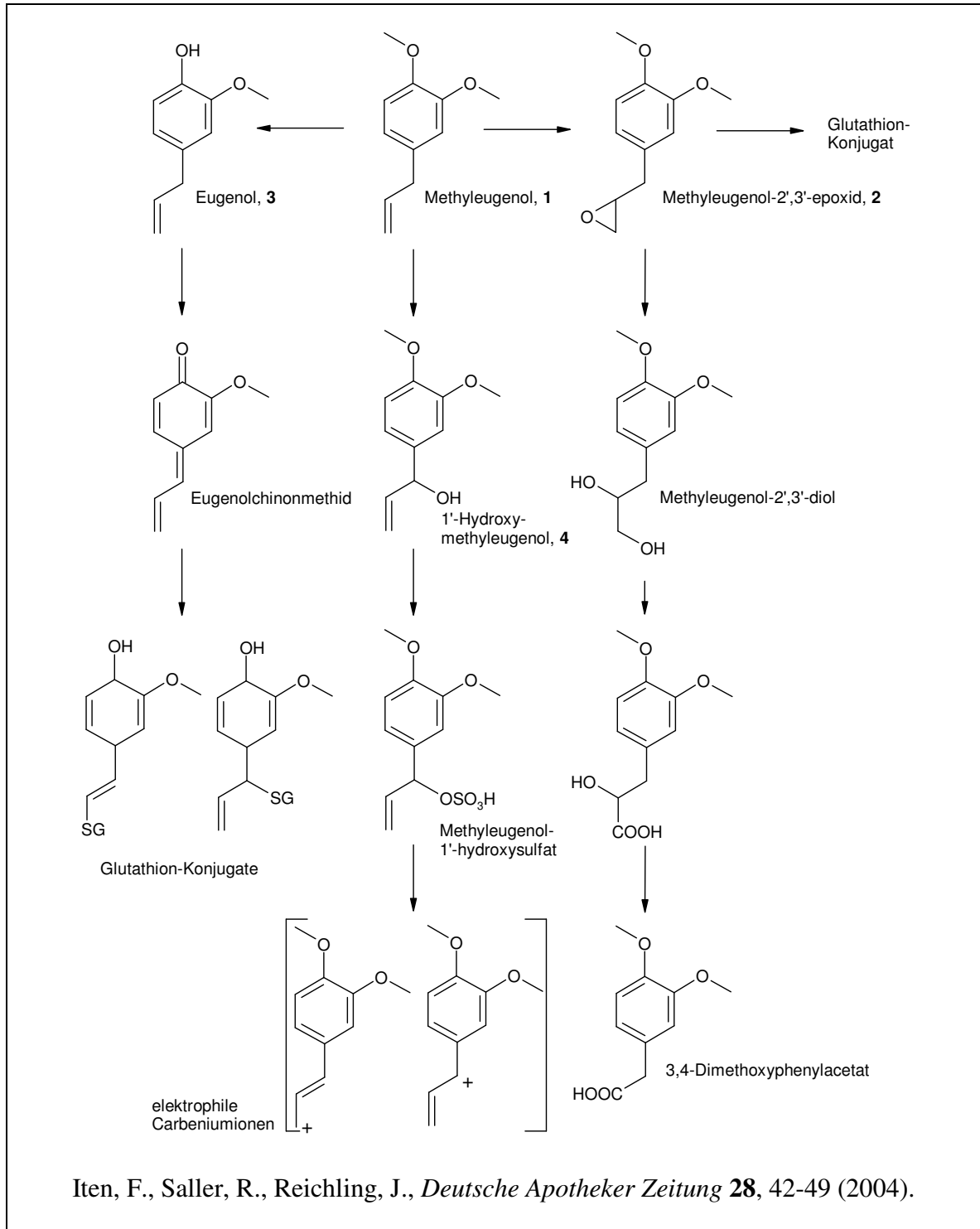
## 4.4 Methyleugenol

### 4.4.1 Pharmakologische Eigenschaften

Methyleugenol ist ein natürlicher Bestandteil des ätherischen Öls vieler Gewürzpflanzen und Obstsorten (Anis, Basilikum, Estragon, Ingwer, Apfel, Orange, Grapefruit). Als isolierte Substanz wurde es vielen Lebensmitteln als Geruchs- und Aromastoff zugesetzt und ist seit 2001 in der EU verboten, da es mit der Veröffentlichung des US-amerikanischen National Toxicology Program 1998 anhand von Versuchen an Ratte und Maus als potentielles genotoxisches Prokanzerogen eingestuft wurde. Methyleugenol wird in der Leber durch das Cytochrom P450-Enzymsystem metabolisiert und renal und biliär ausgeschieden. Die Verabreichung höherer Dosen rief eine gesteigerte Bildung von Lebertumoren hervor, der Ames-Test lieferte keine Hinweise auf eine Mutagenität. Die Kanzerogenität des Methyleugenols beruht hauptsächlich auf genotoxischen Effekten elektrophiler Metaboliten, die mit der DNS von Hepatozyten und Proteinen kovalente Bindungen eingehen. Im Organismus ließen sich drei Hauptabbauwege des Methyleugenols (**1**) identifizieren: Epoxidierung zu **2**, O-Desalkylierung zum Eugenol (**3**) und 1'-Hydroxylierung zu **4**. Nur die 1'-Hydroxylierung führt zur Bildung elektrophiler Carbeniumionen, die mit der DNS interagieren und einen

genotoxischen Effekt erzielen. Obwohl auch die Epoxide in vitro DNS-Addukte bilden, ließen sich in vivo möglicherweise infolge ihrer schnellen Detoxifikation durch Epoxidhydrolasen und Glutathiontransferasen keine DNS-Addukte nachweisen<sup>68</sup>.

Für eine ähnliche Wirkung im menschlichen Organismus wurden bisher keine Hinweise gefunden.



#### 4.4.2 Analytik

Für die Analytik von Methyleugenol und dem Methyleugenolepoxid\* wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die beiden Analyten wurden auf einer RP-18 Säule mit einem Elutionsmittelgemisch von Methanol/Wasser (60:40) getrennt und konnten bei einer Wellenlänge von 230 nm detektiert werden (Abbildung 4-14).

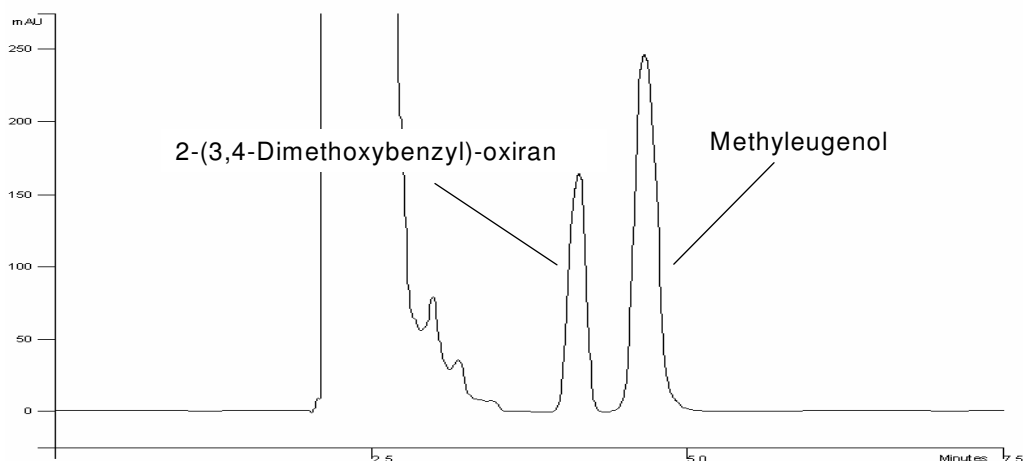


Abbildung 4-14 Chromatographische Trennung von Methyleugenol und dem entstandenen Epoxid

Des Weiteren wurden die Reaktionsansätze massenspektrometrisch (ESI-MS/MS+) untersucht. Da als Lösungsmittel für die durchgeführten Epoxidierungen ein natriumhaltiger Puffer verwendet wurde, konnten hier hauptsächlich die entsprechenden Natriumaddukte im Massenspektrum identifiziert werden (Abbildung 4-15). In diesem Spektrum fielen einige weitere Massen auf, die sich nicht anhand der durchgeführten Reaktion erklären ließen und nicht zum Grundrauschen gehörten. Eine oxidative Zerstörung von Edukt und Produkt ist nicht auszuschließen.

---

\* Nach IUPAC ist die korrekte Bezeichnung 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran

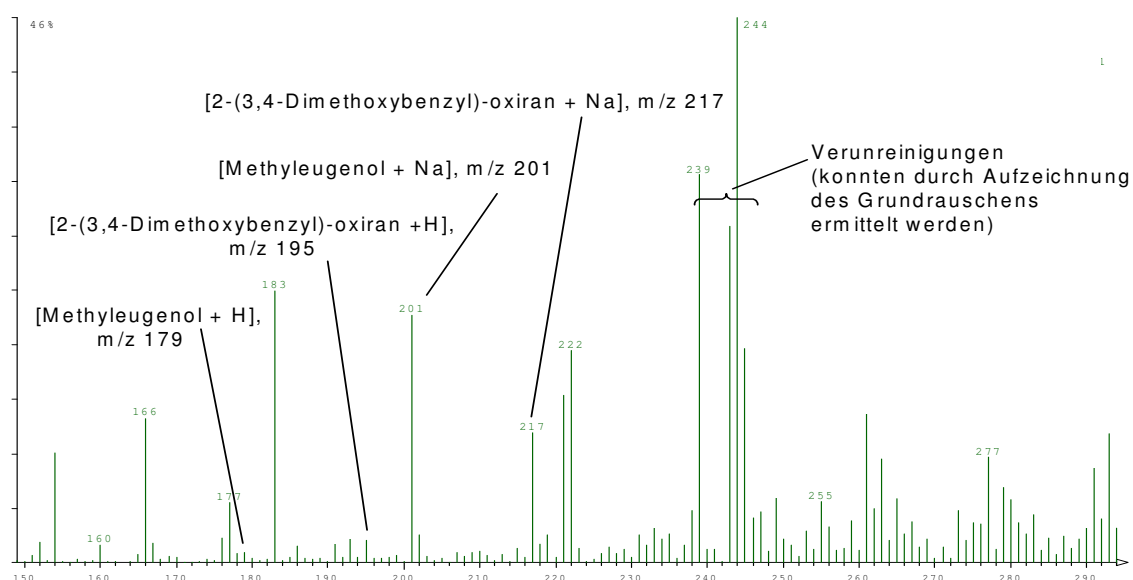


Abbildung 4-15 Massenspektrum des Reaktionsansatzes von Methyleugenol nach AAV 10

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde das Protonenaddukt des 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxirans in der Ionenfalle fragmentiert (siehe Abbildung 4-16).

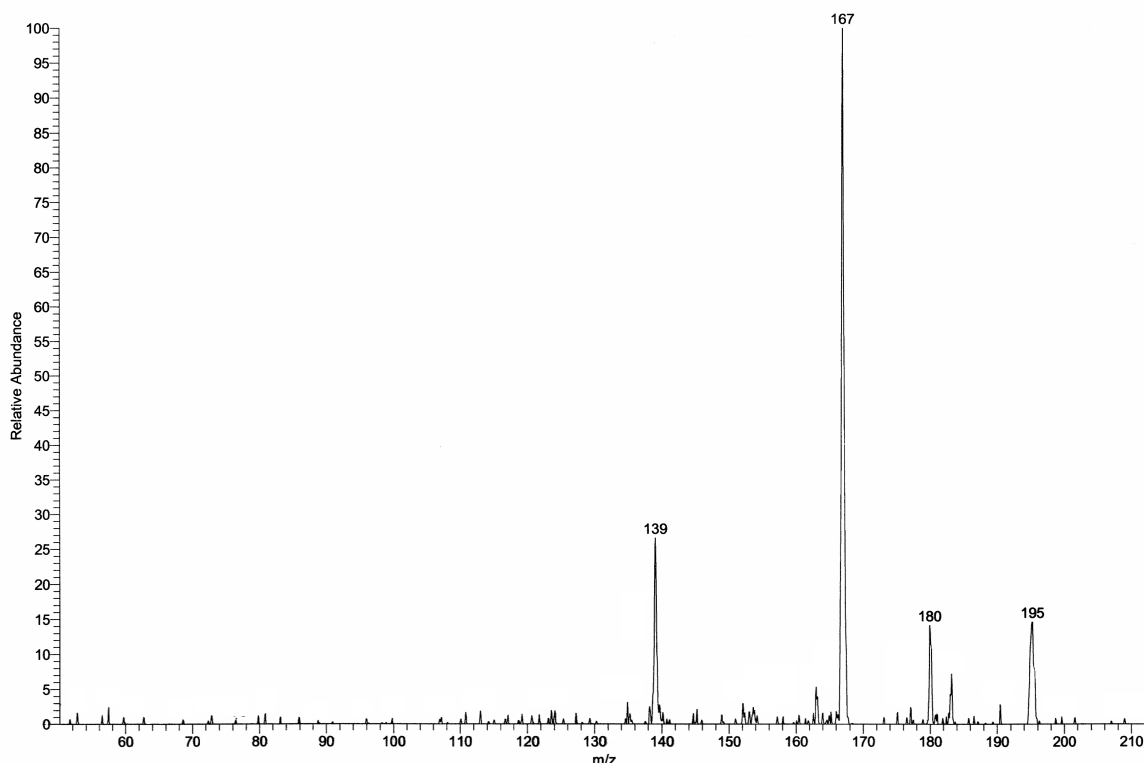


Abbildung 4-16 Spektrum der Fragmentationen von 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran

Im Gegensatz zu den Fragmentationen, die bei der Fragmentierung des Protriptylins erhalten wurden, sind die hier entstandenen Signale keinen

schlüssigen Ionenstrukturen zuzuordnen. Dieses Phänomen wurde bei der Verwendung der Ionenfalle häufig beobachtet, da es bei der Fragmentierung zu strukturell schwerwiegenden Umlagerungen kommt. Das in Abbildung 4-16 gezeigte Spektrum ließ sich aber mit Hilfe des Spektrums des Methyleugenols erklären. Methyleugenol zeigte neben der Masse  $m/z$  179 (Precursor) die Fragmentationen mit den Massen  $m/z$  164 und  $m/z$  151. Diese Ionen sind nach dem Verlust einer Methylgruppe (- 15) und Kohlenstoffmonoxid (- 28) entstanden. Die Signale im Spektrum des 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxirans sind jeweils um 16 Massen größer. Es tritt ein zusätzliches Signal mit der Masse  $m/z$  139 auf, welches durch eine erneute Abspaltung von Kohlenstoffmonoxid entstanden war ( $m/z$  167 zu  $m/z$  139), wodurch ein weiteres Sauerstoffatom im Molekül bewiesen wurde.

#### 4.4.3 Umsetzung von Methyleugenol

Methyleugenol wurde entsprechend den Substraten Carbamazepin und Protriptylin umgesetzt. Es konnte massenspektrometrisch als einziges Produkt 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran identifiziert werden. Der Einfluss der verschiedenen Ansatzverhältnisse zeigte einen linearen Zusammenhang mit einer maximalen Ausbeute an 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran von 66 % (Abbildung 4-17).

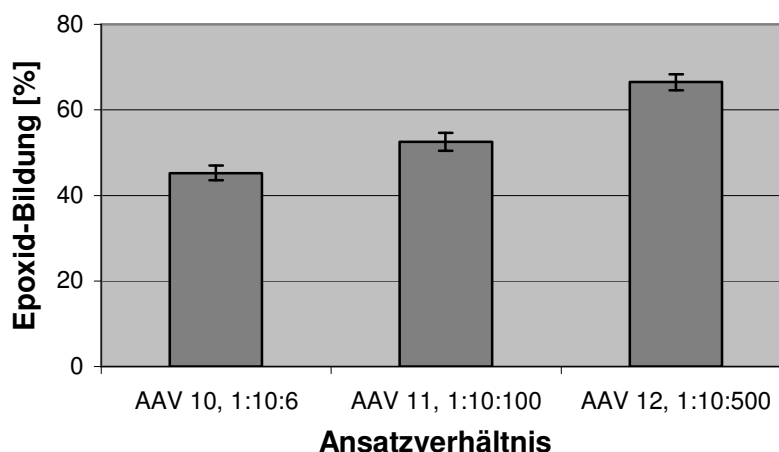


Abbildung 4-17 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Methyleugenol (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure

Der Einsatz der Synthesemikrowelle erbrachte nur eine geringe Steigerung der Ausbeute am entstandenen Epoxid bei allen drei Ansatzverhältnissen, wobei die größte Steigerung mit der Versuchsvorschrift AAV 12 erreicht werden konnte. Die Standardabweichungen der unterschiedlichen Ansatzverhältnisse nahmen wiederum bei den Ansätzen nach der konventionellen Methode zu, je höher der Anteil an Sauerstoffdonator war, sind aber durch Einsatz der Synthesemikrowelle deutlich geringer (Abbildung 4-18). Es konnte eine maximale Ausbeute an 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran von 70 % erreicht werden.

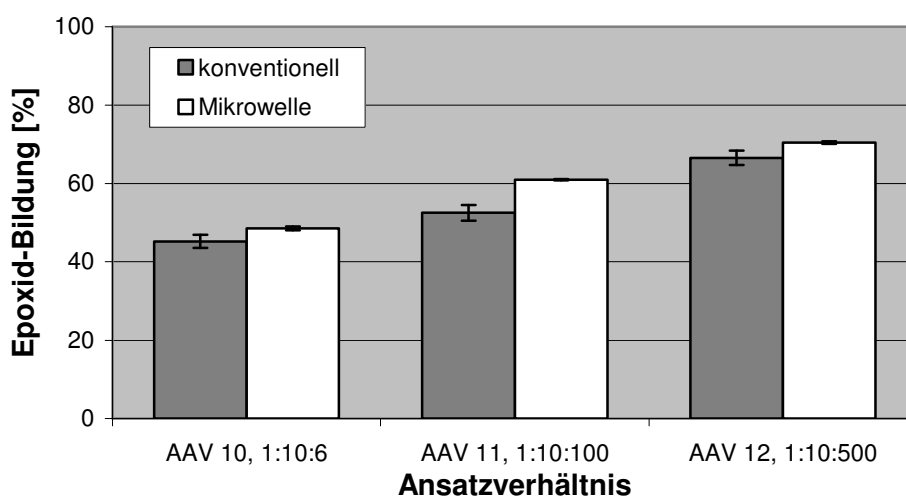


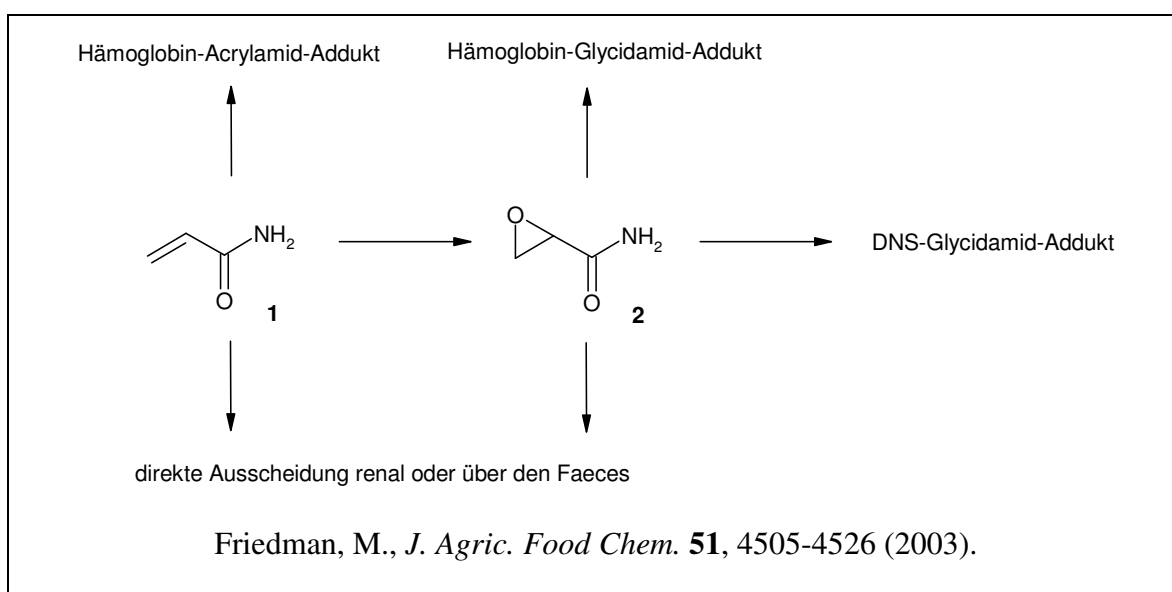
Abbildung 4-18 Einfluss des Ansatzverhältnisses auf die Epoxid-Bildung aus Methyleugenol (Metalloporphyrin : Substrat : Sauerstoffdonator) mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure mit und ohne Einsatz der Synthesemikrowelle



## 4.5 Acrylamid

### 4.5.1 Pharmakologische Eigenschaften

Obwohl Acrylamid bereits seit 1949 zur Herstellung des Polymers Polyacrylamid eingesetzt wird (Verwendung als Verpackungsmaterial, in Farben, Pigmenten und Kosmetika, als Bindemittel in Pappe und Papier und als Flockungsmittel in der Trink- und Abwasserbehandlung), wurde erst 2002 durch die Schwedische Lebensmittelbehörde auf möglicherweise massive gesundheitliche Risiken hingewiesen. Nach heutiger Kenntnis entsteht Acrylamid in Lebensmitteln durch die Maillard-Reaktion aus Stärkeabbauprodukten mit Aminosäuren (vorwiegend Asparagin) bei Temperaturen zwischen 120 und 200 °C. Die höchste Menge an Acrylamid, der ein Mensch durch einmalige Aufnahme von Nahrungs- und Genussmitteln ausgesetzt ist, wurde im gefilterten Hauptstrom einer Zigarette nachgewiesen. In Tierversuchen wurde die kanzerogene Wirkung bereits nachgewiesen. Acrylamid (**1**) muss nicht metabolisiert werden, um mit der DNS oder Proteinen Addukte zu bilden. Durch die Bildung des Hauptmetaboliten Glycidamid (**2**) wird die Adduktbildung stark beschleunigt. Des Weiteren bewirkt die wiederholte Exposition stark neurotoxische Effekte bis zum Verlust von Nervenbahnen und Ganglien<sup>69-71</sup>.



### 4.5.2 Analytik

Für die Analytik von Acrylamid und dem entsprechenden Epoxid Glycidamid wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Die beiden Analyten konnten auf einer RP-18 Säule mit einem Elutionsmittelgemisch von Wasser/Methanol (99:1) getrennt und mit einer Wellenlänge von 220 nm detektiert werden (Abbildung 4-19). Für das Epoxid Glycidamid stand eine Referenzsubstanz (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Ontario, Kanada) zur Verfügung.

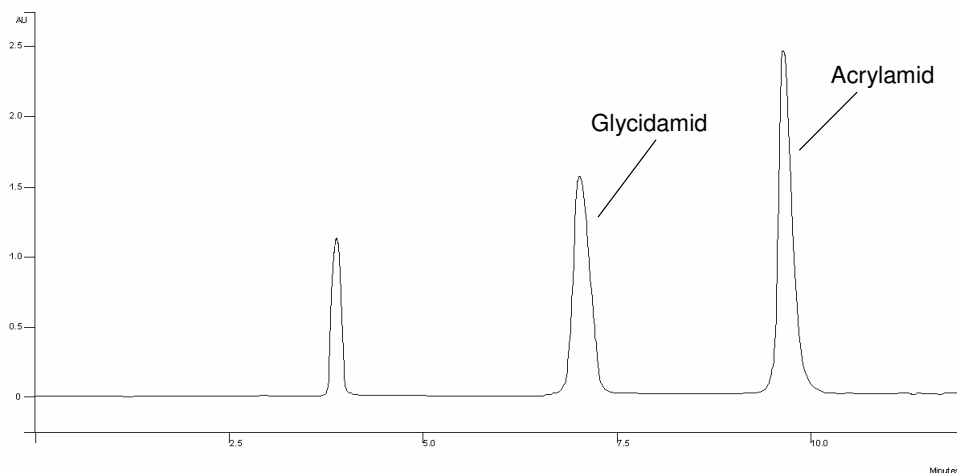


Abbildung 4-19 Chromatographische Trennung von Acrylamid und Glycidamid

### 4.5.3 Umsetzung von Acrylamid

Die Umsetzung von Acrylamid zu Glycidamid gelang weder nach der konventionellen Methode noch unter Einsatz der Synthesemikrowelle mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure nach den beschriebenen Vorschriften (AAV 10-12, Abschnitt 10.3.1).

## 4.6 Fosfomycin

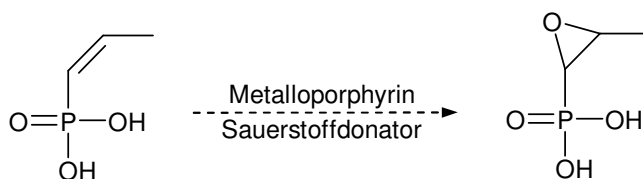
Im Gegensatz zu den bisherigen Arzneistoffen, handelt es sich bei Fosfomycin bereits um ein Epoxid. In diesem Abschnitt sollte durch den Einsatz der biomimetischen Modellsysteme die letzte Stufe der Fosfomycin-Synthese, die Epoxid-Bildung aus *cis*-1-Propenylphosphonsäure durchgeführt werden.

### 4.6.1 Pharmakologische Eigenschaften

Fosfomycin wurde 1969 aus der Fermentationsbrühe von *Streptomyces fradiae* isoliert. Es soll mit dem Einbau von Phosphoenolpyruvat in die *N*-Acetylmuraminsäure interferieren, die zum Aufbau der bakteriellen Zellwand benötigt wird. Somit wirkt Fosfomycin auf grampositive und gramnegative Keime während der Proliferation bakterizid und auf ruhende Keime bakteriostatisch, da es deren Proliferation unterdrückt<sup>1</sup>.

### 4.6.2 Synthese von *cis*-1-Propenylphosphonsäure

Als Substrat für die gewünschte Reaktion wurde *cis*-1-Propenylphosphonsäure in Anlehnung an eine von *Hirao und Mitarbeitern*<sup>72</sup> beschriebene Vorschrift aus *cis*-1-Brom-1-propen und Diethylphosphit synthetisiert. Diese Reaktion wurde durch Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) katalysiert. Als Base zugesetztes Triethylamin fiel als Triethylaminhydrobromid aus. Der entstandene *cis*-1-Propenylphosphonsäurediethylester wurde im Anschluss ohne eine Aufreinigung direkt mit TMSBr einer Umesterung unterzogen und der resultierende Trimethylsilylester durch Wasserzugabe gespalten. Durch die Zugabe von TMSBr im achtfachen Überschuss fiel der gelöste Palladiumkatalysator zu einem großen Teil aus und konnte abfiltriert werden.



Schema 4-2 Gewünschte Epoxidierung von *cis*-1-Propenylphosphonsäure

In Abbildung 4-20 wurde das Massenspektrum des Substrats abgebildet.

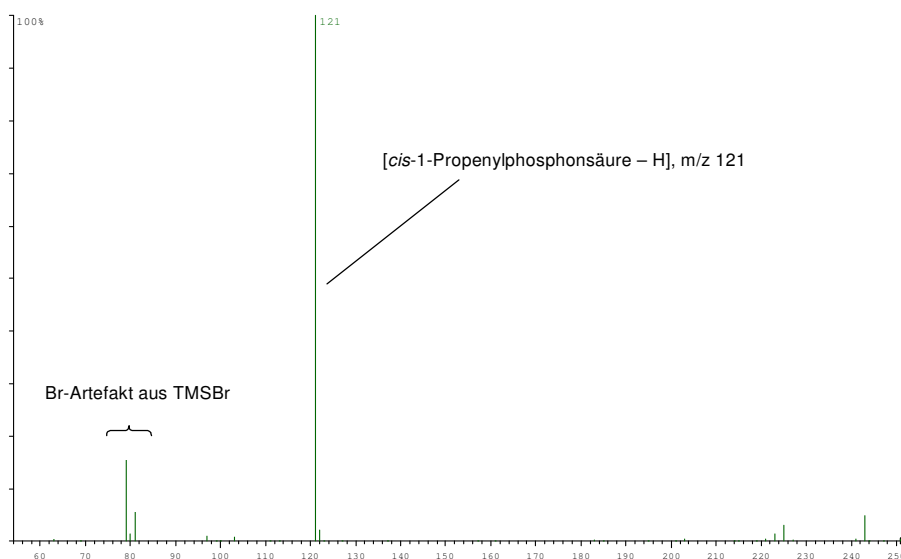


Abbildung 4-20 Massenspektrum der *cis*-1-Propenylphosphonsäure

### 4.6.3 Analytik

Da sowohl *cis*-1-Propenylphosphonsäure als auch Fosfomycin nicht UV-aktiv sind, konnte für die Analytik dieser Substanzen keine HPLC-Methode mit Dioden Array- oder UV-Detektor entwickelt werden. In der Literatur sind einige Methoden beschrieben, die diese Problematik durch eine indirekte UV-Detektion umgehen. Hierzu wurden mehrere kapillarelektrophoretische Methoden beschrieben. *Leveque und Mitarbeiter*<sup>73</sup> veröffentlichten eine Methode mit indirekter Detektion von Fosfomycin durch Zugabe der UV-aktiven 4-Hydroxybenzoesäure in die Hintergrundelektrolytlösung. Diese Methode lieferte in dieser Arbeit keine Ergebnisse, da starke Schwankungen in der Stromstärke auftraten und keine stabile Basislinie resultierte. Eine Methode, die von *Petsch und Mitarbeitern*<sup>74</sup> beschrieben wurde, enthielt einen wesentlich geringeren Anteil an UV-aktiver Benzoesäure im Hintergrundelektrolyten. Auch mit dieser Methode war nur eine Basislinie mit großen Schwankungen zu beobachten. Diese Methode wurde für die Trennung von *cis*-1-Propenylphosphonsäure und Fosfomycin modifiziert. Die Konzentration der Benzoesäure wurde weiter verringert (von 25 mM auf 20 mM), ebenso der Zusatz von Cetrimid (von 0,5 mM auf 0,3 mM). Cetrimid wird der Hintergrundelektrolytlösung zugesetzt, um die Mobilität der Analyten zu verbessern, indem es sich an die

negativ geladene Kapillaren-Innenwand anlagert und diese Ladungen ausgleicht. Der pH-Wert wurde mit einer Trometamollösung auf einen höheren Wert eingestellt (pH 8,4 anstelle von pH 8,0). In Abbildung 4-21 ist ein mit der veränderten Methode erhaltenes Elektropherogramm abgebildet. Durch die UV-aktive Benzoesäure zeichnete der UV-Detektor bei 245 nm ein permanentes Signal auf. Erreichte eine UV-inaktive Substanz oder eine Substanz den Detektor, die bei dieser Wellenlänge nur eine geringe Absorption aufwies, wurde ein negativer oder inverser Peak im Elektropherogramm erhalten. Trotz der Optimierung des Hintergrundelektrolyten zeigte die Basislinie zu Beginn jeden Laufs deutliche Schwankungen, die sich aber vor der Migrationszeit der Analyten verringerten, so dass präzise Signale für eine Auswertung zur Verfügung standen. Für die Detektion beider Analyten innerhalb von vier Minuten war eine möglichst geringe Ionenkonzentration im Hintergrundelektrolyten vorteilhaft. Eine weitere Verringerung der Konzentration an Benzoesäure erschwerte eine eindeutige Trennung der Analyten.

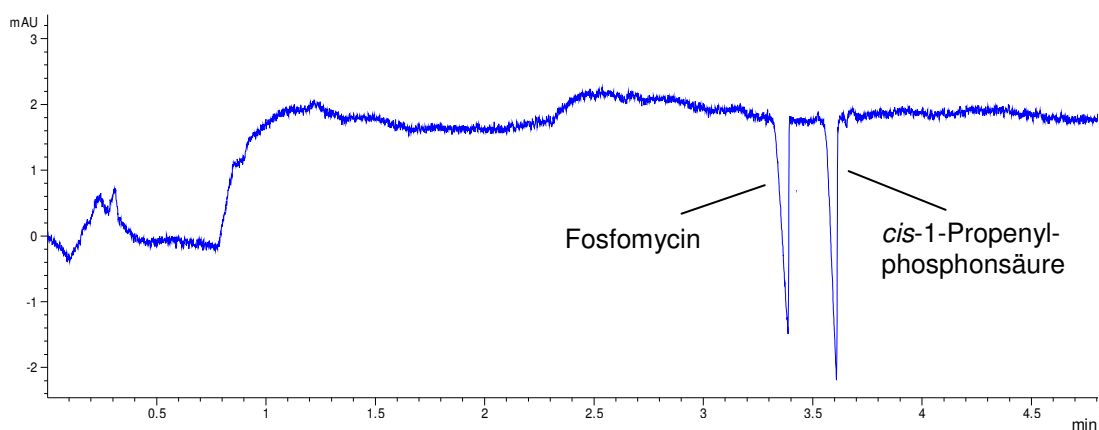


Abbildung 4-21 Elektropherogramm der Referenzsubstanzen *cis*-1-Propenylphosphonsäure und Fosfomycin

#### 4.6.4 Umsetzung von *cis*-1-Propenylphosphonsäure

Die Umsetzung von *cis*-1-Propenylphosphonsäure zu Fosfomycin gelang weder nach der konventionellen Methode, noch unter Einsatz der Synthesemikrowelle mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure nach den beschriebenen Vorschriften (AAV 10-12, Abschnitt 10.3.1).

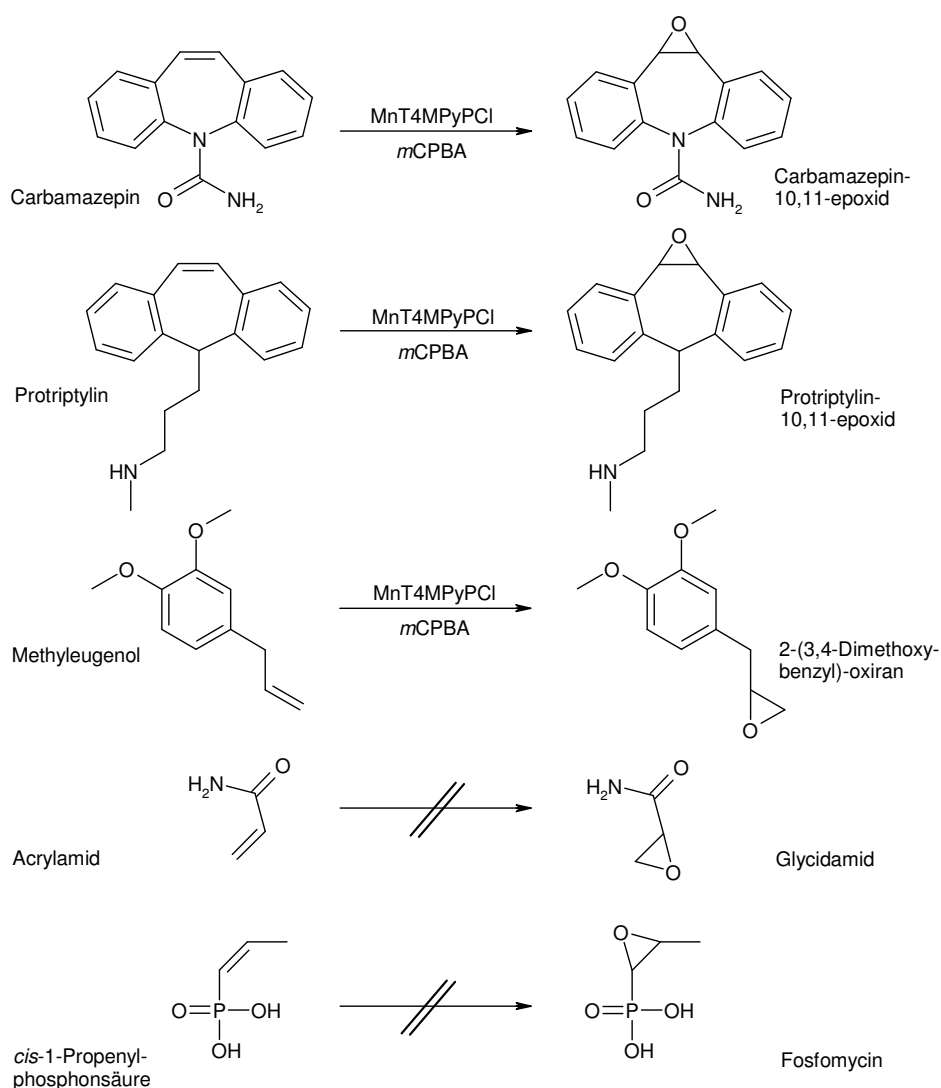
## 4.7 Abschließende Betrachtung

Mit Hilfe der Modellsubstanz Carbamazepin konnte eine optimierte Methode zur Epoxidierung von Substraten mit den biomimetischen Modellsystemen entwickelt werden. Zu Beginn der Untersuchungen wurden zunächst die vier verwendeten Metalloporphyrine mit den fünf ausgewählten Sauerstoffdonatoren zu verschiedenen Modellsystemen kombiniert. Hierbei erwies sich die in der Literatur<sup>65</sup> beschriebene Kombination von MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure als die effektivste in Bezug auf die Menge an gebildetem Epoxid aus dem Substrat Carbamazepin. Mit Iodosobenzol als Sauerstoffdonator konnten die nächstbesten Ausbeuten erzielt werden. Die kationischen Metalloporphyrine MnT4MPyPcI und FeT4MPyPcI zeigten mit Ausnahme der Kombination mit Wasserstoffperoxid die höheren Ausbeuten im Gegensatz zu den perfluorierten Metalloporphyrinen MnTFPPcI und FeTFPPcI (Abbildung 4-3, Abschnitt 4.2.4). In Abschnitt 2.2.1 wurde aufgrund der Studien von *Bartoli und Mitarbeitern*<sup>31</sup> über konkurrierende Hydroxylierung und Epoxidierung, katalysiert durch verschiedene Metalloporphyrine, bereits erwogen, dass kationische Metalloporphyrine eher bei Epoxidierungen eingesetzt werden sollten als perfluorierte Metalloporphyrine. Dies konnte mit den beschriebenen Untersuchungen bestätigt werden.

In weiteren Versuchen zeichnete sich der starke Einfluss des molaren Anteils an Sauerstoffdonator ab. Diese Steigerung war allerdings nur bedingt möglich, da die oxidative Zerstörung der Substrate und der Produkte einen limitierenden Effekt hatte. Bei der Zugabe des Sauerstoffdonators im 50 fachen Überschuss zum Substrat konnten die höchsten Ausbeuten an Epoxiden erhalten werden. Hierbei war es notwendig, dass der Sauerstoffdonator in Lösung gebracht und in mehreren Anteilen zum Reaktionsansatz zugegeben wurde. Die sonst eintretende heftige Reaktion zerstörte das Substrat nahezu vollständig. Bei Zugabe von Ethanol zu ungelöstem Sauerstoffdonator und immobilisiertem Metalloporphyrin trat eine heftige Reaktion zu Essigsäure ein.

Durch den Einsatz der Synthesemikrowelle konnten die maximalen Ausbeuten der Epoxide noch gesteigert werden. Als optimale Parameter zeigten sich eine Reaktionszeit von 10 Minuten und einer Temperatur von 25 °C. Die Reaktion von Protriptylin zum 10,11-Epoxid sprach am besten

auf die Erhöhung des molaren Anteils an Sauerstoffdonator und den Einsatz der Synthesemikrowelle an. Hier konnte die Ausbeute an Protriptylin-10,11-epoxid von zunächst 7 % auf 34 % bzw. 45 % gesteigert werden (Abbildung 4-13, Abschnitt 4.3.3). Die Epoxidierung von Methyleugenol gelang mit einer maximalen Ausbeute von etwa 70 %. Auffallend bei allen Umsetzungen in der Synthesemikrowelle waren die gegenüber der konventionellen Methode deutlich geringeren Standardabweichungen und die dadurch resultierende bessere Reproduzierbarkeit, die schon bei der Immobilisierung der eingesetzten Metalloporphyrine in der Synthesemikrowelle beobachtet werden konnten.



Schema 4-3 Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte biomimetische Epoxidierungen mit MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure

Die Reaktionen von Acrylamid und *cis*-1-Propenylphosphonsäure zu ihren entsprechenden Epoxiden konnten nicht mit den in dieser Arbeit optimierten biomimetischen Modellsystemen durchgeführt werden. Bei der Betrachtung der Strukturen fiel auf, dass nur die Doppelbindungen der Substrate mit elektronenreichen Substituenten epoxidiert werden konnten. *Wang und Mitarbeiter*<sup>75</sup> beschrieben die Umsetzung von *cis*-1-Propenylphosphonsäure mit Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator und Natriummolybdat bzw. Natriumwolframat als Katalysatoren in einem wässrigen Milieu. Eine Erklärung hierfür liefern *Lippard und Berg*<sup>3</sup>. Untersuchungen von Modellsystemen für das Cytochrom P450-Enzymsystem und für Molybdän-Oxotransferasen ließ eine Definition von Sauerstoffatomübertragungspotentialen zu. Aus diesen ging hervor, dass eisen- und manganhaltige Cytochrom P450-Modellsysteme mit Enthalpien für die Sauerstoffatomübertragung von - 15 kcal/mol weniger reaktiv sind als molybdänhaltige Modellsysteme mit Enthalpien von bis zu - 43 kcal/mol. Für Doppelbindungen, die in ihrer unmittelbaren Nähe keine elektronenreichen Substituenten aufweisen, wiesen die in dieser Arbeit verwendeten Modellkomplexe ein zu geringes Potential für die Sauerstoffübertragung auf.

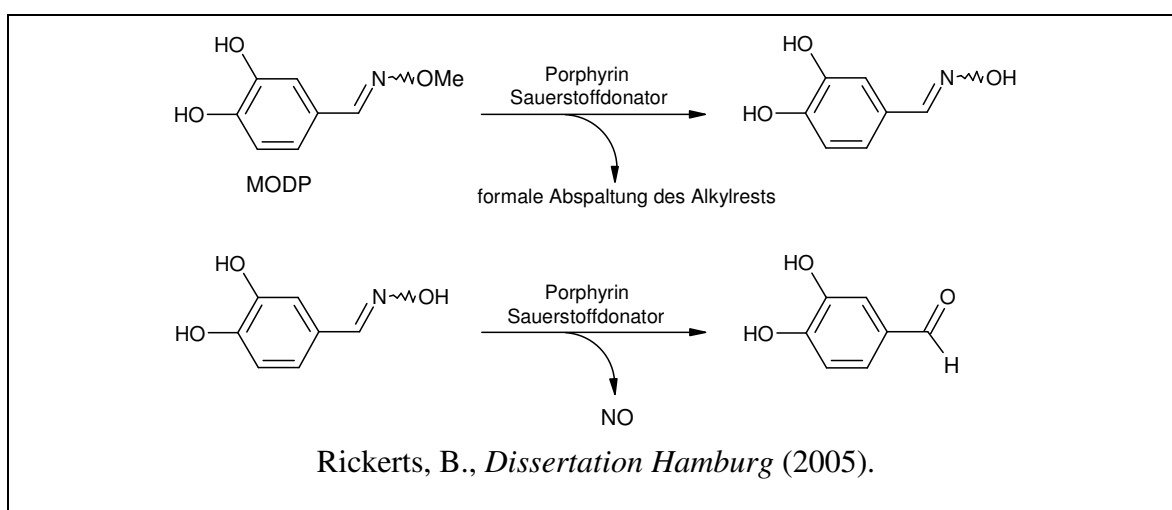


## 5 Modellsysteme für Desalkylierungen

### 5.1 Einleitung und Literaturübersicht

In Abschnitt 2.1 wurden die Desmethylierung von Benzylmethylether<sup>12</sup> und die Desethylierung von Lidocain<sup>19</sup> vorgestellt. Des Weiteren wurde eine Desbenzylierung von Antergan beschrieben<sup>76</sup>. Desalkylierungen längerer Alkylgruppen mit biomimetischen Modellsystemen wurden in der Literatur bisher nicht veröffentlicht.

*Culmsee und Mitarbeiter*<sup>77</sup> beschrieben die durch biomimetische Modellsysteme katalysierte NO-Freisetzung aus Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren mit N-Nitrosaminstruktur und verwendeten Methoxim-3,4-dephostat (MODP) als Negativkontrolle. *Rickerts*<sup>43</sup> zeigte, dass auch dieser Oximether mit potenten Modellsystemen geringe Mengen NO freisetzt und nahm eine der NO-Freisetzung vorangehende Desmethylierung an.



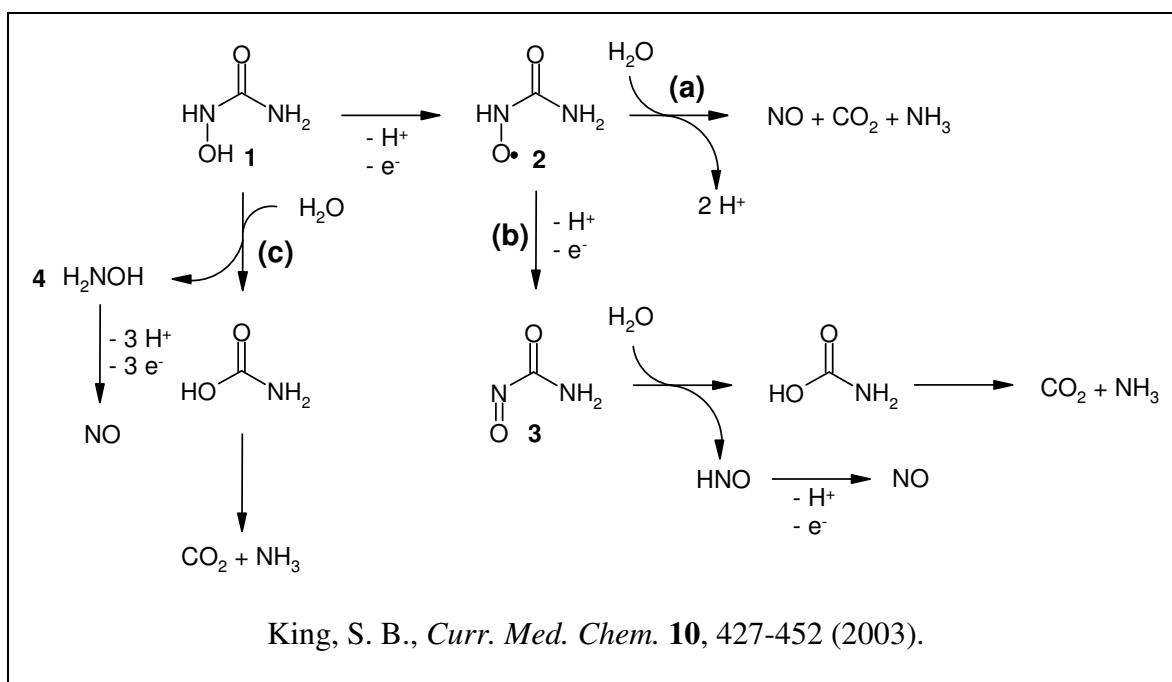
In der Arzneistoffgruppe der Antibiotika sind Oximether mit größeren Alkylresten zu finden. Das Makrolidantibiotikum Roxithromycin besitzt eine lineare und das Cephalosporin Ceftazidim eine verzweigte Oximetherstruktur. Aus der Gruppe der Cephalosporine sind noch neun weitere Oximether im therapeutischen Einsatz. Da es sich dabei aber um Methylether handelt, wurden diese unter dem Aspekt einer Desalkylierung größerer Alkylreste zu untersuchen, nicht weiter betrachtet. Mit *N*-Hydroxyharnstoff als NO-Donator sollte zunächst ein für die NO-Freisetzung optimiertes Modellsystem gefunden werden.

## 5.2 Pharmakologische Eigenschaften der Substrate

### 5.2.1 *N*-Hydroxyharnstoff

*N*-Hydroxyharnstoff wird seit langem als Chemotherapeutikum zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie und anderer maligner Tumore eingesetzt. Die zytotoxische Aktivität beruht auf Hemmung der Ribonukleotidreduktase durch Übertragung eines Protons auf das essentielle Tyrosylradikal des Enzyms und damit auf der Hemmung der DNS-Replikation. Des Weiteren lindert *N*-Hydroxyharnstoff die Inzidenz akuter Schmerzzustände bei Patienten mit Sichelzellenanämie. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt.

Für die NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (**1**) diskutiert *King*<sup>78</sup> drei parallel ablaufende Mechanismen.

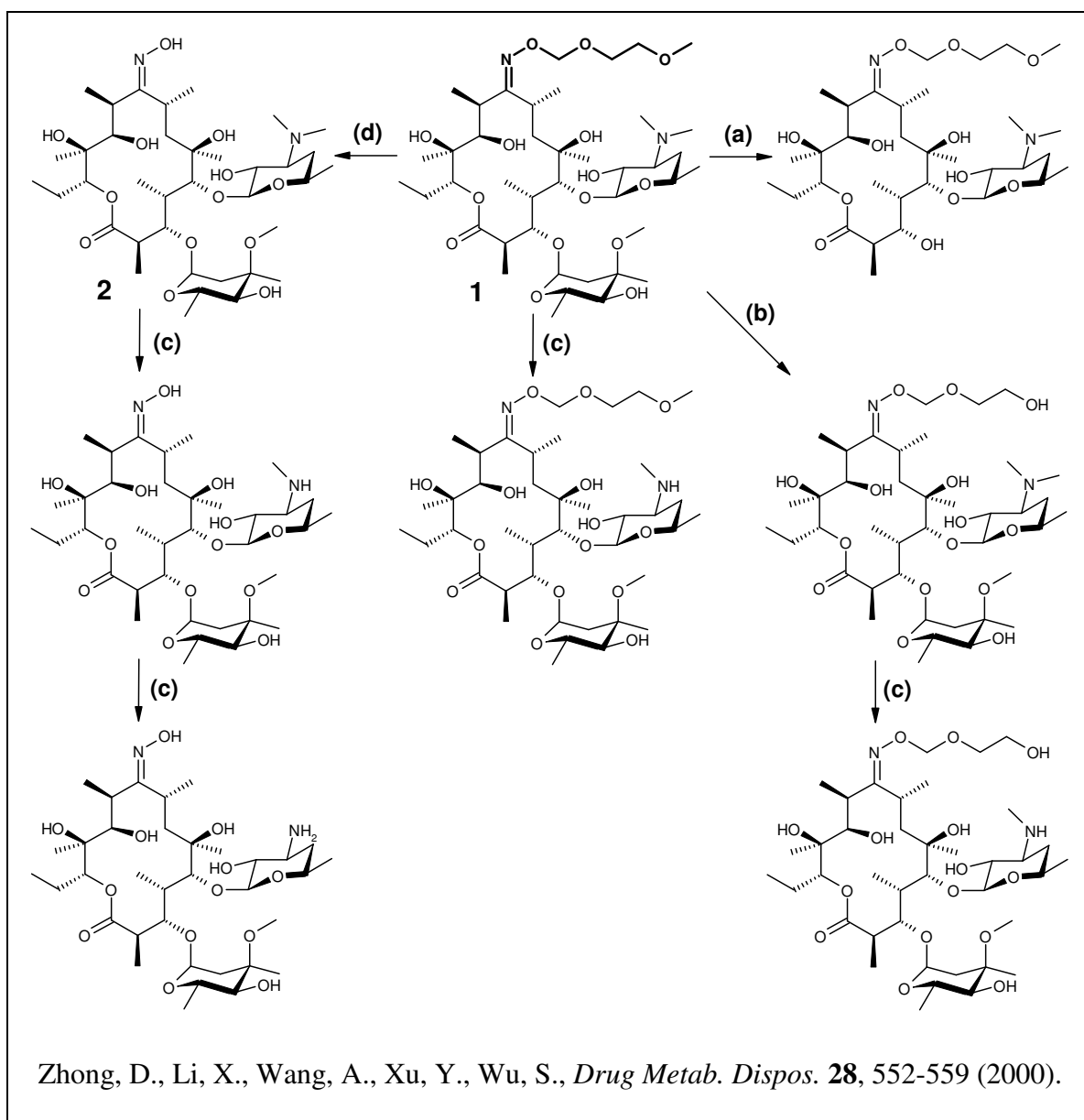


Über das durch die Abgabe eines Elektrons entstandene Nitroxidradikal (**2**) sind zwei Wege denkbar. Zum einen kann eine direkte Hydrolyse erfolgen (**a**). Zum anderen ist eine zweite Elektronenabgabe zum C-Nitrosoformamid (**3**) möglich, die über die Bildung von Hyposalpetriger Säure (HNO) durch eine dritte Elektronenabgabe zur Freisetzung von NO führt (**b**). Der dritte Weg ist die direkte Hydrolyse von **1** zu Hydroxylamin (**4**), Kohlendioxid und Ammoniak, gefolgt von einer Oxidation des

Hydroxylamins zu NO durch eine Übertragung von drei Elektronen. Bei Untersuchungen in vitro konnte der Reaktionsablauf **b** durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid von *King*<sup>78</sup> bewiesen werden.

### 5.2.2 Roxithromycin

Das Makrolidantibiotikum Roxithromycin (**1**) hemmt die bakterielle RNS-abhängige Proteinsynthese während der Elongation durch seine Bindung an die 50S-Untereinheit des Ribosoms und blockiert so die Translokation der Peptidyl-tRNS von der Akzeptor- zur Donorposition. Dadurch kommt es zur vorzeitigen Unterbrechung der Proteinsynthese und zur bakteriostatischen Wirkung auf vorwiegend grampositive Keime.



Zhong und Mitarbeiter<sup>79</sup> beschrieben fünfzehn Metaboliten in vivo. Roxithromycin (**1**) erfährt eine Abspaltung der Cladinose (**a**), eine O-Desmethylierung (**b**), N-Desmethylierungen (**c**) und eine Etherspaltung (**d**) zum Erythromycinoxim (**2**). Jeder Metabolit und Roxithromycin selbst konnten als E- und Z-Isomer (bezogen auf die Oximstruktur) identifiziert werden.

Eine NO-Freisetzung aus **2** ist in vivo nicht beschrieben. Makrolidantibiotika, insbesondere Roxithromycin, Erythromycin, Clarithromycin und Azithromycin sind aber für eine Steigerung der NO-Synthase-Aktivität bekannt. Da NO einen der zytostatischen und zytotoxischen Abwehrmechanismen des Organismus gegen Pathogene in der nicht-spezifischen Immunabwehr darstellt, wirkt sich eine durch Makrolidantibiotikagabe gesteigerte Freisetzung positiv auf die Bekämpfung einer Infektion aus<sup>80</sup>.

### 5.2.3 Ceftazidim

Ceftazidim gehört zu der dritten Generation der Cephalosporine und greift in die Zellwandsynthese proliferierender Bakterien ein. Cephalosporine reagieren ähnlich den Penicillinen mit der Transpeptidase, welche die Verknüpfung zweier Glykopeptide als letzte Stufe der Zellwandsynthese katalysiert. Durch Blockade dieses Prozesses kommt es zur Deformierung und Lyse der Zellwand und somit zur Zerstörung des Bakteriums. Ceftazidim wirkt bakterizid sowohl auf gramnegative als auch auf einige grampositive Keime und ist cephalosporinasestabil<sup>1</sup>. Ceftazidim wird nicht metabolisiert und durch glomeruläre Filtration renal ausgeschieden<sup>81</sup>.

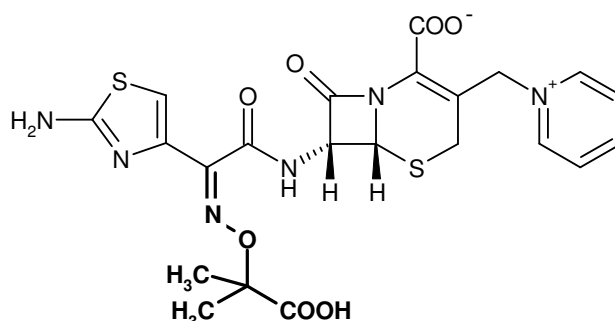


Abbildung 5-1 Das Cephalosporin Ceftazidim mit einer verzweigten Oximetherstruktur

### 5.3 Methodenoptimierung mit *N*-Hydroxyharnstoff

Alle Versuche zur NO-Freisetzung in diesem Abschnitt wurden nach der Liquid-Methode am NOA<sup>TM</sup> durchgeführt. Mit *N*-Hydroxyharnstoff als Substrat wurden alle Kombinationsmöglichkeiten unter den eingesetzten Metalloporphyrinen (Abschnitt 2.2) und den Sauerstoffdonatoren (Abschnitt 2.3) untersucht. Als Lösungsmittel wurde ein Phosphatpuffer mit dem physiologischen pH-Wert 7,4 verwendet (n = 3).

*N*-Hydroxyharnstoff hat ohne Zugabe von Metalloporphyrin und Sauerstoffdonator kein NO freigesetzt (Abbildung 5-2). Ohne Zugabe eines Metalloporphyrins war nur mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure eine deutliche NO-Freisetzung zu beobachten. Das leistungsfähigste Modellsystem war die Kombination aus Iodosobenzol als Sauerstoffdonator und MnTFPPCl. Es konnte auf diese Weise eine Ausbeute von nahezu 100 % erreicht werden.

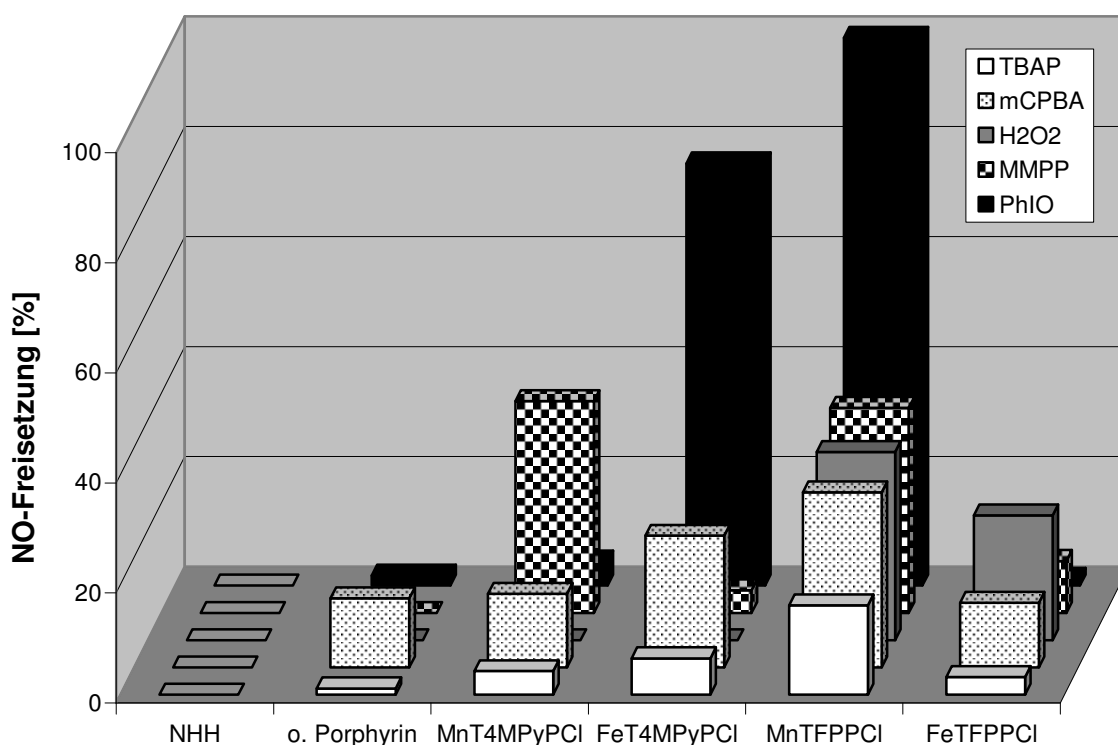


Abbildung 5-2 Gesamtübersicht der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit verschiedenen Kombinationen von Metalloporphyrin und Sauerstoffdonator

Für MnT4MPyPcI und FeT4MPyPcI sind mit Wasserstoffperoxid keine Ergebnisse vorhanden, da diese kationischen Metalloporphyrine im Reaktionsgefäß vollständig zerstört wurden. Konnte in der Gesamtübersicht

der Untersuchungen zu Carbamazepin (Abschnitt 4.2.4, Abbildung 4-3) noch eine Abhängigkeit der Ausbeute an Epoxid durch den Einsatz der einzelnen Metalloporphyrine unabhängig von der Art des Sauerstoffdonators erkannt werden, scheint dies bei diesen Ergebnissen nicht möglich zu sein, da die Ausbeuten mit Magnesiummonoperoxyphthalat als Sauerstoffdonator sich nicht analog zu den übrigen verhalten. Wie auch schon die Untersuchungen von Cyclohexanonoxim zeigten (Abschnitt 3.5.2, Abbildung 3-6), erwies sich die Kombination aus MnTFPPCl und Iodosobenzol bei pH 7,4 als die effektivste für diese Methode und wurde für die folgenden Versuche eingesetzt.

## 5.4 Desalkylierung von Roxithromycin und Ceftazidim

### 5.4.1 NO-Freisetzung

Die NO-Freisetzung aus beiden Antibiotika wurde mit dem zuvor optimierten Modellsystem, bestehend aus MnTFPPCl und Iodosobenzol als Sauerstoffdonator, mit der Liquid-Methode untersucht (Abschnitt 5.3). Als Lösungsmittel wurden Puffer mit pH 4,5, pH 7,4 und pH 9,0 gewählt (n = 3).

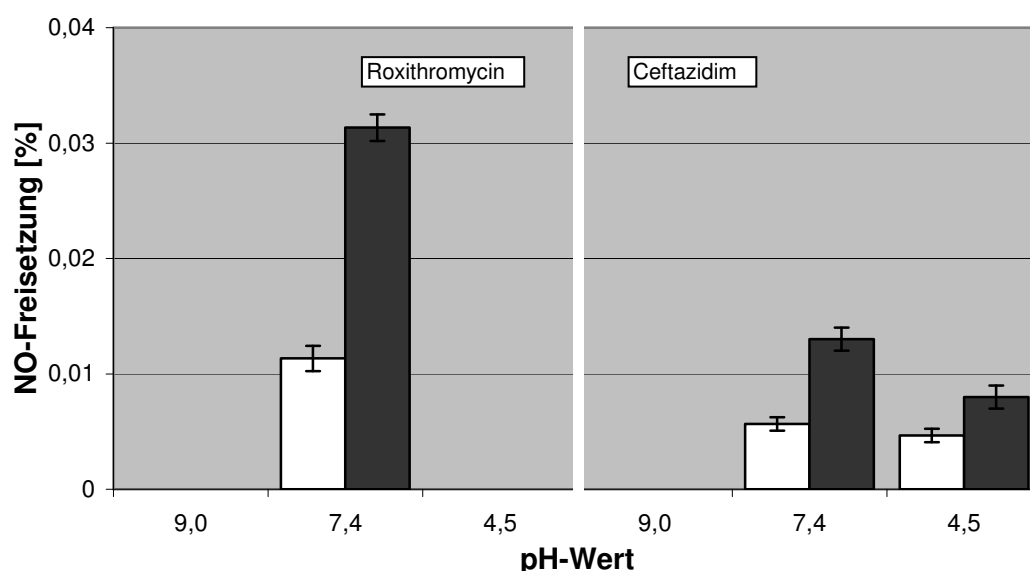


Abbildung 5-3 NO-Freisetzung aus Roxithromycin und Ceftazidim mit MnTFPPCl und Iodosobenzol, ohne (weiß) und mit Zusatz von Kupfer(II)-Ionen (schwarz)

Bei pH 4,5 und 9,0 wurde aus Roxithromycin kein NO freigesetzt\* und bei pH 7,4 nur 0,01 %. Durch die Zugabe einer zum Substrat äquimolaren Menge an Kupfer(II)-Ionen in das Reaktionsgefäß konnte die Ausbeute verdreifacht werden. Ceftazidim setzte ebenfalls bei pH 4,5 kein NO frei, bei pH 7,4 und 9,0 konnten deutlich geringere Mengen als bei Roxithromycin detektiert werden. Durch Zugabe von Kupfer(II)-Ionen ließen sich diese Ausbeuten auch nur bedingt steigern (Abbildung 5-3).

#### 5.4.2 Nitrit-Bildung

Da NO durch die sehr potenten Modellsysteme spontan weiter zu Nitrit und Nitrat oxidiert werden kann, wurden auch diese Produkte untersucht. Wie bereits in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, kann mit einer Vorlage von Kaliumiodid in Eisessig im Reaktionsgefäß des NOA™ Nitrit durch Reduktion zu NO bestimmt werden. Die Ansätze erfolgten im externen Probengefäß in den drei zuvor verwendeten Pufferlösungen bei pH 4,5, pH 7,4 und pH 9,0 und wurden bei 37 °C inkubiert (n = 3). Zu festgelegten Zeitpunkten wurden jeweils 100 µL aus jedem Probengefäß entnommen und in das Reaktionsgefäß überführt.

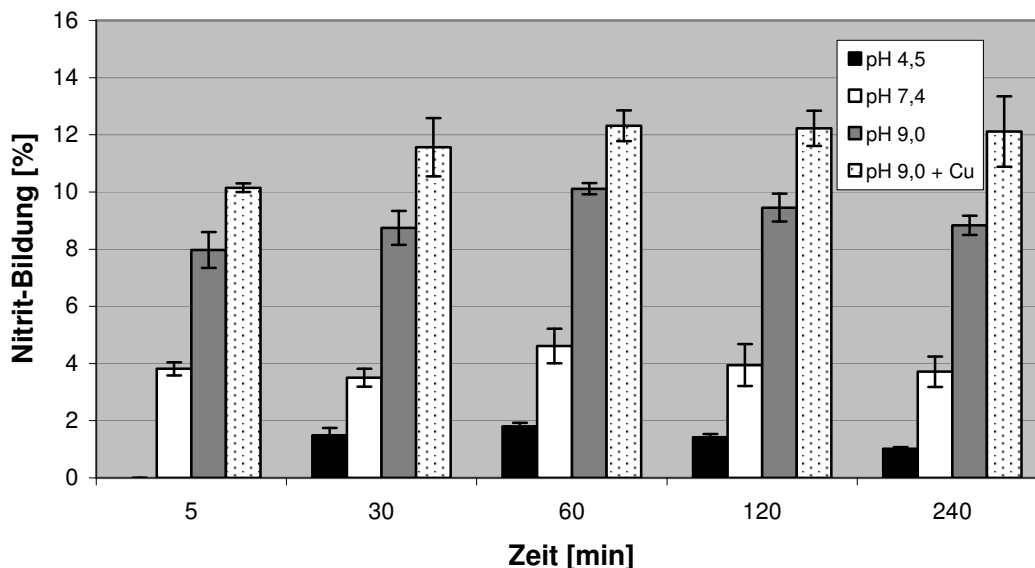


Abbildung 5-4 Nitrit-Bildung aus Roxithromycin bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit zur Reaktionszeit

\* Bei Roxithromycin ist zusätzlich zum Oximether eine Acetalstruktur enthalten. Eine hydrolytische Spaltung dieser Struktur bei pH 4,5 und eine Freisetzung oxidierter Stickstoffspezies kann nicht ausgeschlossen werden.

Die maximalen Werte der Nitrit-Bildung konnten nach 60 Minuten Inkubationszeit erreicht werden (Abbildung 5-4), die höchsten Ausbeuten bei pH 9,0. Durch Zugabe von Kupfer(II)-Ionen zum Reaktionsansatz konnte die Ausbeute nochmals gesteigert und eine Ausbeute von über 12 % erhalten werden.

Die Versuche mit Ceftazidim zeigten eine nach 120 Minuten erreichte maximale Bildung von Nitrit. Im Gegensatz zu Roxithromycin wurde ohne Kupfer(II)-Ionen-Zusatz die höchste Ausbeute bei pH 7,4 erhalten. Durch Zusatz von Kupfer(II)-Ionen konnte dieser Wert nicht gesteigert werden (nicht gezeigt), bei pH 9,0 hingegen erreichte die Ausbeute durch Zusatz von Kupfer(II)-Ionen einen maximalen Wert von etwa 7 %.

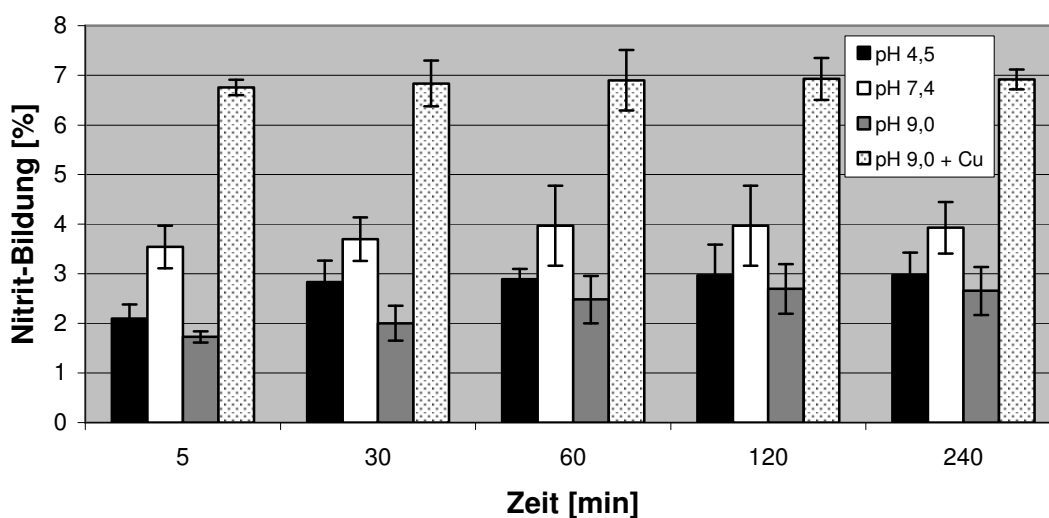


Abbildung 5-5 Nitrit-Freisetzung aus Ceftazidim bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit zur Reaktionszeit

Diese Versuche wurden auch in der Synthesemikrowelle (10 min, 37 °C) durchgeführt, wodurch keine Steigerung der Ausbeute erreicht werden konnte.



### 5.4.3 Nitrat-Bildung

Für die Reduktion von Nitrat wurden in dem Reaktionsgefäß des NOA™ 5 mL einer gesättigten Lösung von Vanadium(III)-chlorid in 1 M Salzsäure vorgelegt und auf 95 °C temperiert. Die Ansätze wurden analog zu denen bei der Nitrit-Bestimmung hergestellt. Die bei der Nitrat-Bestimmung miterfassten Nitritwerte wurden von der Ausbeute abgezogen.

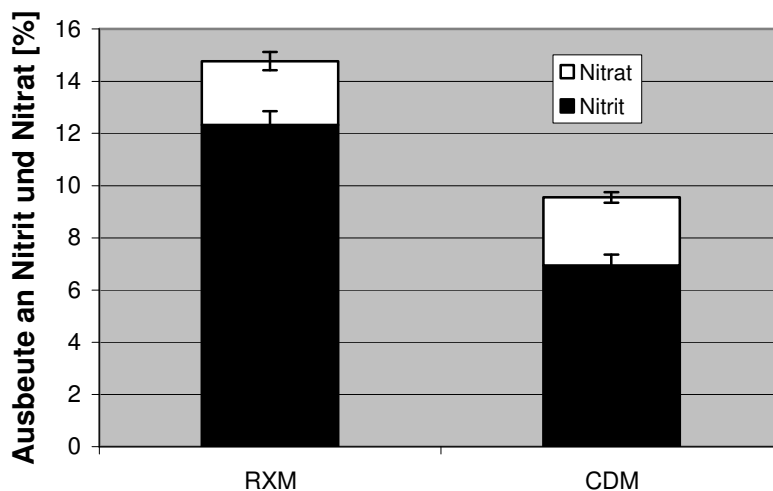
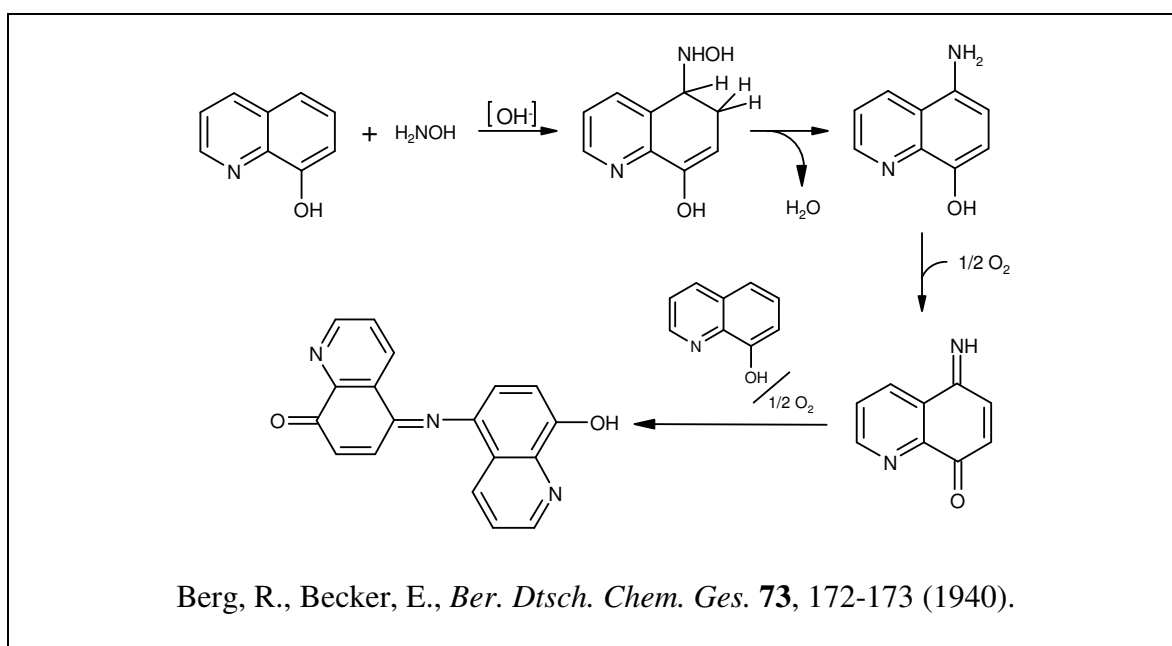


Abbildung 5-6 Aus Roxithromycin und Ceftazidim gebildete Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen (pH 9,0 mit Kupfer(II)-Ionen)

Diese Versuche wurden in der Synthesemikrowelle (10 min, 37 °C) durchgeführt, wodurch ebenfalls keine Ausbeutesteigerung erreicht werden konnte.

### 5.4.4 Hydroxylamin als Zwischenprodukt der NO-Freisetzung

Des Weiteren sollte Hydroxylamin als mögliche Zwischenstufe der NO-Freisetzung bzw. Nitrit-Bildung nachgewiesen werden. Dies erfolgte nach *Berg und Becker*<sup>82</sup> durch Reaktion von Hydroxylamin mit 8-Hydroxychinolin zu einem grün gefärbten Chinonimin, welches bei 700 nm photometrisch bestimmt werden kann.

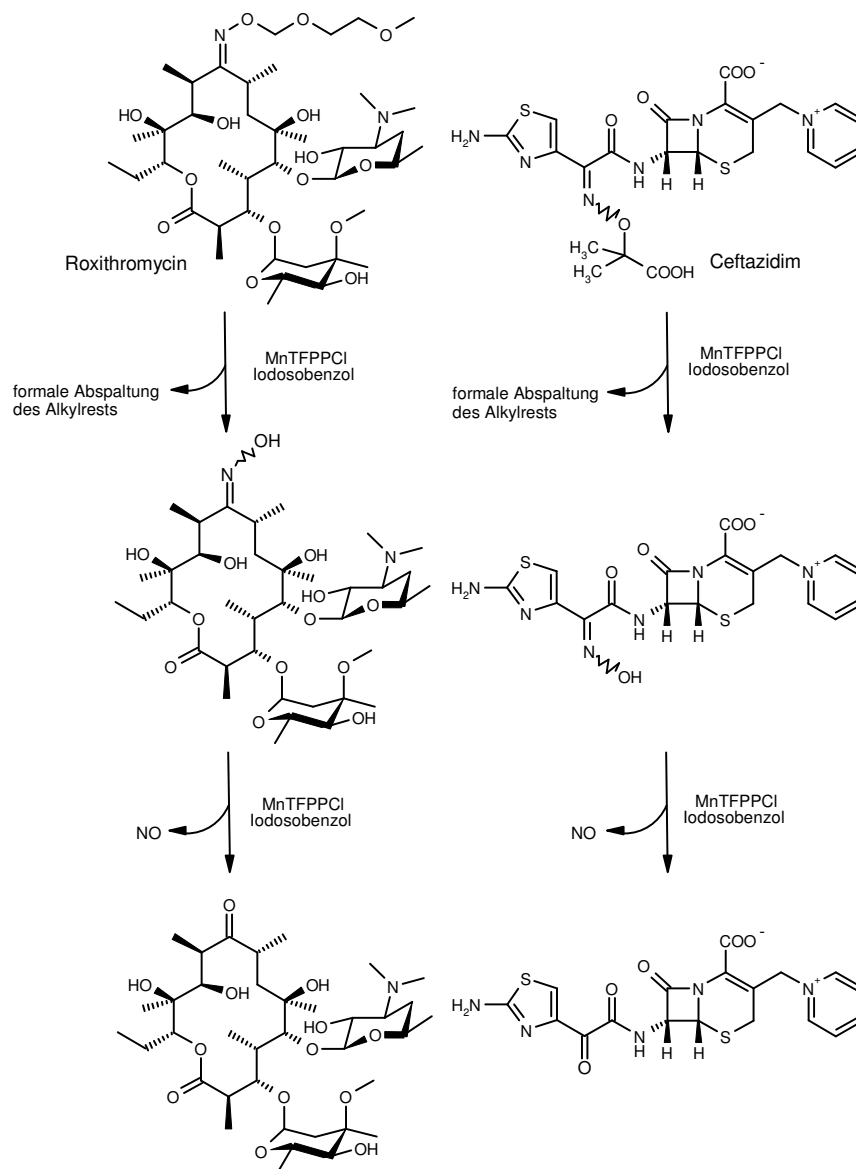


Diese Farbreaktionen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Freisetzungsreaktionen, d.h. mit einem zehnfachen Überschuss an Sauerstoffdonator, durchgeführt und zeigten ein negatives Ergebnis. Runge<sup>56</sup> führte ähnliche Beobachtungen auf die Oxidationsempfindlichkeit von Hydroxylamin durch überschüssiges Iodosobenzol und auf eine oxidative Zerstörung des grün gefärbten Chinonimins zurück. Bei der Zugabe äquimolarer Mengen Iodosobenzol zum Reaktionsansatz trat eine grüne Färbung auf, durch die eine Entstehung von Hydroxylamin bewiesen wurde. Nach wenigen Minuten war bereits eine deutliche Abnahme der Konzentration zu beobachten, die nach zwanzig Minuten die Hälfte des Ausgangswertes erreicht hatte. Auch dies war auf die Oxidationsempfindlichkeit des Farbstoffs zurückzuführen. Dennoch konnte diese Konventionmethode unter Einhalten gleicher Reaktionszeiten zu vergleichenden Aussagen und zu einem qualitativen Hydroxylamin-Nachweis herangezogen werden.

Bei der Reaktion beider Antibiotika wurde Hydroxylamin nachgewiesen, bei der Reaktion von Roxithromycin 1,39 % und bei der Reaktion von Ceftazidim 2,21 %, jeweils bezogen auf die eingesetzte Menge an Antibiotikum.

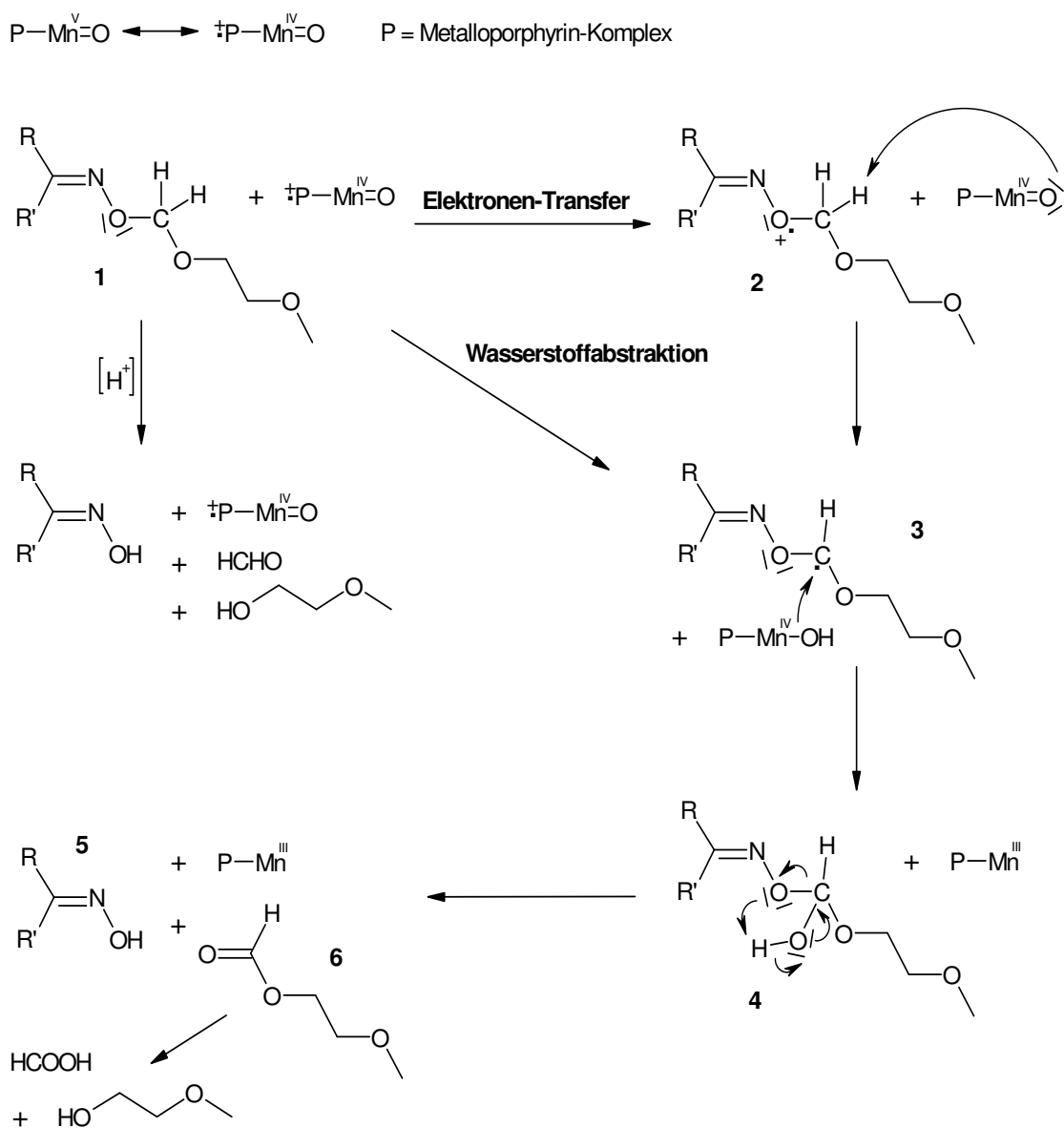
## 5.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Bildung von NO, Nitrit und Nitrat aus Roxithromycin und Ceftazidim lässt sich durch eine erfolgte Desalkylierung zum jeweiligen Oxim durch das verwendete biomimetische Modellsystem erklären (Schema 5-1). Die NO-, Nitrit- und Nitrat-Freisetzung aus Oximen wurde bereits ausführlich beschrieben, wobei die Oximstruktur durch eine Carbonylstruktur ersetzt wird<sup>43, 59, 60</sup>. In der Literatur<sup>12, 19, 76</sup> ist die Desalkylierung von Methyl-, Ethyl- und Benzylgruppen bereits veröffentlicht worden, nicht aber die Desalkylierung längerer und verzweigter Alkylreste.



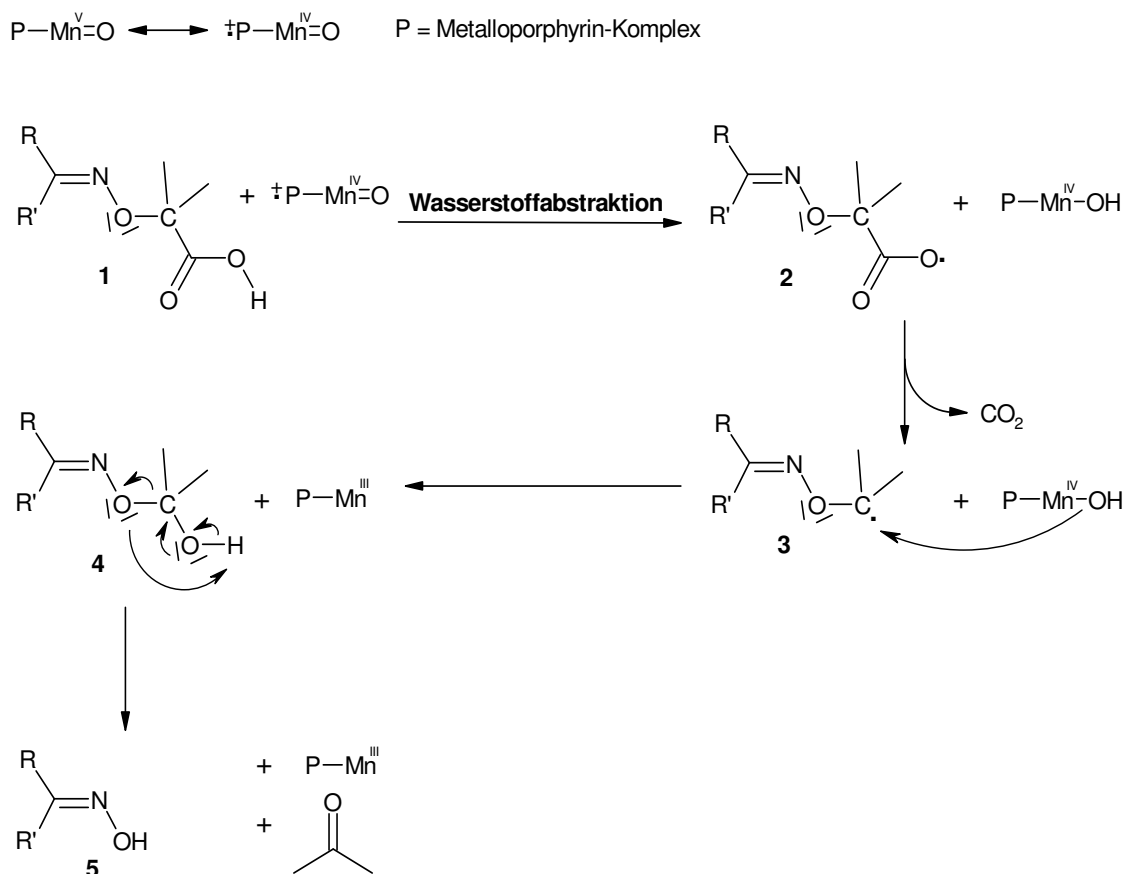
Schema 5-1 Desalkylierung der Oximetherstrukturen und Spaltung der resultierenden Oxime von Roxithromycin und Ceftazidim

Für die Desalkylierung von Roxithromycin und Ceftazidim können in der vorliegenden Arbeit verschiedene Mechanismen postuliert werden. Die Desalkylierung von Roxithromycin (**1**), welche auch als oxidative Spaltung eines Acetals angesehen werden kann, könnte entweder durch eine Wasserstoffabstraktion<sup>83</sup> oder eine Elektronenübertragung eingeleitet werden (Schema 5-2). Das Sauerstoffradikal-Kation (**2**) gibt ein Proton des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms ab, woraufhin dieser einen radikalischen Zustand erreicht (**3**). Durch die homolytische Spaltung des aktivierten Porphyrin-Sauerstoff-Komplexes erfolgt eine Hydroxylierung (**4**) und anschließend eine Spaltung zum desalkylierten Oxim (**5**) und einem Ameisensäureester (**6**), der wiederum zu Ameisensäure und 2-Methoxyethanol hydrolysiert.



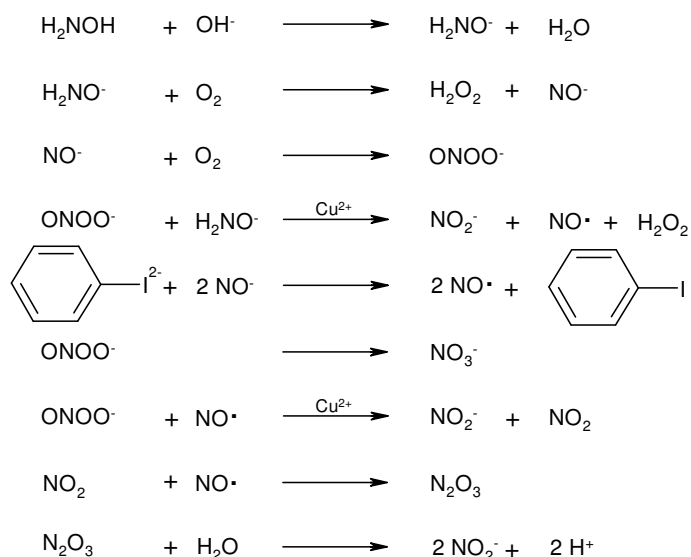
Schema 5-2 Postulierter Mechanismus der Desalkylierung von Roxithromycin (**1**)

Für den ersten Schritt der Desalkylierung von Ceftazidim (**1**) kann eine oxidative Decarboxylierung angenommen werden, die von *Chauhan und Mitarbeitern*<sup>84</sup> für Ibuprofen beschrieben wurde. Es kommt zu einer Übertragung eines Wasserstoffatoms vom Ceftazidim auf das Oxenoid (**2**) und anschließend zur Decarboxylierung, so dass ein Kohlenstoffradikal (**3**) entsteht. Durch den hydroxylierten Porphyrinkomplex erfolgt eine Hydroxylierung (**4**) und anschließend eine Spaltung zum desalkylierten Oxim (**5**) und Aceton.



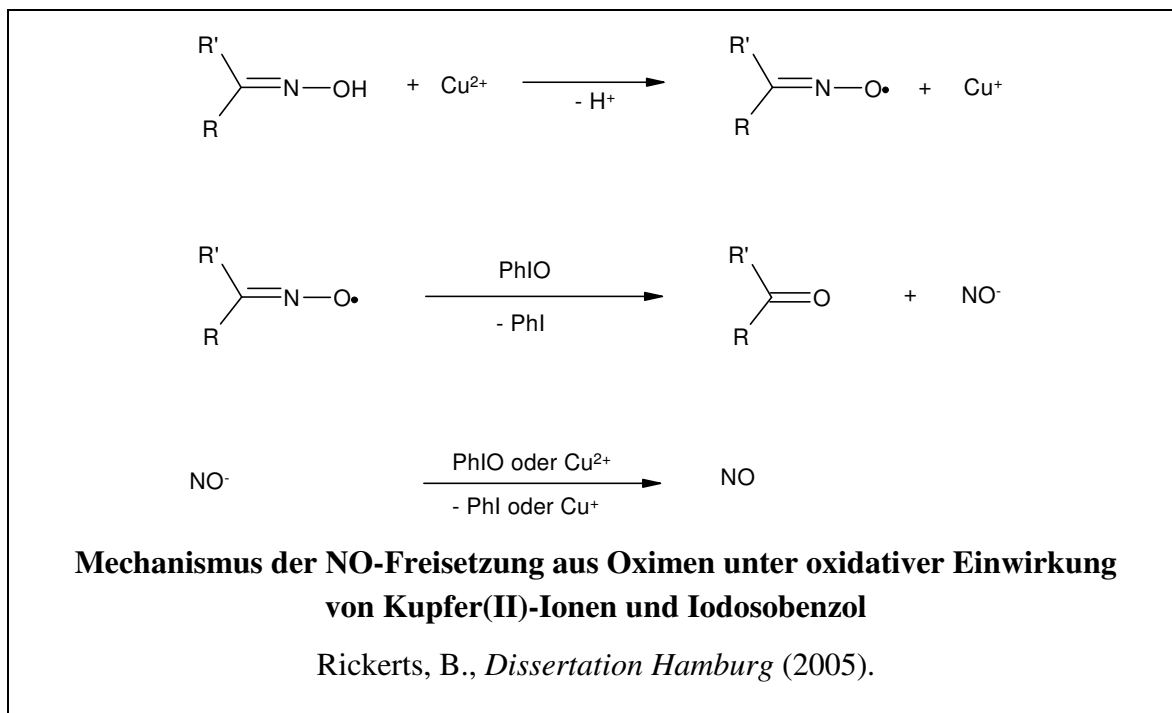
Schema 5-3 Postulierter Mechanismus der Desalkylierung von Ceftazidim (**1**)

Durch den positiven Nachweis von intermediär gebildetem Hydroxylamin ist eine eingetretene hydrolytische Spaltung des entstandenen Oxims zu Hydroxylamin und der entsprechenden Carbonylverbindung nachgewiesen worden. Hydroxylamin setzt nach mehreren Reaktionsstufen das radikalische NO frei. Für diesen Mechanismus spricht ebenfalls die gesteigerte Ausbeute an oxidierten Stickstoffspezies nach Zusatz von Kupfer(II)-Ionen. Diese steigern die NO- und Nitrit-Bildung aus Peroxynitrit<sup>43, 56</sup>, welches wiederum aus Nitroxylanionen (NO<sup>-</sup>) und Sauerstoff entsteht (Schema 5-4).



Schema 5-4 Freisetzung verschiedener oxidierter Stickstoffspezies aus Hydroxylamin und deren Folgeprodukte<sup>43, 56</sup>

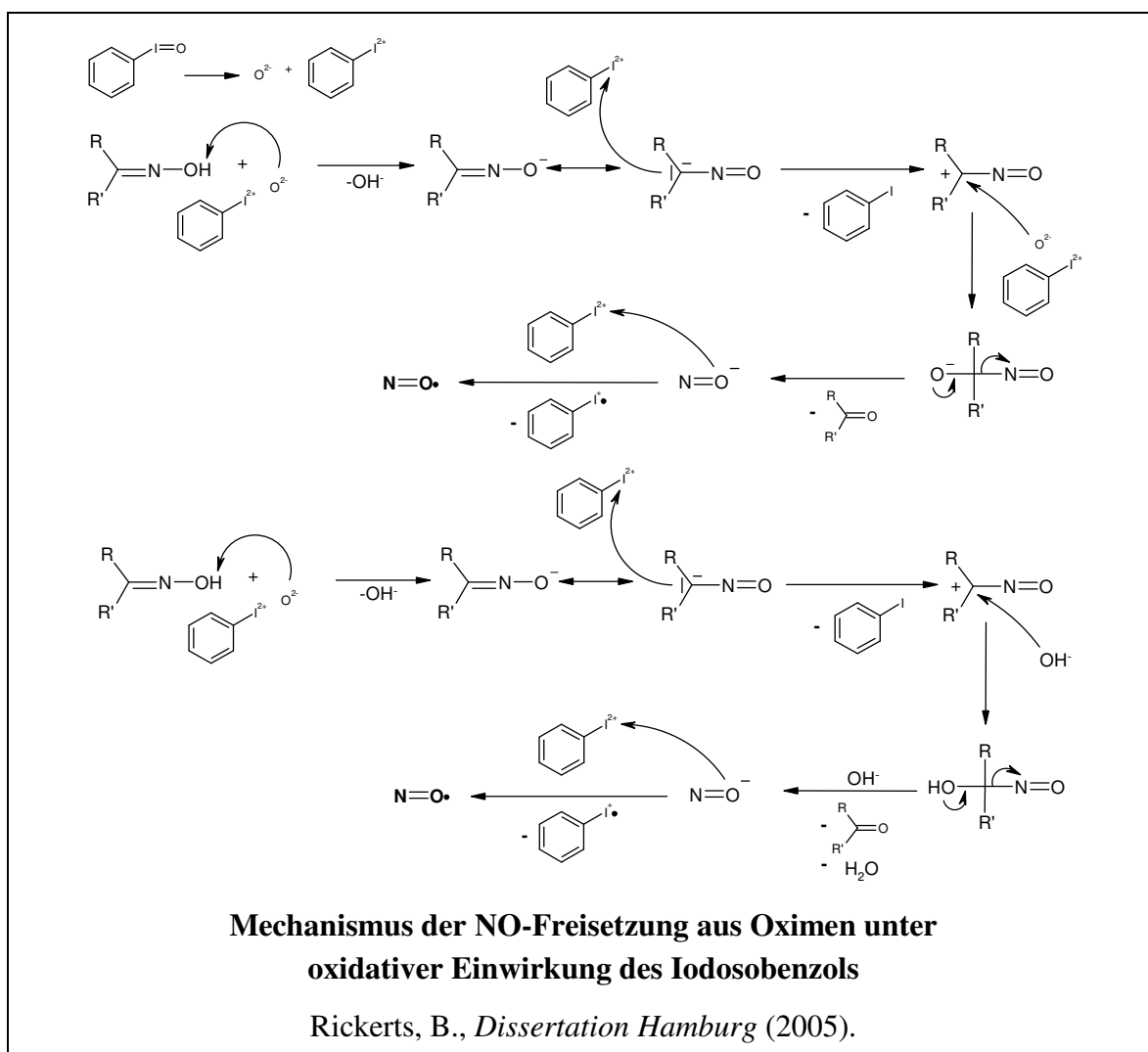
Neben diesem Mechanismus über Hydroxylamin wiesen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen auf weitere Reaktionswege hin, da insbesondere die Ausbeuten an Hydroxylamin bei beiden Antibiotika unter 2,5 % lagen. Rickerts<sup>43</sup> postulierte vier Mechanismen ohne die intermediäre Bildung von Hydroxylamin, die vermutlich auch parallel ablaufen.



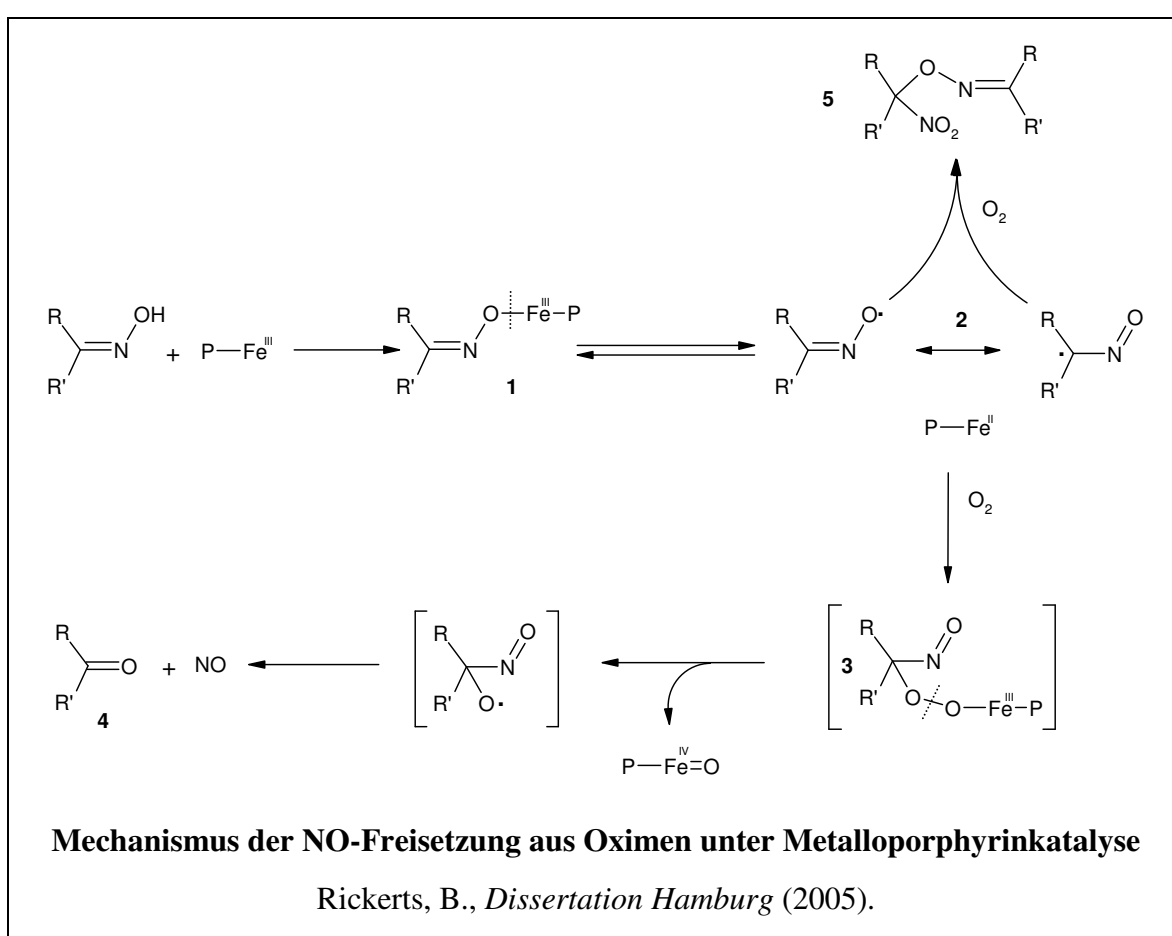
Zum einen kann eine NO-Freisetzung aus den desalkylierten Oximethern unter oxidativer Einwirkung von Kupfer(II)-Ionen und Iodosobenzol

ablaufen. Durch die Reaktion mit den Kupfer(II)-Ionen entsteht zunächst ein Iminoxyradikal, welches anschließend durch Iodosobenzol zu einem Nitroxylanion und der entsprechenden Carbonylverbindung reagiert. Das Nitroxylanion wird dann durch Iodosobenzol oder Kupfer(II)-Ionen zu NO oxidiert. Diese Reaktionen erfolgen bevorzugt bei höheren pH-Werten. Die Erhöhung der Ausbeute an oxidierten Stickstoffspezies durch Kupfer(II)-Ionen ist folglich kein Hinweis auf die Beteiligung von Hydroxylamin am Reaktionsmechanismus.

In einem weiteren Reaktionsweg ist eine NO-Freisetzung unter alleinigem Einfluss des Iodosobenzols denkbar. Es reagieren 2 Mol des Oxims mit 3 Mol Iodosobenzol. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer intermediären Bildung von Nitroxylanionen, aus denen durch Reaktion mit Iodosobenzol NO entsteht.



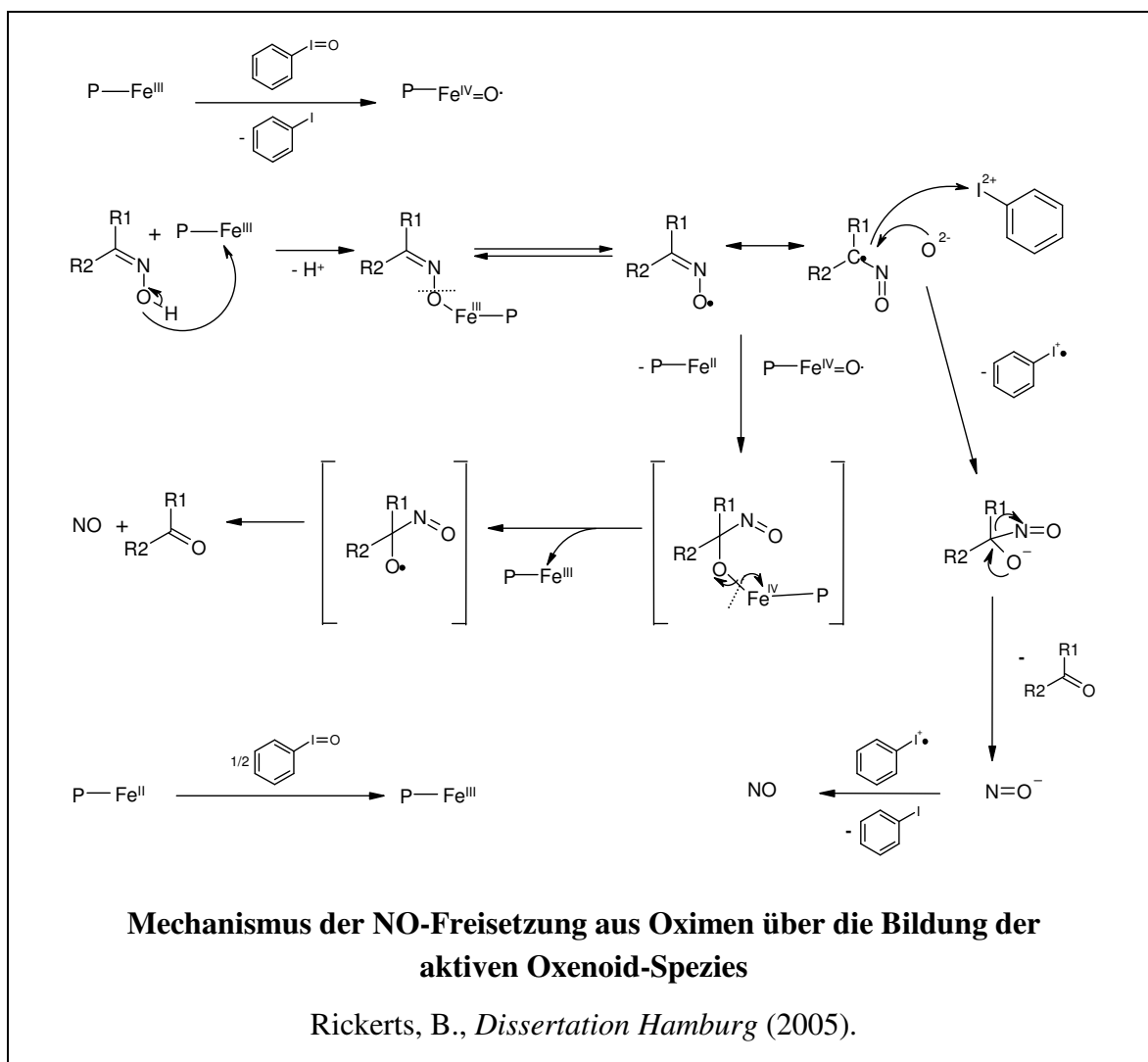
Der dritten Möglichkeit liegt ein Mechanismus für die NO-Freisetzung aus Oximen unter Metalloporphyrinkatalyse ohne Beteiligung eines Sauerstoffdonators zu Grunde. Durch die Reaktion des Oxims mit dem Metalloporphyrin kommt es zur Bildung eines Eisen(III)-Oxim-Komplexes (**1**). Durch eine homolytische Spaltung der enthaltenen Eisen-Sauerstoff-Bindung entsteht intermediär ein Iminoxyradikal (**2**), welches ein dimerähnliches Nebenprodukt bilden kann (**5**)<sup>58</sup>. Durch Sauerstoffinsertion entsteht eine sehr instabile Peroxyeisen(III)-Hämspezies (**3**), die spontan den Metalloporphyrinkomplex homolytisch abspaltet und über ein instabiles Radikal NO und die resultierende Carbonylverbindung bildet.



Im vierten Reaktionsweg verläuft die NO-Freisetzung über die Bildung der aktiven Oxenoid-Spezies aus dem Metalloporphyrinkomplex und Iodosobenzol. Das Oxim reagiert mit dem nicht-aktivierten Metalloporphyrinkomplex zu einem Eisen(III)-Oxim-Komplex, der unter Bildung eines Iminoxyradikals hydrolysiert wird. Durch Anlagerung eines Oxenoids an das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom dieses Radikals entsteht eine instabile Eisen(III)-



peroxospezies, die nach Abspaltung des Metalloporphyrins NO und die entsprechende Carbonylverbindung erzeugt.



Die Bindung eines Oxims an ein Metallion über den Sauerstoff ist nur selten in der Literatur veröffentlicht worden<sup>43</sup>, aber für diesen Mechanismus essentiell. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass Oxime sich üblicherweise über den basischeren Stickstoff an Metallionen binden<sup>43, 85-87</sup>. Der daraus entstehende Komplex ist sehr stabil und würde keine NO-Freisetzung mehr zulassen<sup>43</sup>. Da nur geringe Mengen an oxidierten Stickstoffspezies bei beiden Antibiotika detektiert werden konnten, ist die Bildung dieses Komplexes nicht auszuschließen. Normalerweise ist der Stickstoff im Oxim basischer als der Sauerstoff, elektronenziehende Substituenten und ein alkalisches Milieu senken aber die Basizität des Stickstoffs und erleichtern die Komplexbildung über den Sauerstoff.

Elektronenziehende Substituenten sind nur in der Struktur des Ceftazidims vorhanden, dennoch kann im Verhältnis zum Roxithromycin nur eine geringere Ausbeute an oxidierten Stickstoffspezies detektiert werden. Dies kann zum einen sterisch bedingt sein, wobei die Methylgruppen eine Porphyrinannäherung behindern, da im Ceftazidim ein verzweigter Oximether vorliegt. Zum anderen bewirkt die durch starke elektronenziehende Substituenten am Oximether verminderte Basizität des Stickstoffs eine verminderte Neigung zur Protonierung und somit auch zur Protolyse. Also würde eine geringere Menge an freiem Oxim entstehen, welches dann auch zu einer geringeren Hydrolyse unter NO-Freisetzung neigt. Von *Rickerts*<sup>43</sup> wurde der Einfluss der Symmetrie des Substrates auf die NO-Freisetzung beschrieben. Eine Symmetrie im Molekül bewirkt einen geringeren Unterschied der Basizitäten des Sauerstoffs und des Stickstoffs in der Oximgruppe. Dadurch kommt es zu einer genügend hohen Zahl der für die katalytische Wirkung entscheidenden Oxim-Porphyrin-Komplexe über den Sauerstoff. Bei hohen pH-Werten ist dieser Komplex zusätzlich bevorzugt, was sich durch die maximalen Ausbeuten an oxidierten Stickstoffspezies bei pH 9,0 bestätigte.

Es ist anzunehmen, dass Roxithromycin in Gegenwart des biomimetischen Modellsystems eher über den Mechanismus der Metalloporphyrinkatalyse ohne Beteiligung des Sauerstoffdonators oxidierte Stickstoffspezies freisetzt. Dafür sprechen die geringe Menge an detektiertem Hydroxylamin und die höhere Menge an oxidierten Stickstoffspezies, da intermediär bei diesem Mechanismus keine Nitroxylanionen gebildet werden. Diese könnten neben der Bildung von NO auch die Bildung von Nitrosoporphyrinkomplexen bewirken. Diese Konkurrenzreaktion inaktiviert zusätzlich den Katalysator. Die Freisetzung oxidierter Stickstoffspezies aus Ceftazidim verläuft zu einem größeren Anteil über die Bildung von Hydroxylamin. Dabei entstehen intermediär Nitroxylanionen, welche die Ausbeuten an NO, Nitrit und Nitrat durch Konkurrenzreaktionen vermindern könnten. Eine weitere Erklärung für die äußerst geringe NO-Freisetzung beider Antibiotika ist die mögliche Weiterreaktion von NO zu Nitrit und Nitrat und zu stickstoffhaltigen Nebenprodukten, die nicht mit dem NOA<sup>TM</sup> erfasst werden können. Dies sind insbesondere Distickstoffoxid, Stickstoff, Dimere des Substrats und Nitroalkane, wobei diese besonders bei niedrigen pH-Werten sehr stabil sind<sup>88</sup>. Die Werte der maximalen Ausbeute an oxidierten Stickstoffspezies für

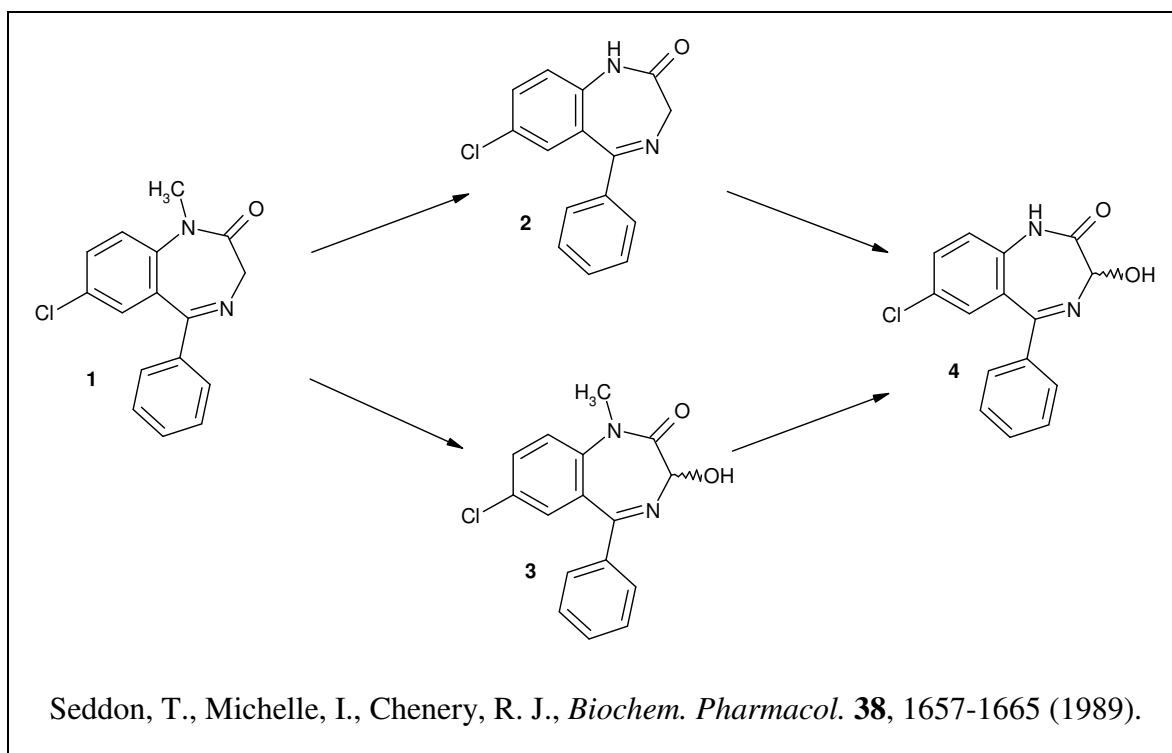
beide Antibiotika haben einen deutlichen Nachweis für die erfolgte Desalkylierung durch das biomimetische Modellsystem erbracht. Sie ließen aber keinen Rückschluss auf den prozentualen Anteil einer Desalkylierung zu, da nicht alle Nebenprodukte erfasst werden konnten.

Über einen ähnlichen Mechanismus der NO-Freisetzung im menschlichen Organismus ist bislang nichts bekannt. Der Metabolismus von Roxithromycin endet auf der Stufe des desalkylierten Oxims (Erythromycin-oxim), obwohl das Cytochrom P450-Enzymsystem durch die Einnahme von Roxithromycin und vieler anderer Antibiotika sogar induziert wird. Ceftazidim wird unverändert renal ausgeschieden.

## 6 Modellsysteme für Hydroxylierungen

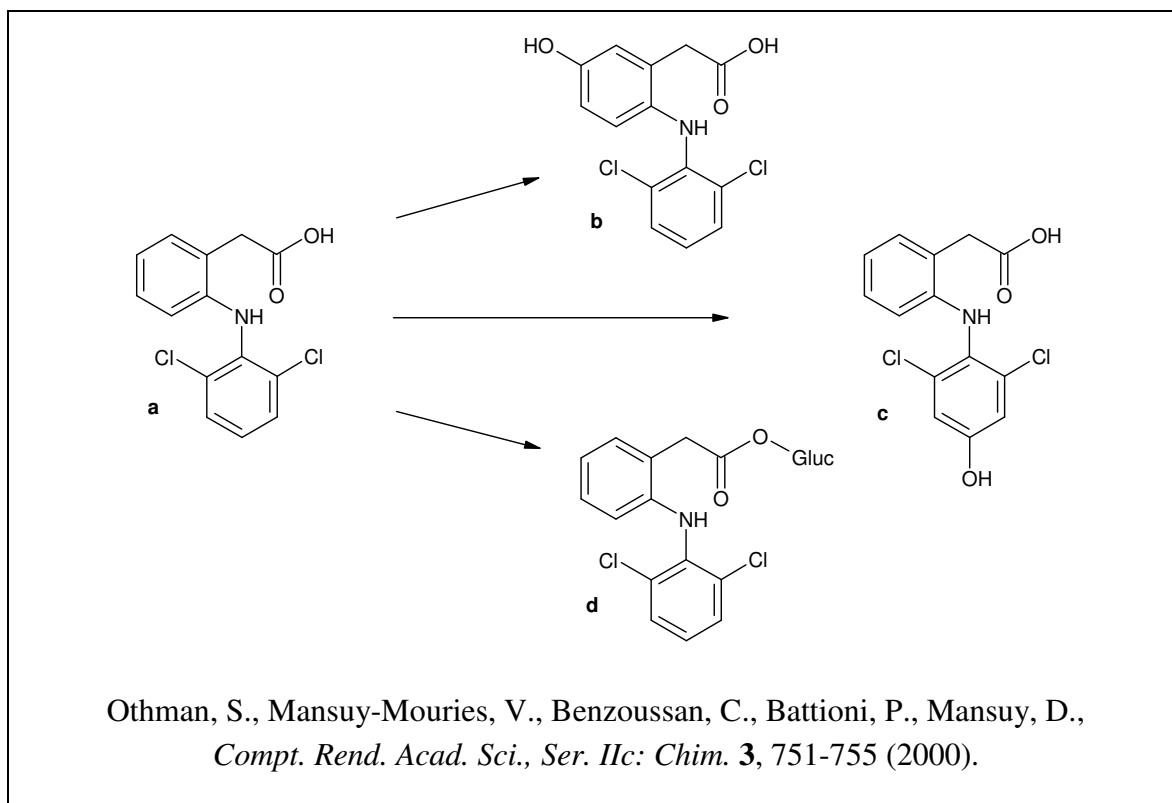
### 6.1 Einleitung und Literaturübersicht

Hydroxylierungen gehören zu den Phase I-Biotransformationsreaktionen und ermöglichen die Konjugationen mit anderen Biomolekülen in den Reaktionen der Phase II. *Seddon und Mitarbeiter*<sup>89</sup> beschrieben den Metabolismus von Diazepam (**1**) im menschlichen Organismus. Die Besonderheit in diesem speziellen Fall ist die pharmakologische Aktivität aller Phase I-Metaboliten. Durch Desmethylierung entsteht Nordiazepam (**2**), durch Hydroxylierung Temazepam (**3**) und aus beiden Reaktionen in Folge Oxazepam (**4**). Alle Metabolite wirken anxiolytisch und in höheren Dosen allgemein dämpfend, myotonolytisch, antikonvulsiv und narkotisch. Sie unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit, wodurch unterschiedliche Indikationen resultieren. Phase II-Reaktionen sind nicht beschrieben. Die Metabolite werden überwiegend renal ausgeschieden.

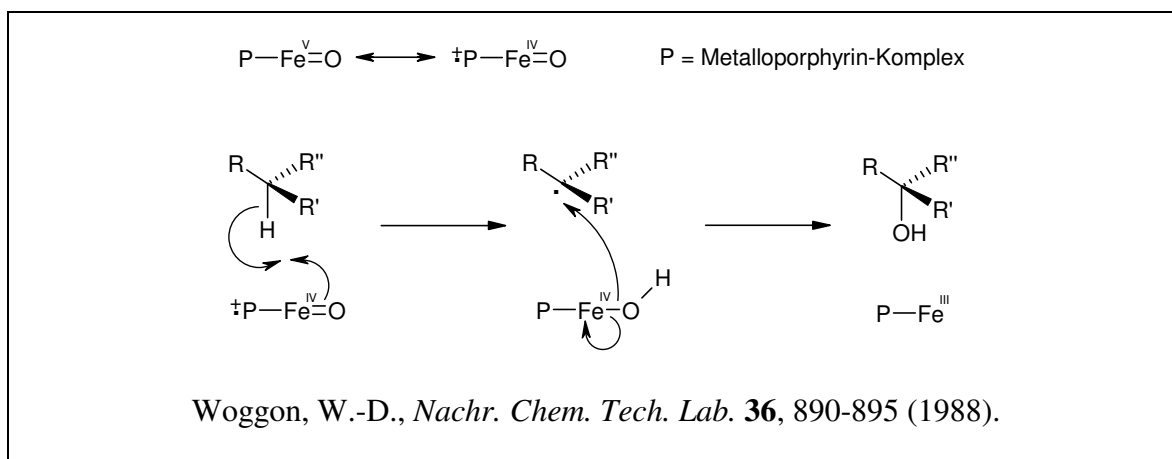


Ein weiteres Beispiel ist die Biotransformation von Diclofenac (**a**), die hauptsächlich auf Hydroxylierungen mit anschließender Glucuronidierung beruht. Die Hauptmetaboliten sind das 5-Hydroxydiclofenac (**b**) und das

4'-Hydroxydiclofenac (**c**). Diese werden bereits nach der ersten Leberpassage gebildet. Nur in geringem Umfang findet eine Konjugation mit Glucuronsäure an der Carboxylgruppe (**d**) statt. Die Metabolite werden renal und biliär ausgeschieden.



*Othmann und Mitarbeiter*<sup>90</sup> konnten die beiden hydroxylierten Hauptmetaboliten mit Hilfe von biomimetischen Modellsystemen herstellen. Für die Hydroxylierung in der 5-Position, welche die Position mit der höchsten Reaktivität im Aromaten darstellt, diente ein Modellsystem mit FeTDCPPCl und Wasserstoffperoxid bzw. *tert*-Butylperoxid in einem Gemisch aus Acetonitril, Wasser und Dichlormethan. Der zweite Metabolit konnte nach Umsetzung des Diclofenacs mit Hilfe einer rekombinanten Hefe, die das humane Isoenzym Cytochrom P450 2C9 exprimiert, erhalten werden. Die Insertion des Sauerstoffs in eine C-H-Bindung findet mit großer Wahrscheinlichkeit nicht konzertiert statt, sondern über eine radikalische Wasserstoffatom-Abstraktion und anschließende Radikalrekombination. Versuche an Steroiden und azyklischen Verbindungen zeigten, dass diese Hydroxylierungen stereo- und regiospezifisch ablaufen<sup>91, 92</sup>.



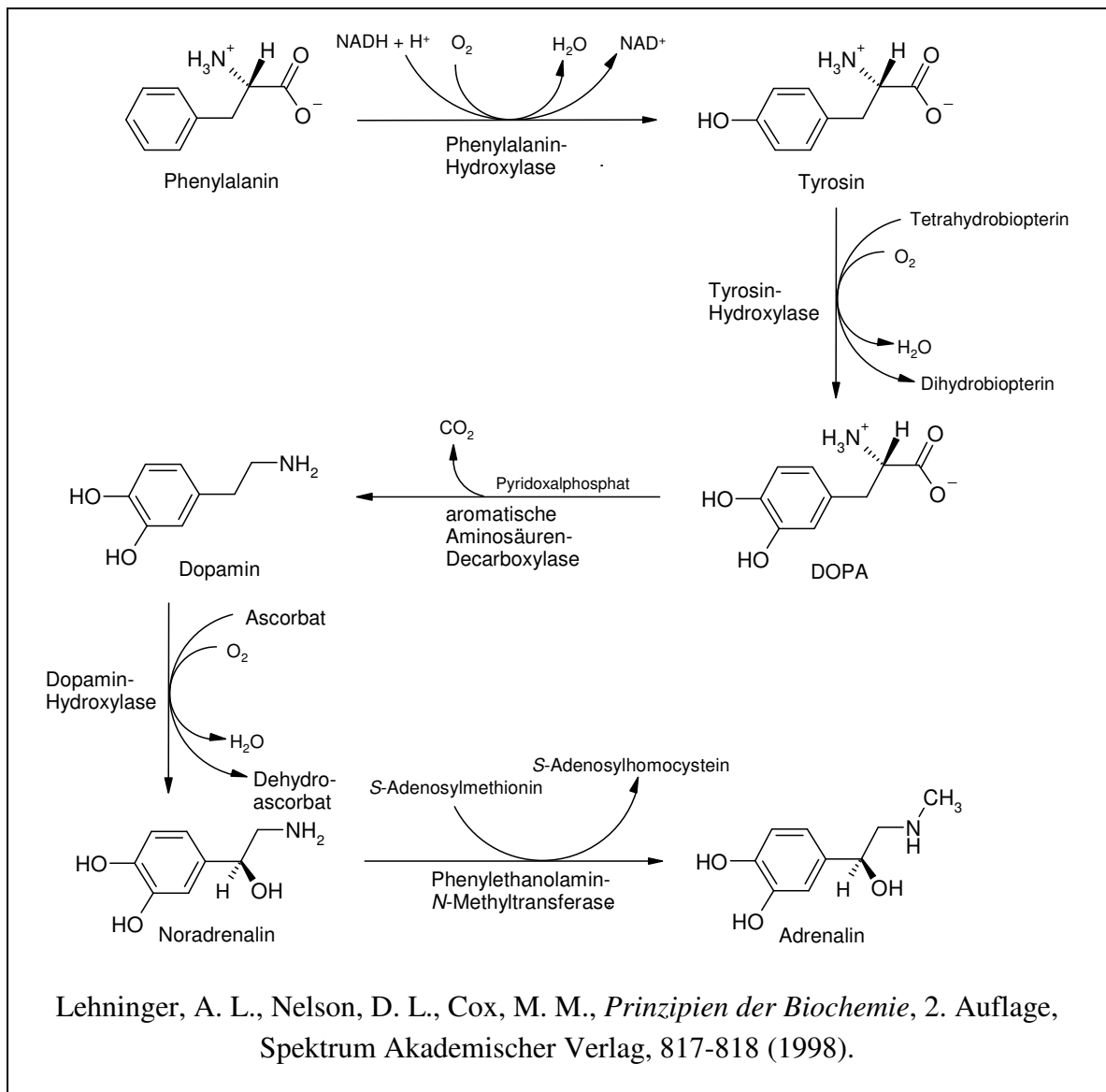
Die im Rahmen dieser Arbeit optimierten Modellsysteme und Methoden lieferten in verschiedenen Reaktionen gute Resultate. Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss der Modellsysteme auf Hydroxylierungen untersucht.

## 6.2 Phenylalanin

Die Umsetzung von Phenylalanin zu Tyrosin und DOPA mit FeT4MPyPCl und Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von *Shimidzu und Mitarbeitern*<sup>10</sup> durchgeführt. Anhand dieses Substrats sollte untersucht werden, wie die optimierten Modellsysteme und ein Einsatz der Synthesemikrowelle diese Reaktion beeinflussen.

### 6.2.1 Pharmakologische Eigenschaften

Phenylalanin muss dem Organismus als essentielle Aminosäure durch die Nahrung zugeführt werden. Durch enzymatische Hydroxylierungen entstehen daraus sowohl Tyrosin als auch DOPA. Im weiteren Verlauf werden durch Decarboxylierung Dopamin, nach anschließender Hydroxylierung Noradrenalin und letztendlich durch Methylierung Adrenalin gebildet<sup>93</sup>.



Der Neurotransmitter Dopamin hat einen entscheidenden Einfluss bei der Genese des Morbus Parkinson. Ein durch Degeneration dopaminerger Neurone resultierendes Ungleichgewicht zwischen Dopamin und Acetylcholin verursacht im weiteren Krankheitsverlauf starke motorische Störungen. Dopamin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Daher wird die physiologische Vorstufe DOPA zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt, die als Aminosäure über den Aminosäure-Transportmechanismus aus dem Blut in den Liquor gelangen kann. Die für die Bildung von Dopamin notwendige Decarboxylase ist im Organismus ubiquitär vorhanden. Für einen therapeutischen Effekt müssen allerdings im Verhältnis zur benötigten Menge Dopamin sehr hohe Dosen an DOPA oder eine Kombination aus DOPA und DOPA-Decarboxylasehemmstoffen verabreicht werden.

## 6.2.2 Analytik

Für die Analytik von Phenylalanin, Tyrosin und DOPA wurde eine HPLC-Methode aus der Applikationsdatenbank der VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die drei Analyten wurden auf einer RP-18 Säule mit einem Elutionsmittelgemisch aus 20 mM Kaliumdi-hydrogenphosphatlösung pH 4,3 und Methanol getrennt und konnten bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert werden. Für eine noch stärkere Trennleistung wurde in dieser Arbeit eine längere Säule verwendet. Daher mussten das Verhältnis des Elutionsmittelgemisches und die Flussrate angeglichen werden. Die Retentionszeit für DOPA betrug 4,5 Minuten, für Tyrosin 6,1 Minuten und für Phenylalanin 13,2 Minuten. Für die Identifizierung von Tyrosin und DOPA standen Referenzsubstanzen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung.

## 6.2.3 Umsetzung von Phenylalanin

*Shimidzu und Mitarbeiter*<sup>10</sup> führten die Umsetzung von Phenylalanin mit einem molaren Ansatzverhältnis von Metalloporphyrin zu Substrat zu Sauerstoffdonator von 1:10:30 in einem neutralen nicht gepufferten Lösungsmittel durch. Sie setzten das kationische FeT4MPyP<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> und als Sauerstoffdonator Wasserstoffperoxid ein. Dabei wurden nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten 45 % Tyrosin und 10 % DOPA gewonnen. Des Weiteren beschrieben sie eine totale Zerstörung des Metalloporphyrins bei Einsatz von 50 Teilen Wasserstoffperoxid und ein Ausbleiben der Reaktion bei Einsatz von nur 10 Teilen. Unter Einhaltung der von *Shimidzu und Mitarbeitern* angegebenen Parameter wurde dieser Versuch wiederholt. Es konnte unter diesen Bedingungen nur die vollständige Zerstörung des Metalloporphyrins unter Ausbleiben der Reaktion beobachtet werden. Durch Reduzieren des Anteils an Wasserstoffperoxid auf 20 Teile blieb das Metalloporphyrin erhalten. Die quantitative Analyse dieser Ansätze zeigte, dass weniger als 0,1 % Tyrosin und DOPA entstanden waren. Da Iodosobenzol und *m*-Chlorperoxybenzoesäure als sehr potente Sauerstoffdonatoren jeweils im Chromatogramm die Peaks der Produkte überlagerten, schieden diese für die mit der in dieser Arbeit beschriebenen Analytik quantifizierten Ansätze aus. Bei Zusatz von lediglich 5-10 Teilen Iodosobenzol war zwar



eine basisliniengetrennte Analytik der Produkte möglich, aber durch den nach Zugabe der ethanolischen Iodosobenzol-Stammlösung ansteigenden Anteil an Ethanol im Lösungsmittel fiel Phenylalanin aus. Von *Iida und Mitarbeitern*<sup>94</sup> wurde der Einsatz von Imidazol als zusätzlicher Ligand am Metalloporphyrin-Komplex beschrieben. Im optimalen Ansatzverhältnis sollte Imidazol mindestens im 50fachen Überschuss zum Metalloporphyrin eingesetzt werden. In den beschriebenen Versuchen an Lipid-Doppelschichten für Modelle membrangebundener Enzyme wurde MnTFPPCl als Metalloporphyrin verwendet. Es wurde ein molares Ansatzverhältnis MnTFPPCl zu Phenylalanin zu Wasserstoffperoxid zu Imidazol von 1:20:1880:160 eingesetzt. Diese Angaben dienen als Vorschrift für die Umsetzung von Phenylalanin. Als Lösungsmittel wurden entweder ein Phosphatpuffer bei pH 7,4 oder aufgrund der höheren Stabilität von Wasserstoffperoxid bei niedrigen pH-Werten 0,1 M Salzsäure verwendet. Des Weiteren wurde analog der Vorschrift AAV 12 eine Umsetzung mit dem Ansatzverhältnis von Metalloporphyrin zu Substrat zu Sauerstoffdonator zu Imidazol von 1:10:500:100 durchgeführt (AAV 14). Die Umsetzungen erfolgten entweder innerhalb von 60 Minuten durch Schütteln bei Raumtemperatur oder innerhalb von 20 Minuten bei 25 °C unter Trockeneiskühlung in der Synthesemikrowelle (25 W).

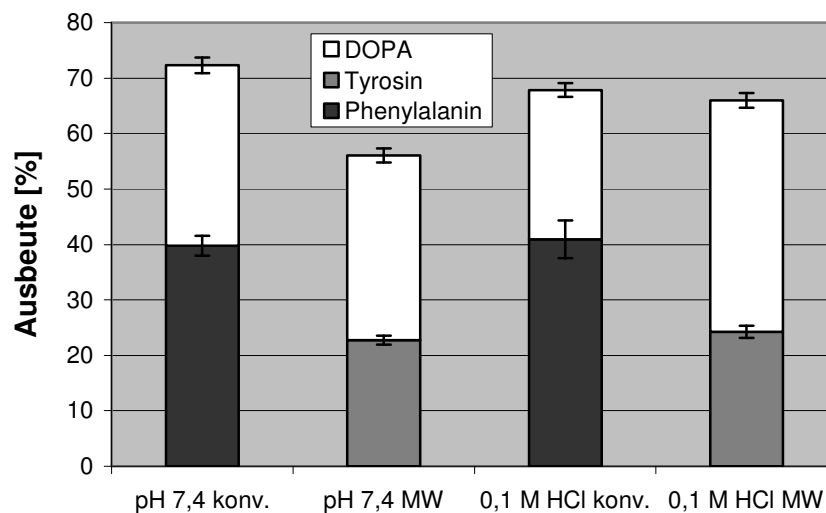


Abbildung 6-1 Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid nach AAV 13 mit der konventionellen Methode (konv.) oder in der Synthesemikrowelle (MW); als Lösungsmittel wurden ein Phosphatpuffer pH 7,4 oder 0,1 M HCl verwendet

In Abbildung 6-1 sind die Ergebnisse der Umsetzung nach AAV 13 dargestellt worden. Zunächst fällt auf, dass nach der Umsetzung mit der konventionellen Methode sowohl bei pH 7,4 als auch bei niedrigem pH-Wert kein Tyrosin detektiert werden konnte. Es erfolgte eine sofortige Hydroxylierung zu DOPA. Bei der Umsetzung in der Synthesemikrowelle wurde das gesamte Edukt umgesetzt, und es konnten Tyrosin und DOPA als Produkte identifiziert werden. Die Ausbeute an DOPA war auch nach einer längeren Reaktionszeit in der Synthesemikrowelle nicht mehr zu steigern, was auf einen vollständigen Verbrauch oder eine Zersetzung des Sauerstoffdonators schließen ließ. Die Reaktion in 0,1 M Salzsäure als Lösungsmittel zeigte nach der konventionellen Methode keinen Vorteil gegenüber dem 50 mM Phosphatpuffer. Bei der Reaktion in der Synthesemikrowelle waren dagegen die Ausbeuten an Tyrosin und DOPA bei niedrigem pH-Wert höher. Dies konnte zum einen an der höheren Stabilität von Wasserstoffperoxid im Sauren liegen, wahrscheinlicher ist aber der Einfluss der Ionen in den Lösungen. Durch die höhere Molarität der Salzsäure kann es während der Reaktion in der Synthesemikrowelle zu häufigeren Zusammenstößen der Teilchen im Lösungsmittel kommen und somit zu einer höheren Reaktivität. Bei der Umsetzung in der Synthesemikrowelle kam es nachweislich zu häufigeren Nebenreaktionen als nach der konventionellen Methode, da die Summe der Analyten nur Werte zwischen 55 und 65 % ergab (Abbildung 6-1). Nebenreaktionen wurden in der Literatur bereits beschrieben und in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt<sup>10, 94</sup>.

In Abbildung 6-2 sind die Ergebnisse der Umsetzung nach AAV 14 gezeigt.

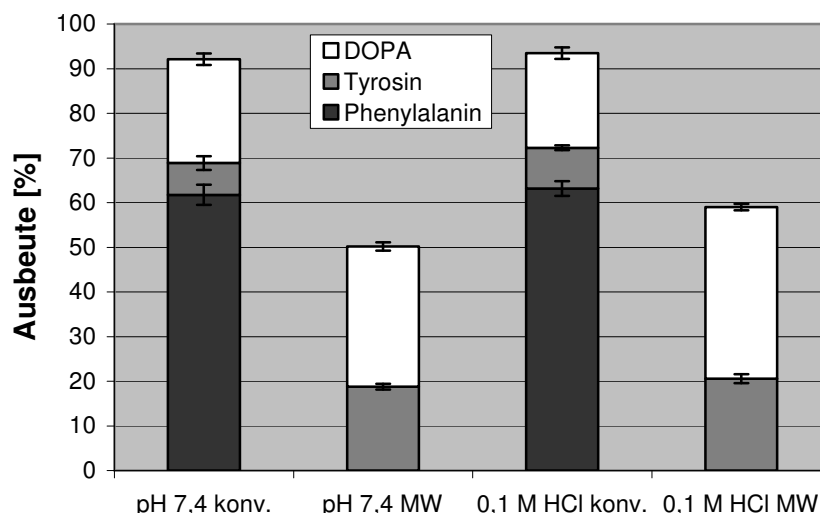


Abbildung 6-2 Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid nach AAV 14 mit der konventionellen Methode (konv.) oder in der Synthesemikrowelle (MW); als Lösungsmittel wurden ein Phosphatpuffer pH 7,4 oder 0,1 M HCl verwendet

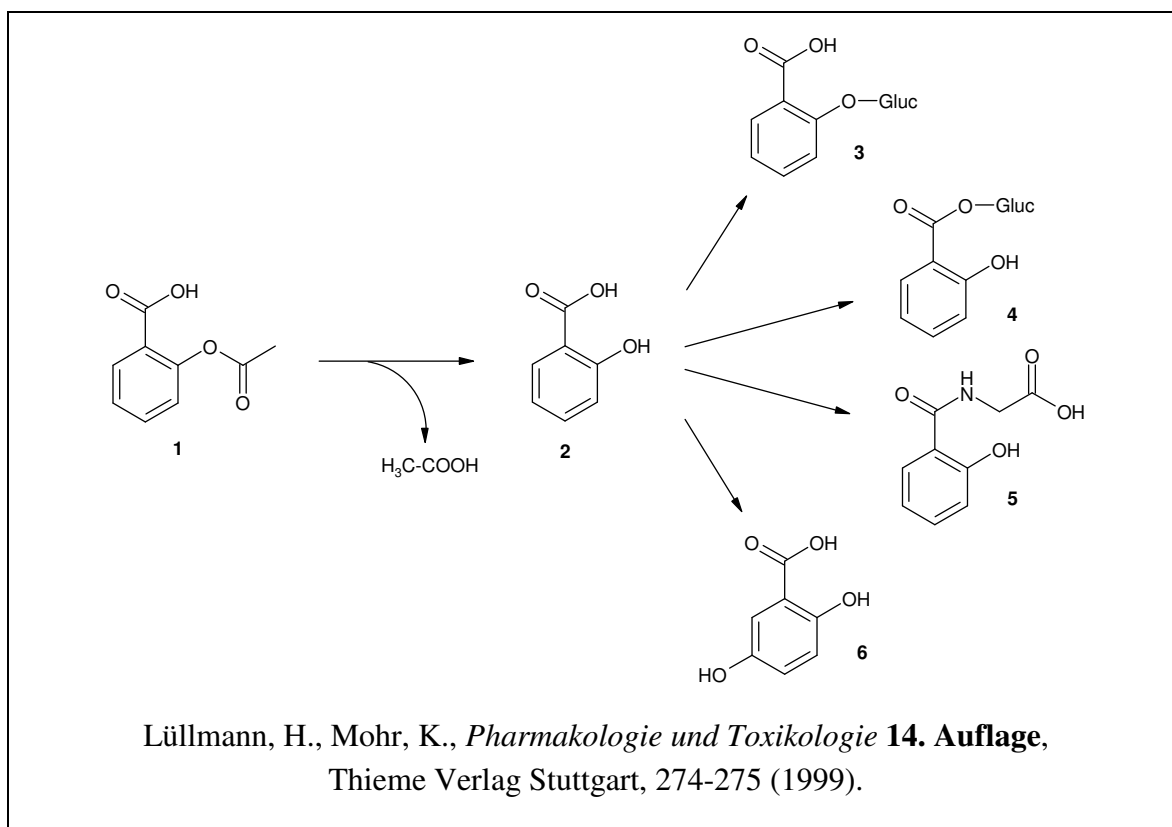
Auch bei den Reaktionen mit der konventionellen Methode war Tyrosin detektierbar. Die deutlich geringere Menge an Sauerstoffdonator in diesen Reaktionsansätzen reichte nicht aus, um entstandenes Tyrosin vollständig zu DOPA zu hydroxylieren. Durch eine Veränderung der Menge des Sauerstoffdonators war es demnach möglich, gezielt bestimmte Produkte entstehen zu lassen. Die Menge an Produkten ist gegenüber den Reaktionen nach AAV 13 reduziert. Die Möglichkeit, eine größere Menge an Sauerstoffdonator als bei AAV 13 einzusetzen, um noch höhere Ausbeuten an Produkten zu erhalten, bestand nicht, da selbst das perfluorierte MnTFPPCl dann oxidativ zerstört wurde. Die Summe der Analyten war bei der Umsetzung nach AAV 14 eindeutig größer. Dies könnte durch weniger Nebenreaktionen aufgrund einer geringeren zur Verfügung stehenden Menge an Sauerstoffdonator verursacht worden sein. Eine oxidative Zerstörung der Analyten bei der Umsetzung nach AAV 13 durch eine sehr große Menge an Sauerstoffdonator war aber auch nicht auszuschließen.

## 6.3 Acetylsalicylsäure und Salicylsäure

### 6.3.1 Pharmakologische Eigenschaften

Salicylsäure wurde ursprünglich aus der Weide *Salix alba* L. gewonnen und zur Analgesie eingesetzt. Heute wird sie aufgrund ihrer äußerst schlechten oralen Verträglichkeit hauptsächlich topisch als Keratolytikum eingesetzt. Das Salicylsäurederivat Acetylsalicylsäure ist ein Nicht-steroidales Antirheumatikum mit analgetischer und antiphlogistischer Wirkung. Des Weiteren kommt es durch eine irreversible Acetylierung der Cyclooxygenase zu einer Hemmung der Synthese von Entzündungsmediatoren und Thromboxan A<sub>2</sub> in Blutplättchen. Diese Wirkung der Thrombozytenaggregationshemmung wird bereits durch die orale Gabe geringer Dosen erreicht.

Acetylsalicylsäure (**1**) wird im Organismus schnell hydrolysiert, so dass Salicylsäure (**2**) als Hauptmetabolit im Plasma nachweisbar ist. Diese wird in der Leber durch Biotransformationsreaktionen der Phase II an Glucuronsäure (**3** und **4**) und Glycin (**5**) konjugiert und zu einem geringen Teil Cytochrom P450-abhängig zu Gentisinsäure (**6**, 2,5-Dihydroxybenzoesäure) oxidiert<sup>1</sup>.



### 6.3.2 Analytik

Für die Analytik von Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und den resultierenden hydroxylierten Produkten 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHBA), 2,4-DHBA, 2,5-DHBA und 2,6-DHBA bot sich eine kapillarelektrophoretische Methode an, bei der die Auftrennung der in einem alkalischen Hintergrundelektrolyten negativ geladenen Ionen auf deren unterschiedlichen Wanderungsverhalten im elektrischen Feld beruht. Mit der erarbeiteten Methode waren eine deutliche Auftrennung und eine in Anbetracht der vielen Substanzen kurze Analysenzeit möglich. Es konnten ebenfalls 3,4-DHBA und 3,5-DHBA detektiert werden. In Abbildung 6-3 ist ein Elektropherogramm eines Gemischs der Referenzsubstanzen der oben angeführten Analyten abgebildet.

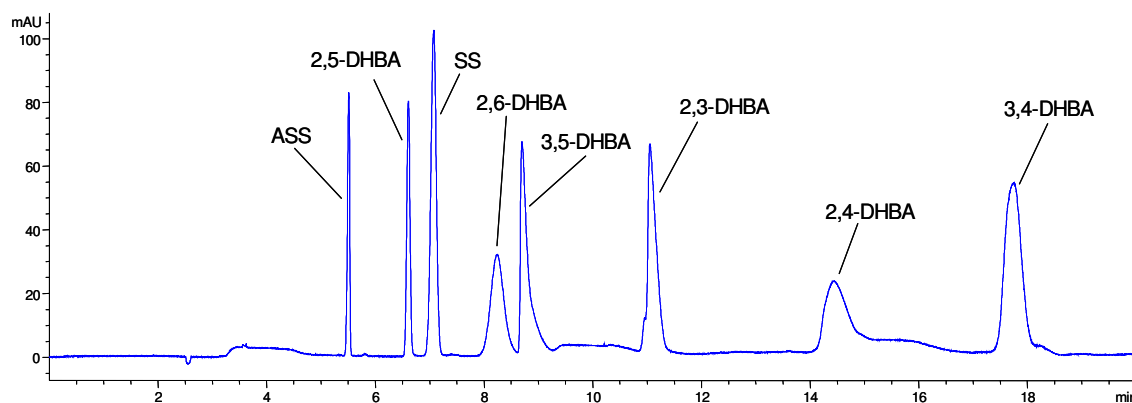


Abbildung 6-3 Elektropherogramm der Trennung von Acetylsalicylsäure (ASS), Salicylsäure (SS), 2,3-DHBA, 2,4-DHBA, 2,5-DHBA, 2,6-DHBA, 3,4-DHBA und 3,5-DHBA

### 6.3.3 Umsetzung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure

Die Umsetzung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure zu den hydroxylierten Produkten 2,3-DHBA, 2,4-DHBA, 2,5-DHBA, 2,6-DHBA gelang weder nach der konventionellen Methode, noch unter Einsatz der Synthesemikrowelle mit den beschriebenen Vorschriften (AAV 10-14, Abschnitt 9.3.1 und 9.5.1).

## 6.4 Abschließende Betrachtung

Anhand der Methoden zur Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin und DOPA konnte gezeigt werden, dass durch Variationen im Ansatzverhältnis das Produktverhältnis deutlich beeinflusst werden konnte. So wurde nach der konventionellen Methode Tyrosin nur durch Verringerung des Anteils an Sauerstoffdonator erhalten. Die Auswahl des optimalen Sauerstoffdonators war durch seine physikochemischen Eigenschaften eingeschränkt. Eine geringe Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln und ein Überlagern der Produkte in den Chromatogrammen erlaubten nur eine Umsetzung mit Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator. Der Einsatz der Synthesemikrowelle erwies sich als hilfreich, um größere Mengen an Produkten zu erhalten. Es konnte so eine vollständige Umsetzung des Edukts erreicht werden. Allerdings wurden Nebenreaktionen bzw. eine mögliche oxidative Zerstörung der Analyten gefördert.

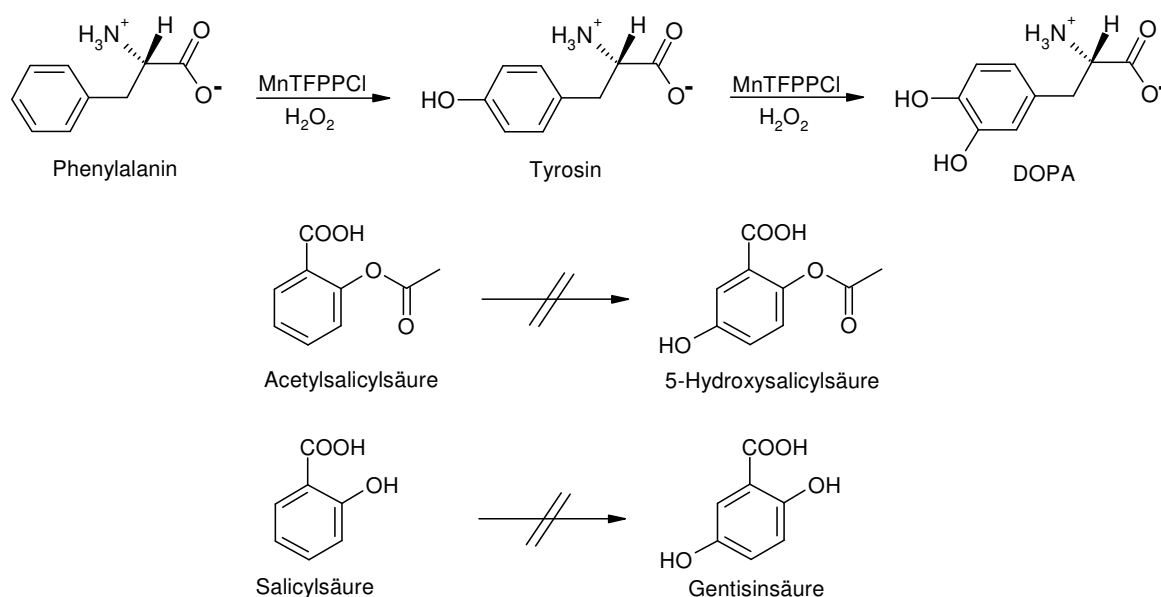
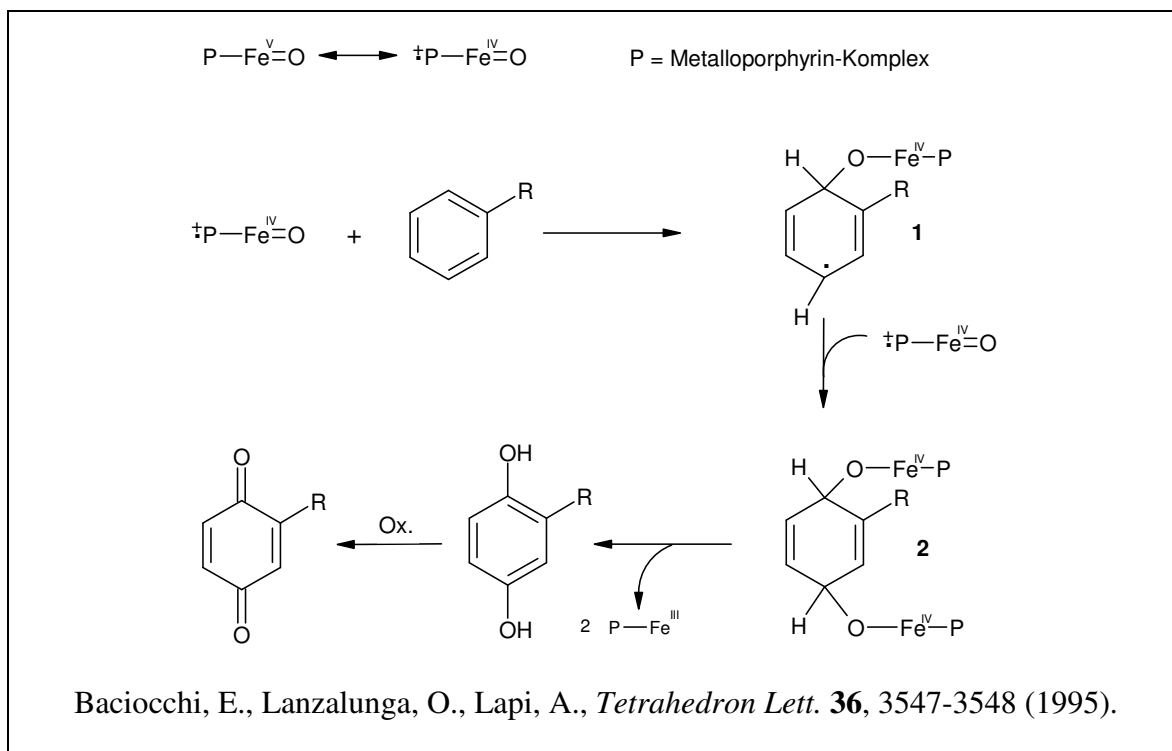


Abbildung 6-4 Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte biomimetische Hydroxylierungen mit MnTFPPCl und Wasserstoffperoxid

Die Umsetzung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure gelang mit den beschriebenen biomimetischen Modellsystemen nicht. *Baciacchi und Mitarbeiter*<sup>40</sup> beschrieben die Dihydroxylierung von aromatischen Substraten, bei denen keine phenolischen Intermediate gebildet wurden. Sie postulierten einen Mechanismus, bei dem zunächst der aktive Eisen-Oxo-Komplex das aromatische Substrat unter Ausbildung eines 1,4-Cyclohexadienyl-

radikals (**1**) angreift, welches durch einen erneuten Angriff eines Eisen-Oxo-Komplexes zum Cyclohexadien (**2**) reagiert. Im Folgenden entsteht das Hydrochinon als Intermediat, welches in Anwesenheit des biomimetischen Modellsystems zum 1,4-Benzochinon oxidiert wird.



Im Fall der Salicylsäure ist die *ortho*-Position zur Carboxylgruppe bereits mit einer phenolischen Hydroxylgruppe besetzt. Die *para*-Position zur Hydroxylgruppe ist für einen Angriff des aktivierten Eisen-Oxo-Komplexes durch den positiven Mesomerie-Effekt der Hydroxylgruppe nicht zugänglich, und es kann nach dem von *Baciocchi und Mitarbeitern* beschriebenen Mechanismus kein radikalischer Übergangszustand zur Begünstigung einer Anlagerung des Eisen-Oxo-Komplexes formuliert werden. Der Carbonsäureester der Acetylsalicylsäure scheint durch einen negativen induktiven Effekt ebenfalls keine *para*-Hydroxylierung zuzulassen. Die Art und die entsprechenden Eigenschaften der Substituenten am Aromaten haben folglich einen starken Einfluss auf die Möglichkeit der Hydroxylierung.

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ersichtlich, dass kein optimales biomimetisches Modellsystem für alle eingesetzten Substrate existiert. Die Art der Reaktion, die Eigenschaften der Edukte und

die Konstitution der entstandenen Produkte bestimmten die Wahl des Metalloporphyrins, des Sauerstoffdonators, des Reaktionsmediums und der Umsetzungsmethode.

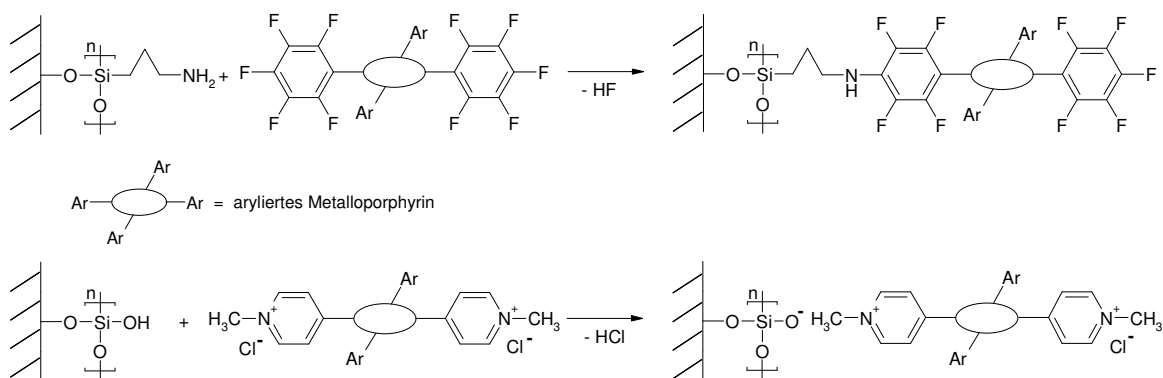


## 7 Zusammenfassung

Biomimetische Modellsysteme für Monooxygenierungen stellen chemisch katalysierte Analogsysteme für Cytochrom P450-abhängige Biotransformationsreaktionen dar. Diese können als Ergänzungs- oder Komplementärmethoden zu Tiermodellen in Biotransformationsstudien für die Arzneistoffzulassung dienen. Des Weiteren können Informationen über Reaktivität und Stabilität von Arzneistoffen gegenüber oxidativen Angriffen gewonnen werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Optimierung von biomimetischen Modellsystemen durch Steigerung der Effizienz der als Katalysatoren verwendeten Metalloporphyrine, sowie die Entwicklung von Methoden für die Umsetzung verschiedener Substrate. Hierbei wurden biomimetische Epoxidierungen, Desalkylierungen und Hydroxylierungen untersucht.

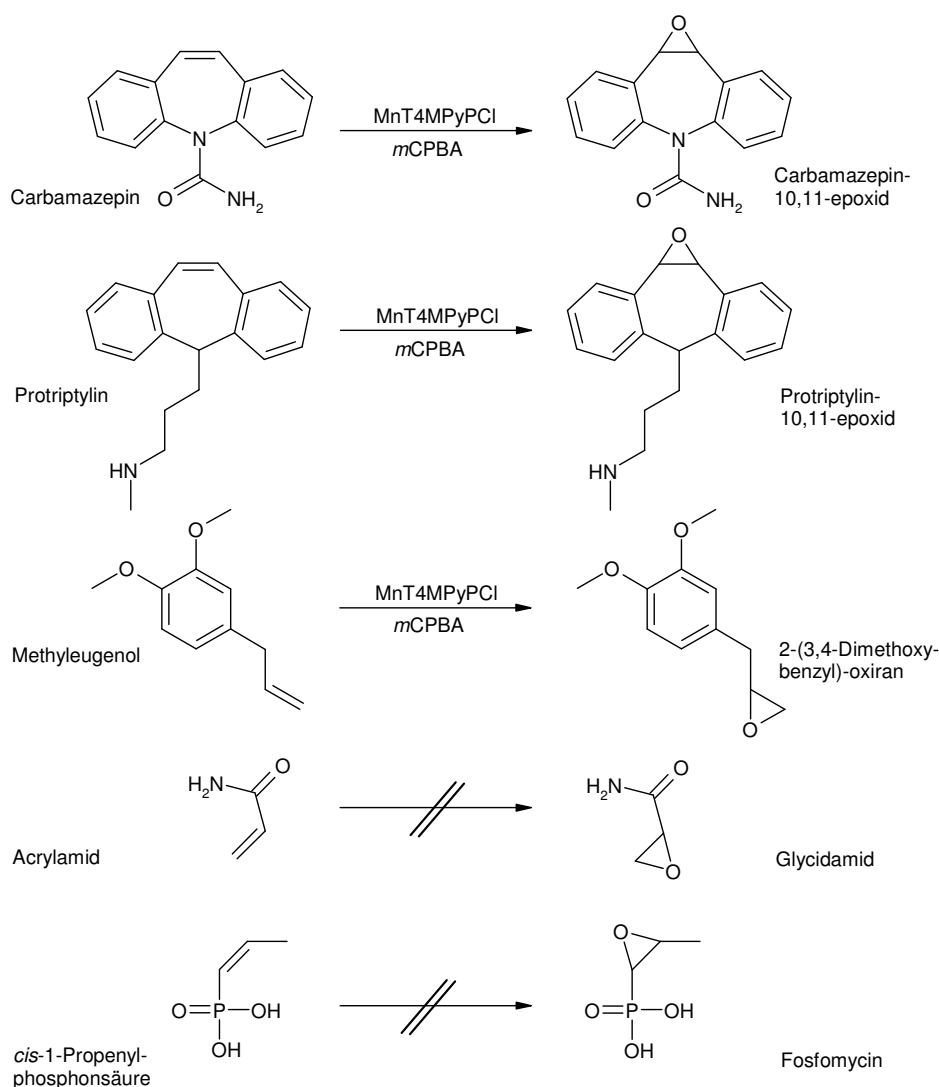
Die verwendeten Metalloporphyrine wurden aufgrund der hohen Löslichkeit in polaren und apolaren Lösungsmitteln an verschiedene Kieselgele gebunden (Schema 7-1), um darüber hinaus ein erleichtertes Abtrennen aus dem Reaktionsansatz und erneutes Verwenden sowie eine höhere Stabilität und Belastbarkeit unter oxidativen Bedingungen zu erreichen. Die Immobilisierung sollte eine hohe verbleibende Aktivität der Katalysatoren gewährleisten. Für die Immobilisierungen wurde in dieser Arbeit erstmals eine Methode unter Einsatz der Synthesemikrowelle etabliert, mit der eine deutlich höhere Bindung der Metalloporphyrine am Trägermaterial erreicht werden konnte als mit der konventionellen Methode.



Schema 7-1 Immobilisierung von Metalloporphyrinen an verschiedenen Kieselgelträgern

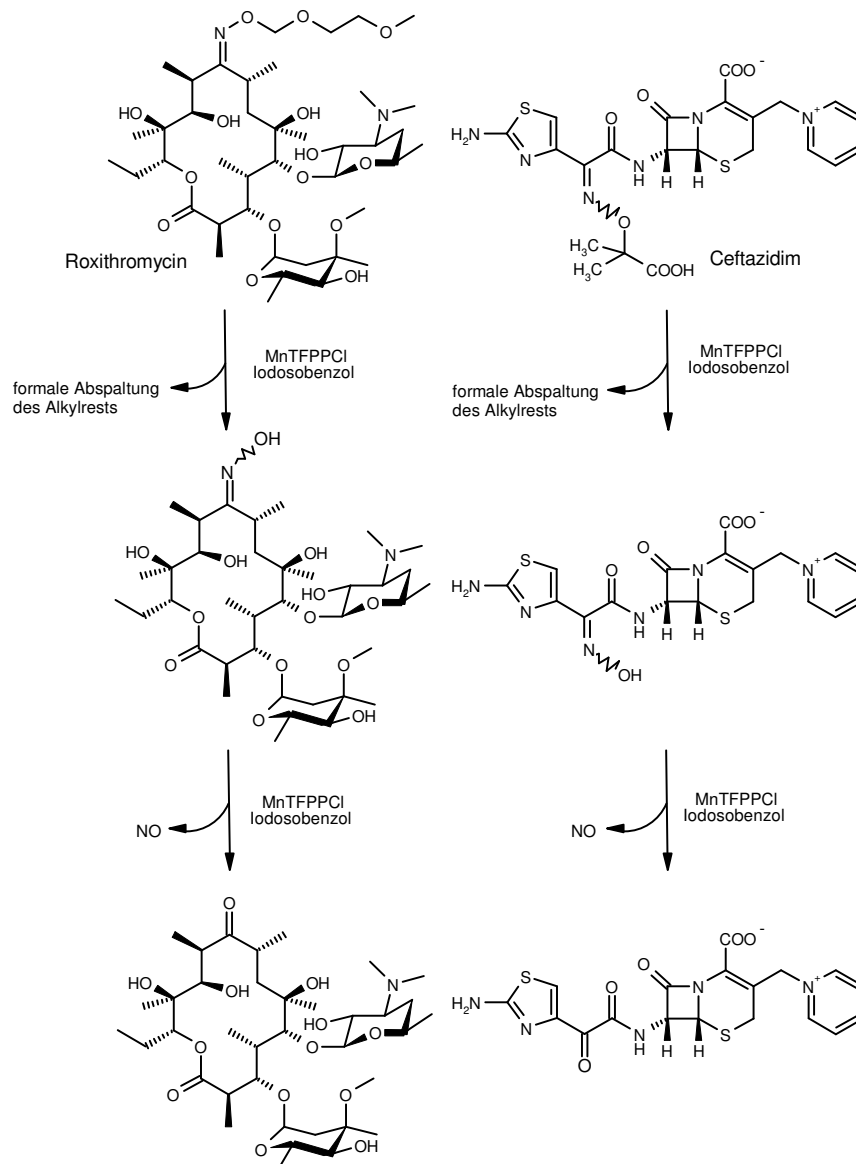
Ferner wurden Methoden zur Quantifizierung der Belegung am Trägermaterial und zur Bestimmung der Restaktivität der immobilisierten Metalloporphyrine entwickelt.

Für die biomimetischen Epoxidierungen verschiedener Substrate (Schema 7-2) wurde zunächst am Beispiel des Carbamazepins ein optimales Modellsystem entwickelt. Das Modellsystem, bestehend aus dem Metalloporphyrin MnT4MPyPCI und dem Sauerstoffdonator *m*-Chlorperoxybenzoesäure, erbrachte die höchsten Ausbeuten an Epoxiden. Die Umsetzung dieser Reaktionen in der Synthesemikrowelle konnte die Ausbeuten bei geringeren Standardabweichungen noch steigern.



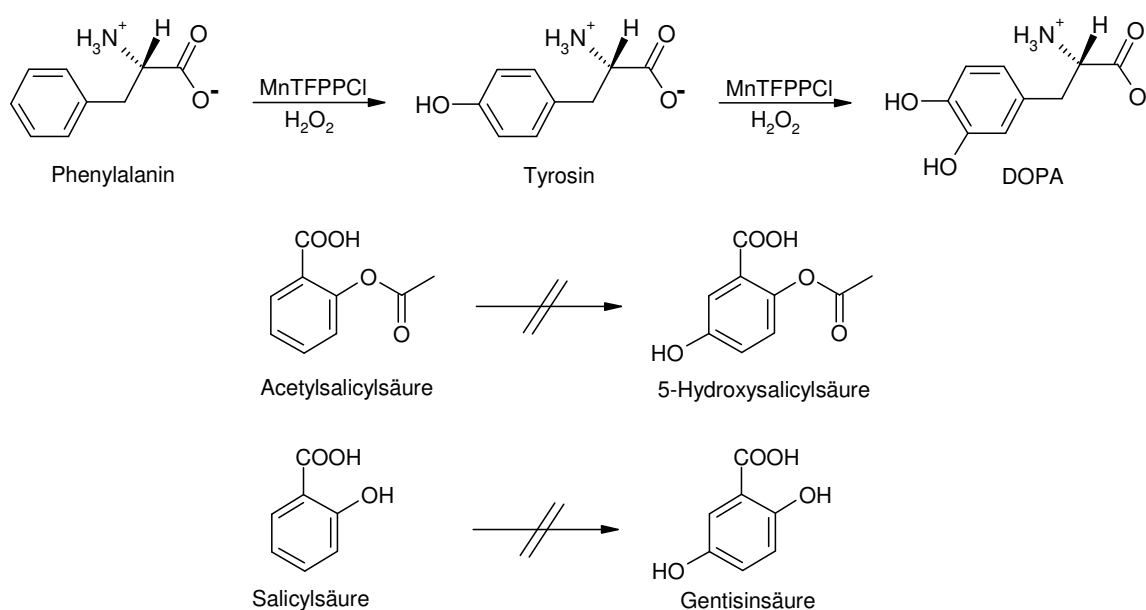
Schema 7-2 Biomimetische Epoxidierungen mit MnT4MPyPCI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure

In dieser Arbeit werden erstmals Desalkylierungen von Oximetherstrukturen mit längeren Alkylresten durch die verwendeten biomimetischen Modellsysteme beschrieben und deren Mechanismen vorgeschlagen. Als Substrate dienten die Antibiotika Roxithromycin und Ceftazidim (Schema 7-3). Die erfolgreich verlaufende Reaktion wurde durch eine Freisetzung von oxidierten Stickstoffspezies aus dem desalkylierten Oxim bestimmt. Das für diese Reaktion gewählte Modellsystem aus MnTFPPCl und Iodosobenzol wurde durch die NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff bestimmt.



Schema 7-3 Desalkylierungen der Oximetherstrukturen von Roxithromycin und Ceftazidim mit MnTFPPCl und Iodosobenzol

Die durchgeführten Untersuchungen der biomimetischen Hydroxylierungen (Schema 7-4) zeigten einen starken Einfluss des molaren Ansatzverhältnisses von Sauerstoffdonator zu Substrat und der Wahl der Methode (konventionell oder mit der Synthesemikrowelle) auf die Produktbildung und Ausbeute. Lediglich durch Reduktion der Menge des Sauerstoffdonators bei der konventionellen Umsetzung von Phenylalanin konnte Tyrosin als Zwischenprodukt erhalten werden. Bei höheren Konzentrationen erfolgte eine sofortige Hydroxylierung des Tyrosins zu DOPA. Durch den Einsatz der Synthesemikrowelle wurde eine vollständige Umsetzung des Edukts unter Bildung von Tyrosin und DOPA im Verhältnis 1:2 erreicht.



Schema 7-4 Biomimetische Hydroxylierungen mit  $\text{MnTFPPCl}$  und Wasserstoffperoxid

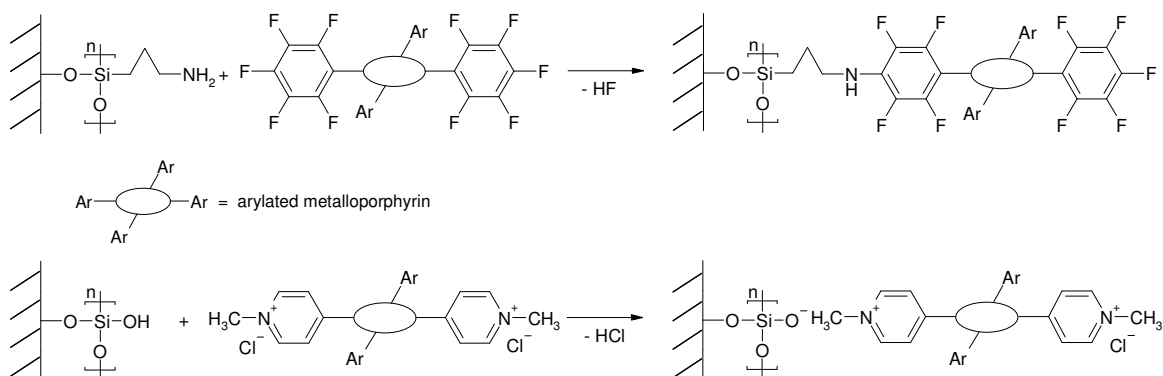
Die erwünschte Epoxidierung von Acrylamid und *cis*-1-Propenylphosphonsäure sowie die Hydroxylierung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure erbrachten mit den im Rahmen dieser Arbeit optimierten biomimetischen Modellsystemen keine Produkte. Das Ausbleiben dieser Reaktionen wurde diskutiert.

## 8 Summary

Biomimetic model systems for monooxygenation reactions represent chemically catalyzed analogous systems of cytochrom P450-dependent biotransformation reactions. These systems allow biotransformation studies in drug admission proceedings complementary to animal experiments. In addition, it is possible to gain information about reactivity and stability of drugs against oxidative attacks.

This thesis focuses on the optimization of biomimetic model systems by increasing the efficiency of the metalloporphyrins which are used as chemical catalysts, and on the development of methods for the conversion of different substrates. In this context biomimetic epoxidations, dealkylations and hydroxylations have been investigated.

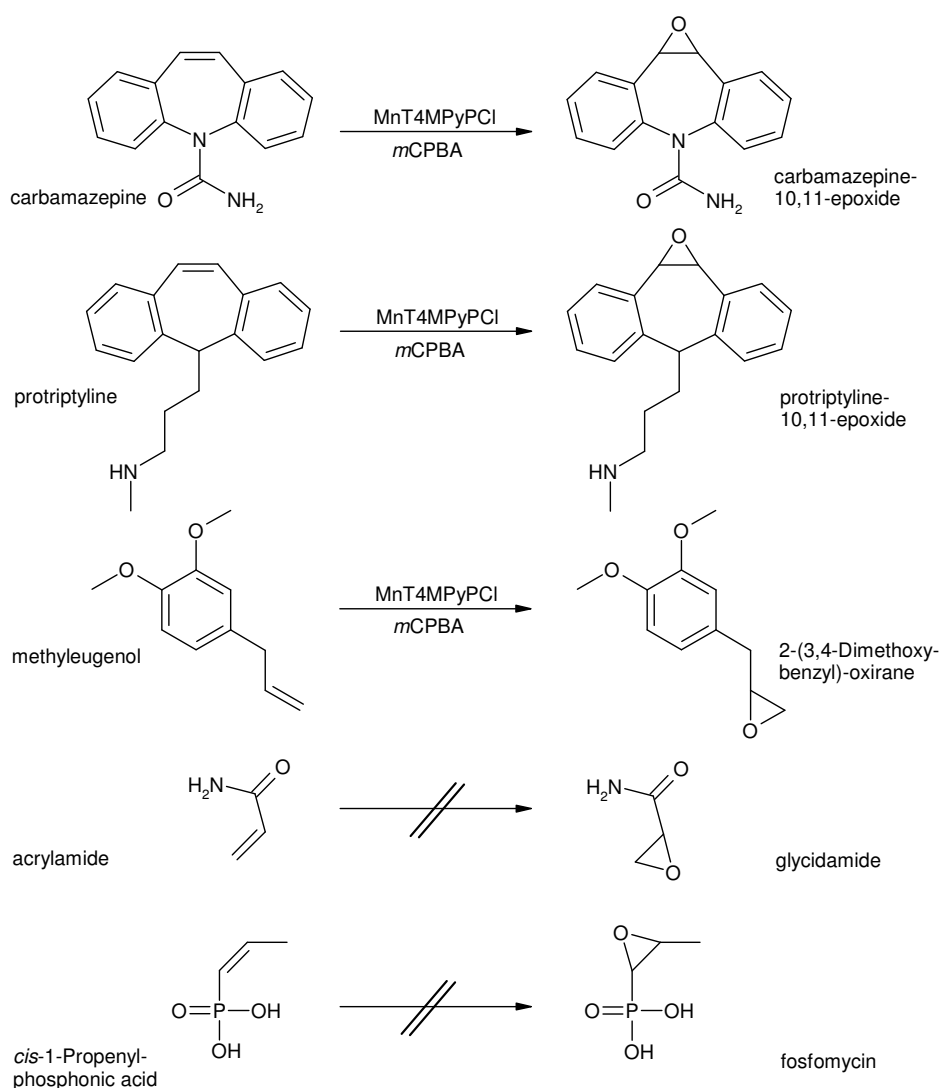
Due to their high solubility in polar and apolar solvents, the metalloporphyrins used in this work were supported on different carrier materials (Scheme 8-1). By the use of this technique removal of the metalloporphyrins from the reaction mixture was facilitated and reutilization of them was possible. Immobilization also led to higher stability and resilience under oxidative conditions. In addition, it should assure high remaining catalytic activity of the metalloporphyrin. For the immobilization reactions a microwave assisted method was established in this work for the first time. Compared to the conventional method, a significant higher binding of metalloporphyrins on carrier material was achieved.



Scheme 8-1 Immobilization of metalloporphyrins on different silica gels

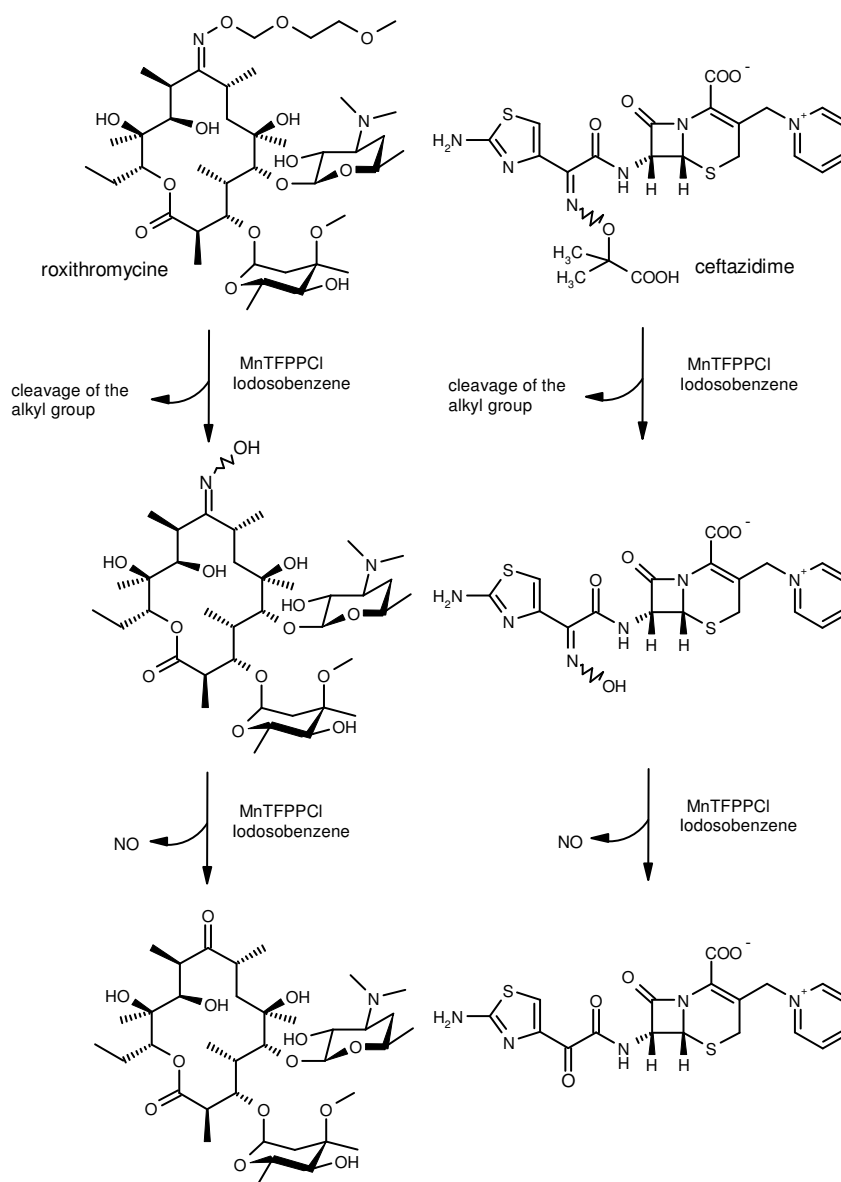
Furthermore, methods to quantify the supported metalloporphyrin on the carrier material and to determine the remaining activity of the immobilized catalyst were developed.

The reaction of carbamazepine to the 10,11-epoxide was utilized to optimize a model system for the biomimetic epoxidation of different substrates (Scheme 8-2). The model system which contained the metalloporphyrin MnT4MPyPCI and the oxygen donor *m*-chlorperoxybenzoic acid furnished the highest yields of epoxide. Usage of the microwave-assisted method for the reactions increased the yields accompanied by lower standard deviations.



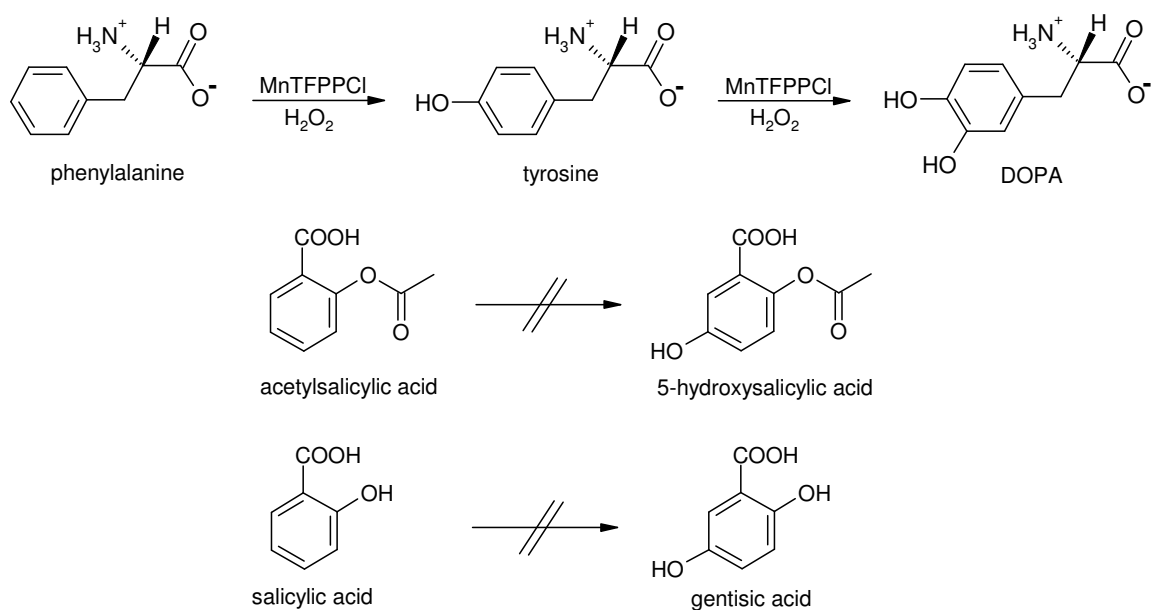
Scheme 8-2 Biomimetic epoxidation reactions carried out with MnT4MPyPCI and *m*-chlorperoxybenzoic acid

For the first time, biomimetic model systems were applied to dealkylation reactions of oximether derivatives that contained larger alkyl groups, and their mechanisms were proposed. The antibiotics roxithromycin and ceftazidime were selected as substrates for this reaction (Scheme 8-3). The positive response was detected through release of oxidized nitrogen species from the dealkylated oxime. The optimal model system for this reaction was determined by the NO release of hydroxy urea and consisted of MnTFPPCl and iodosobenzene.



Scheme 8-3 Dealkylation of the oximether structures of roxithromycin and ceftazidime were carried out with MnTFPPCl and iodosobenzene

Studies on biomimetic hydroxylations (Scheme 8-4) demonstrated a strong effect of the molar ratio of oxygen donor to substrate as well as the choice of the method (conventional or microwave-assisted) on product formation and yield. Reducing the amount of oxygen donor in the conventional reaction of phenylalanine was the only way to obtain the intermediate tyrosine. Higher concentrations resulted in spontaneous hydroxylation of tyrosine to DOPA. Application of microwave assisted reaction conditions enabled a complete conversion of the starting material to tyrosine and DOPA in a ratio of 1:2.



Scheme 8-4 Biomimetic hydroxylation reactions were carried out with MnTFPPCl and hydrogen peroxide

Attempts to apply the optimized biomimetic model system on epoxidation of acrylamid and *cis*-1-propenylphosphonic acid as well as on hydroxylation of acetylsalicylic acid and salicylic acid did not succeed. The failure of these reactions has been discussed.



## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Verzeichnis der Geräte und allgemeine Methoden

#### Darstellung von Iodosobenzol

Nach *Saltzman und Sharefkin*<sup>95</sup> aus Iodosobenzoldiacetat mit NaOH

#### ESI-MS/MS

Finnigan MAT 95 XL TRAP, ESI, Finnigan MAT GmbH,  
Bremen, Deutschland

#### Herstellung von Pufferlösungen

Phosphatpuffer 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 Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 11,87 g/L

Citratpuffer 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 Citronensäure Monohydrat  
in 200 mL 1 M NaOH, Wasser auf 1000 mL

Lösung B: 0,1 M HCl

Boratpuffer pH 9,0 und 9,3

83,5 mL Lösung A + 16,5 mL Lösung B, ggf. eingestellt mit 1 M NaOH

Lösung A: 0,1 M Borax; 12,37 g Borsäure + 4 g NaOH, Wasser auf 1000 mL

Lösung B: 0,1 M HCl

#### <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (400 MHz),

Chemische Verschiebungen mit  $\delta$ -Werten in ppm,

Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS),

Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration,

Abkürzungen der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:

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

**HPLC**

Merck-Hitachi La Chrom (Steuereinheit D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Dioden-Array-Detektor L-7455), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Merck-Hitachi (Steuereinheit D-6000, Pumpe L-6200, Injektor LC-Organizer, UV-Detektor 655A), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Varian Prostar 210/215, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

**Kapillarelektrophorese**

Agilent 3D CE mit Dioden-Array-Detektor,

Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland

**NO-Messung**

Sievers NOAnalyzer™ 280, Sievers Instruments, Boulder, USA

**pH-Meter**

Metrohm 632 mit Glaselektrode Metrohm 6.0203.000, Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland

Die Kalibrierung erfolgte nach Ph. Eur. 4.00 bei 20 °C mit Kaliumhydrogenphthalatlösung pH 4,00, Kaliumdihydrogenphosphat- und Natriummonohydrogenphosphatlösung pH 7,43 und Natriumcarbonat- und Natriumhydrogencarbonatlösung pH 10,06<sup>96</sup>.

**Synthesemikrowelle**

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

**UV/VIS-Spektrometer**

Shimadzu UV Visible recording spectrophotometer UV-160 (9.5), Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland

Quarzküvetten oder Mikroküvetten ratiolab® (Müller ratiolab, Dreieich, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1 cm; auf eine Temperierung wurde verzichtet.

**Waagen**

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

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

**Zentrifuge**

Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Zytostatikawerkbank**

HERAsafe<sup>®</sup> HSP 18, Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2,  
Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

## **9.2 Versuche zu Abschnitt 3 (Immobilisierungen)**

### **9.2.1 UV/VIS-spektroskopische Methode zur Quantifizierung der Metalloporphyrinbelegung des Trägermaterials**

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Quantifizierung von Mn/FeT4MPyPcI **AAV 1**

1,200 mg immobilisiertes MnT4MPyPcI bzw. 3,000 mg immobilisiertes FeT4MPyPcI werden in 10,0 mL 2 M HCl für 10 Minuten geschwenkt. Der nun gefärbte Überstand wird abdekantiert, 1:10 verdünnt und in einer Quarzküvette gegen 2 M HCl bei einer Wellenlänge von 462 nm (MnT4MPyPcI) bzw. 414 nm (FeT4MPyPcI) bei Raumtemperatur vermessen.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Quantifizierung von Mn/FeTFPPcI **AAV 2**

9,500 mg immobilisiertes MnTFPPcI bzw. 9,000 mg immobilisiertes FeTFPPcI werden in 10,0 mL konz. Schwefelsäure suspendiert und nach Zugabe von 100 mg NaF bei 80 °C für 20 Minuten gerührt. Der Überstand wird abdekantiert, 1:10 verdünnt und in einer Kunststoffküvette gegen konz. Schwefelsäure bei einer Wellenlänge von 426 nm bei Raumtemperatur vermessen.

#### Kalibrierung für die Quantifizierung von Mn/FeT4MPyPcI

Für die Kalibrierung der Quantifizierung von immobilisiertem MnT4MPyPcI wurden dreimal aus einer Stammlösung von 1,000 mg/mL löslichem MnT4MPyPcI in 2 M HCl 12,5 µL, 25,0 µL, 50,0 µL, 75,0 µL und 100,0 µL abgenommen und auf 10,0 mL mit 2 M HCl verdünnt. Aufgrund des geringeren molaren Absorptionskoeffizienten von FeT4MPyPcI wurden dreimal aus einer Stammlösung von 1,000 mg/mL löslichem FeT4MPyPcI in 2 M HCl 100,0 µL, 200,0 µL, 300,0 µL,

350,0  $\mu\text{L}$  und 400,0  $\mu\text{L}$  abgenommen und auf 10,0 mL mit 2 M HCl verdünnt. Diese Ansätze sind ebenfalls jeweils 10 Minuten geschwenkt worden. Die Lösungen wurden in einer Kunststoffküvette dreimal gegen 2 M HCl bei 462 nm (MnT4MPyPCL) bzw. 414 nm (FeT4MPyPCL) bei Raumtemperatur vermessen.

Nach dem Auftragen der gemessenen Absorption gegen die Konzentration wurden die in Abbildung 9-1 und 9-2 dargestellten Kalibrierkurven erhalten. Die Berechnung der Belegung von Metalloporphyrinen am Trägermaterial erfolgte jeweils unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichung.

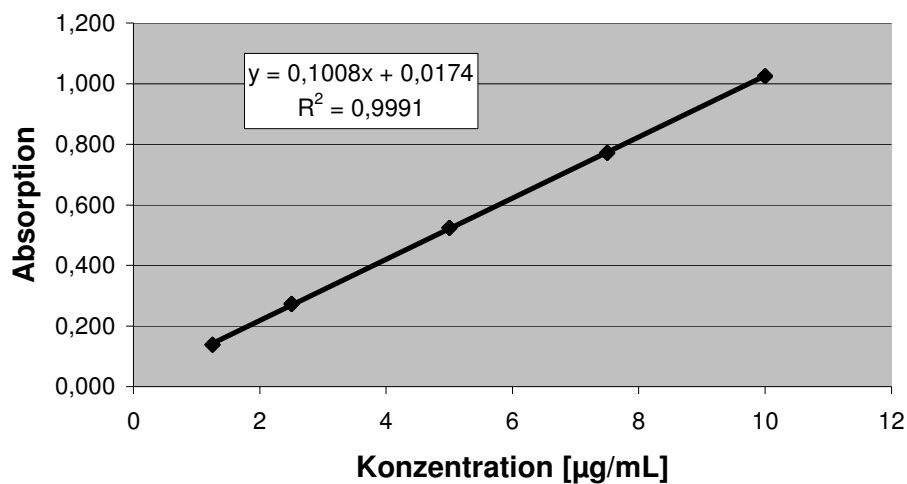


Abbildung 9-1 Kalibrierkurve für die Quantifizierung von immobilisiertem MnT4MPyPCL

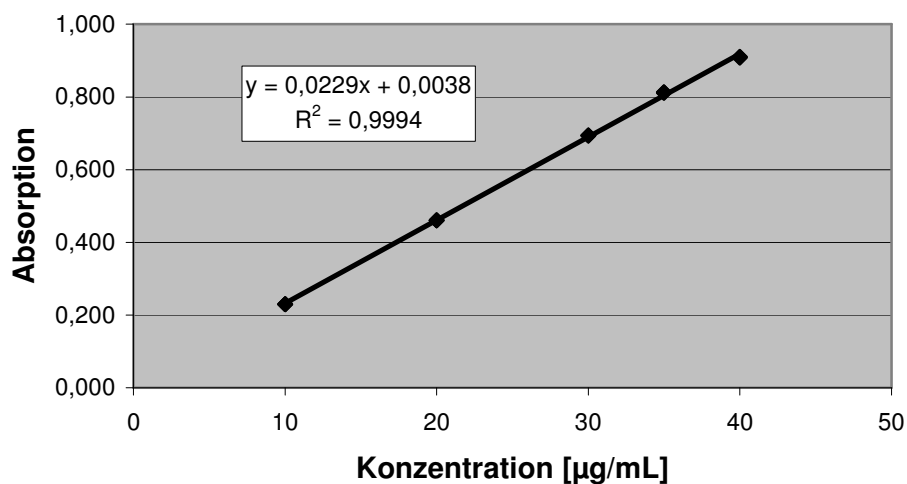


Abbildung 9-2 Kalibrierkurve für die Quantifizierung von immobilisiertem FeT4MPyPCL

### Kalibrierung für die Quantifizierung von Mn/FeTFPPCl

In Abschnitt 3.3.2 wurde die bei dieser Methode eintretende Desmetallierung beider perfluorierter Metalloporphyrine beschrieben. Daher konnte für beide Metalloporphyrine eine Kalibrierkurve verwendet werden. Für die Kalibrierung wurden dreimal aus einer Stammlösung von 1,000 mg/mL löslichem MnTFPPCl in konz. Schwefelsäure 37,5 µL, 56,3 µL, 75,0 µL, 93,8 µL und 112,5 µL abgenommen und nach Zusatz von 100 mg NaF auf 10,0 mL mit konzentrierter Schwefelsäure verdünnt. Diese Ansätze sind ebenfalls 20 Minuten auf 80° C erwärmt worden. Die Lösungen sind in einer Kunststoffküvette dreimal gegen konz. Schwefelsäure bei 426 nm bei Raumtemperatur vermessen worden.

Nach dem Auftragen der gemessenen Absorption gegen die Konzentration wurde die in Abbildung 9-3 dargestellte Kalibrierkurve erhalten. Die Berechnung der Belegung von Metalloporphyrinen am Trägermaterial erfolgte unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichung

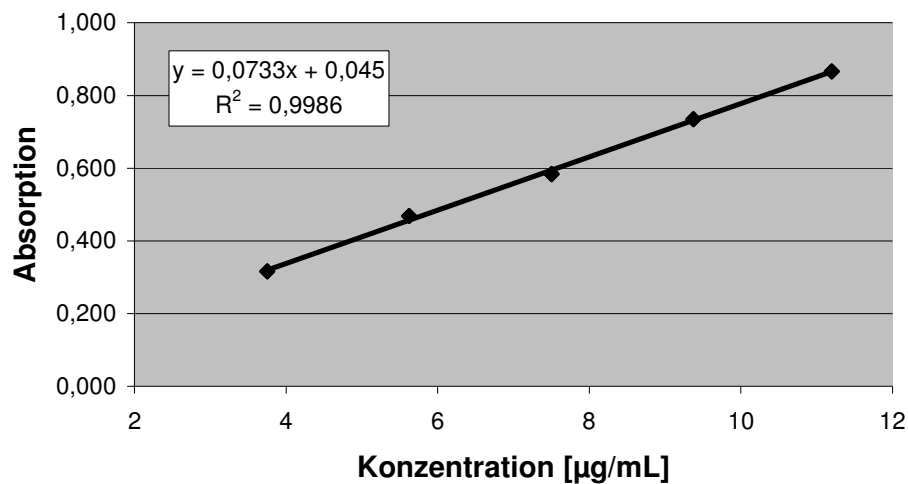


Abbildung 9-3 Kalibrierkurve für die Quantifizierung von immobilisiertem MnTFPPCl und FeTFPPCl

## 9.2.2 Immobilisierung nach konventionellen Methoden

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von Mn/FeT4MPyPcI<sup>28, 48, 49</sup>

### AAV 3

500 mg Kieselgel 60 (Merck, 40 - 60 µm), 46 mg MnT4MPyPcI oder FeT4MPyPcI und 10 mL Methanol werden in ein Probengefäß gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Filtrieren und Waschen mit jeweils 10 mL Dichlormethan und Acetonitril wird das immobilisierte Metalloporphyrin über Nacht luftgetrocknet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von Mn/FeTFPPcI<sup>28, 48, 49</sup>

### AAV 4

500 mg Aminopropyl-Kieselgel (Merck, 35 - 70 µm, 1,1 mmol/g), 75 mg Metalloporphyrin und 10 mL Diethylenglycoldimethylether werden in einem Probengefäß mit Argon anaerobisiert und drei Stunden bei 140 °C gerührt. Nach dem Filtrieren wird der Rückstand mit jeweils 10 mL Dichlormethan, Cyclohexan Dimethylformamid, Acetonitril, Ethanol und Acetanhydrid gewaschen und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur mit Dichlormethan für eine Stunde gereinigt. Anschließend wird für 24 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.

### Messdaten der konventionellen Immobilisierung

<b>konv.</b>	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]	<i>Lit.</i> <sup>28, 48, 49</sup>
MnT4MPyPcI	1,266	0,702	5,68	5,63 <i>s</i> = 0,05 % <i>V<sub>k</sub></i> = 0,89 %	4,3 %
	1,244	0,684	5,63		
	1,318	0,719	5,58		
FeT4MPyPcI	3,528	0,486	6,37	6,39 <i>s</i> = 0,03 % <i>V<sub>k</sub></i> = 0,50 %	4,0 %
	3,492	0,485	6,43		
	3,473	0,479	6,38		
MnTFPPcI	9,523	0,459	6,53	6,63 <i>s</i> = 0,12 % <i>V<sub>k</sub></i> = 1,88 %	6,0 %
	9,496	0,461	6,59		
	9,521	0,475	6,77		
FeTFPPcI	8,549	0,337	5,28	5,25 <i>s</i> = 0,04 % <i>V<sub>k</sub></i> = 0,72 %	9,7 %
	9,300	0,362	5,21		
	8,742	0,344	5,27		

Tabelle 9-1 Prozentuale Belegung der verwendeten Metalloporphyrine am Trägermaterial nach konventionellen Methoden (AAV3 und 4) und Literaturangabe

### 9.2.3 Immobilisierung in der Synthesemikrowelle

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von Mn/FeT4MPyPcI **AAV 5**

Die Vorschrift ist analog zu AAV 3 durchzuführen, wobei aufgrund des geringen Füllvolumens des Mikrowellengefäßes der Reaktionsansatz halbiert und die Menge des eingesetzten Metalloporphyrins verdoppelt wurde. Als Geräteparameter wurden die gewünschte Temperatur und Reaktionszeit (siehe Abschnitt 3.4.1), die maximale Leistung von 300 W und der maximale Druck von 18 bar vorgegeben.



## Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von Mn/FeTFPPCl **AAV 6**

Die Vorschrift ist analog zu AAV 4 durchzuführen, wobei aufgrund des geringen Füllvolumens des Mikrowellengefäßes ebenfalls der Reaktionsansatz halbiert und die Menge des eingesetzten Metalloporphyrins um ein Drittel erhöht wurde. Als Geräteparameter wurden wiederum die gewünschte Temperatur und Reaktionszeit (siehe Abschnitt 3.4.1), die maximale Leistung von 300 W und der maximale Druck von 18 bar vorgegeben.

### Messdaten der Immobilisierung in der Synthesemikrowelle

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
5 min	1,139 mg	0,375	10,58	10,94 s = 0,501 % Vk 4,58 %
	1,132 mg	0,377	10,72	
	1,318 mg	0,468	11,51	
10 min	1,258 mg	0,456	11,82	12,05 s=0,41% Vk=3,38%
	1,250 mg	0,454	11,81	
	1,150 mg	0,440	12,52	
15 min	1,240 mg	0,439	11,51	11,66 s=0,77% Vk=6,57%
	1,252 mg	0,479	12,49	
	1,253 mg	0,428	10,98	

Tabelle 9-2 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPCL an Kieselgel bei variablen Reaktionszeiten (MW, 25 °C) nach AAV 5

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
30°C	1,258 mg	0,456	11,82	12,05 s = 0,41 % Vk = 3,38 %
	1,250 mg	0,454	11,81	
	1,150 mg	0,440	12,52	
60°C	1,301 mg	0,548	13,92	13,73 s = 0,38 % Vk = 2,76 %
	1,270 mg	0,511	13,29	
	1,199 mg	0,505	13,97	
100°C	1,197 mg	0,450	12,27	11,62 s = 0,595% Vk = 5,12 %
	1,150 mg	0,408	11,50	
	1,266 mg	0,435	11,10	

Tabelle 9-3 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPCL an Kieselgel bei variablen Reaktionstemperaturen (MW, 10 min) nach AAV 5

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
10 min/60 °C	3,640 mg	0,534	14,61	14,40 s = 0,78% Vk = 5,43%
	3,584 mg	0,491	13,53	
	3,631 mg	0,546	15,05	

Tabelle 9-4 Prozentuale Belegung von FeT4MPyPCL an Kieselgel (MW, 60 °C, 10 min) nach AAV 5

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]
5 min	9,432 mg	0,426	12,99
10 min	9,426 mg	0,439	13,44
15 min	9,341 mg	0,418	12,85

Tabelle 9-5 Prozentuale Belegung von MnTFPPCL an Aminopropyl-Kieselgel bei variablen Reaktionszeiten (MW, 110 °C, Diethylenglycoldimethylether) nach AAV 6

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]
70 °C	9,445 mg	0,430	13,10
90 °C	9,528 mg	0,468	14,29
110 °C	9,426 mg	0,439	13,44

Tabelle 9-6 Prozentuale Belegung von MnTFPPCL an Aminopropyl-Kieselgel bei variablen Reaktionstemperaturen (MW, 10 min, Diethylenglycoldimethylether) nach AAV 6

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
5 min	9,805 mg	0,470	13,89	14,11 s = 0,20% Vk = 1,44%
	9,632 mg	0,473	14,29	
	9,503 mg	0,463	14,15	
10 min	9,510 mg	0,511	15,83	15,32 s = 0,45% Vk = 2,92%
	9,470 mg	0,485	14,98	
	9,475 mg	0,490	15,16	
15 min	9,451 mg	0,487	15,09	15,06 s = 0,10% Vk = 0,68%
	9,491 mg	0,491	15,15	
	9,473 mg	0,484	14,95	

Tabelle 9-7 Prozentuale Belegung von MnTFPPCL an Aminopropyl-Kieselgel bei variablen Reaktionszeiten (MW, 80 °C, Dibutylether) nach AAV 6

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
60 °C	9,335 mg	0,428	13,22	12,88 s = 0,41% Vk = 3,15%
	9,498 mg	0,429	12,98	
	9,853 mg	0,428	12,43	
80 °C	9,510 mg	0,511	15,83	15,32 s = 0,45% Vk = 2,92%
	9,470 mg	0,485	14,98	
	9,475 mg	0,490	15,16	
100 °C	9,465 mg	0,471	14,49	14,13 s = 0,31% Vk = 2,21%
	9,603 mg	0,462	13,96	
	9,440 mg	0,454	13,94	

Tabelle 9-8 Prozentuale Belegung von MnTFPPCl an Aminopropyl-Kieselgel bei variablen Reaktionstemperaturen (MW, 10 min, Dibutylether) nach AAV 6

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
10 min/80 °C	8,876 mg	0,342	10,87	11,87 s = 0,892% Vk = 7,52%
	9,073 mg	0,386	12,14	
	9,170 mg	0,403	12,59	

Tabelle 9-9 Prozentuale Belegung von FeTFPPCl an Aminopropyl-Kieselgel (MW, 80 °C, 10 min, Dibutylether) nach AAV 6

## 9.2.4 Immobilisierung in der Synthesemikrowelle ohne Lösungsmittel

### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Immobilisierung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI AAV 7

125 mg des jeweiligen Kieselgels (Kieselgel 60 oder Aminopropyl-Kieselgel), 25 mg des entsprechenden Metalloporphyrins (MnT4MPyPcI oder MnTFPPcI) werden in ein Mikrowellengefäß zusammen mit 200 µL Methanol gegeben, durch Rühren vermischt und sofort wieder unter vermindertem Druck von dem Lösungsmittel befreit. Die Vorgaben für die Parameter der Synthesemikrowelle sind eine maximale Leistung von 300 W und ein maximaler Druck von 18 bar. Als Temperaturvorgabe werden 200 °C angegeben, wobei diese nicht erreicht werden, da die maximal erreichte Leistung als limitierender Faktor fungiert. Die Reaktionszeit beträgt 10 Minuten mit einer Vorlaufzeit von einer Minute. Anschließend wird der gesamte Inhalt des Mikrowellengefäßes in einen Filter mit Filterpapier überführt und mit jeweils 10 mL Ethanol, Dichlormethan und Acetonitril gewaschen, gefolgt von einer zusätzlichen Reinigung für 60 Minuten in einer Soxhlet-Apparatur mit Dichlormethan. Das Trocknen erfolgte für 24 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank.

### Messdaten der Immobilisierung in der Synthesemikrowelle ohne Lösungsmittel

MW	e (imm.)	Abs.	Belegung [%]	$\bar{x}$ [%]
MnT4MPyPcI	1,218 mg	0,510	14,04	13,91 s = 0,13% Vk = 0,93%
	1,228 mg	0,515	13,91	
	1,229 mg	0,513	13,78	
MnTFPPcI	9,027 mg	0,468	15,20	15,44 s = 0,22% Vk = 1,44%
	9,287 mg	0,489	15,47	
	8,770 mg	0,466	15,64	

Tabelle 9-10 Prozentuale Belegung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI am jeweiligen Trägermaterial (MW<sub>tr.</sub>) nach AAV 7

### **9.2.5 Aktivitätsbestimmung immobilisierter Metalloporphyrine**

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Liquid-Methode zur Bestimmung der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim AAV 8

In das Reaktionsgefäß des NOA™ werden 1850 µL 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 50 µL 6 mM ethanolischer Cyclohexanonoximlösung und 50 µL 6 mM ethanolischer Metalloporphyrinlösung vorgelegt. Nach dem Verschließen und Anaerobisieren durch den Argonstrom werden zum Initiieren der Reaktion 50 µL 60 mM Iodosobenzollösung mit einer gasdichten Spritze durch das Septum in das Reaktionsgefäß gegeben.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Headspace-Methode zur Bestimmung der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim AAV 9

Für die NO-Messung aus dem Gasüberstand von Lösungen werden in einem externen Probengefäß 2650 µL 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 50 µL 50 mM ethanolischer Cyclohexanonoximlösung und 50 µL 50 mM ethanolischer Metalloporphyrinlösung vorgelegt. Nach Verschließen des Probengefäßes mit einem gasdichten Septum und Anaerobisieren durch Einleiten von Argon für 20 Minuten werden mit einer gasdichten Spritze 250 µL 100 mM ebenso anaerobisierte Iodosobenzollösung zum Initiieren der Reaktion zugegeben. Die Ansätze sind für 24 Stunden bei 37 °C zu inkubieren. Anschließend werden 200 µL des Gasüberstandes aus dem externen Probengefäß entnommen und mit einer gasdichten Spritze in das leere Reaktionsgefäß des NOA™ überführt.

### Kalibrierung für die Liquid-Methode zur Bestimmung der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim

Da Nitrit in essigsaurer Kaliumiodidlösung quantitativ zu NO umgesetzt wird, wurde mit Hilfe dieser Reaktion die Kalibrierung durchgeführt. In die im Reaktionsgefäß des NOA™ vorgelegten 4000 µL Eisessig und 1000 µL 1 % Kaliumiodidlösung wurden jeweils dreimal mit einer gasdichten Spritze 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL und 100 µL einer 50 µM Kaliumnitritlösung injiziert. Die integrierten Peakflächen, aufgetragen gegen die eingesetzte Menge Nitrit, ergaben die in Abbildung 9-4 dargestellte Kalibrierkurve. Für die Bestimmung einer Nitrit-Freisetzung könnte dieselbe Kalibrierkurve herangezogen werden, da in diesem Fall auch Eisessig und Kaliumiodidlösung vorgelegt werden<sup>56</sup>.

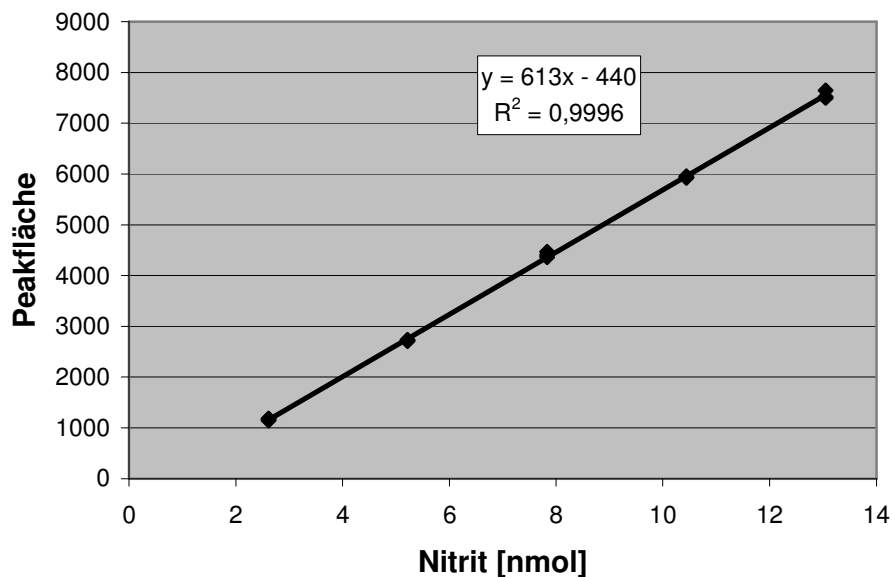


Abbildung 9-4 Kalibrierkurve für die Liquid-Methode der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim

### Kalibrierung für die Headspace-Methode zur Bestimmung der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim

Bei der Headspace-Methode wurde ebenfalls die quantitative Reduktion von Nitrit zu NO in essigsaurer Kaliumiodidlösung ausgenutzt. 1500 µL Eisessig und 500 µL 1 % Kaliumiodidlösung wurden in einem gasdichten Probengefäß anaerobisiert und auf 37 °C temperiert. Nachdem 1000 µL anaerobisierte 500 µM Kaliumnitritlösung mit einer gasdichten Spritze zugegeben wurden, war für 10 Minuten bei 37 °C zu inkubieren. Mit einer gasdichten Spritze wurden dann jeweils dreimal 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL und 25 µL des Gasüberstands entnommen und in das leere Reaktionsgefäß überführt. Die integrierten Peakflächen, aufgetragen gegen die eingesetzte Menge Nitrit, ergaben die in Abbildung 9-5 dargestellte Kalibrierkurve. Für die Bestimmung einer Nitrit-Freisetzung könnte dieselbe Kalibrierkurve herangezogen werden, da in diesem Fall auch Eisessig und Kaliumiodidlösung vorgelegt werden<sup>56</sup>.

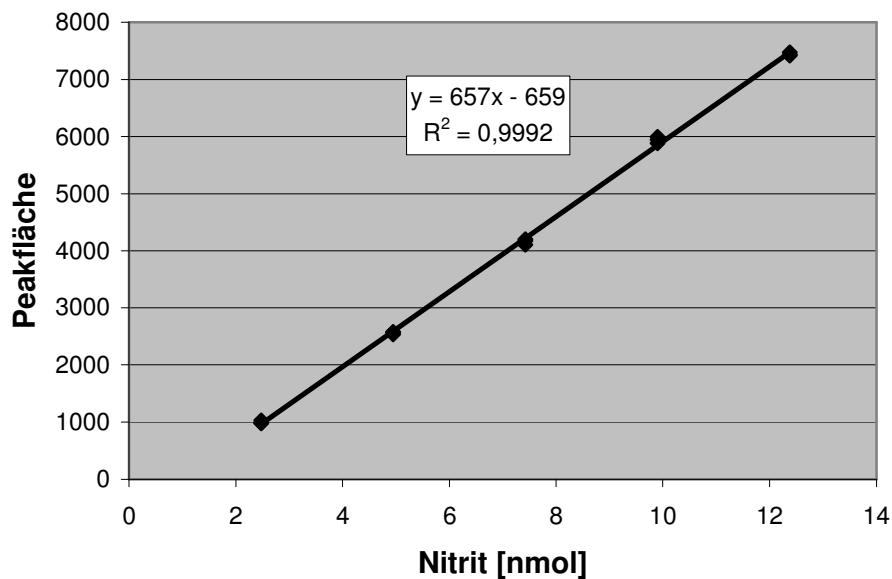


Abbildung 9-5 Kalibrierkurve für die Headspace-Methode der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim

### Messdaten der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim

Die Messwerte in nmol wurden in Bezug auf die eingesetzte Menge Substrat in Prozent angegeben.

Ansatz	CHOX	CHOX+PhIO	CHOX+PhIO +MnTFPPCl	CHOX+PhIO +FeTFPPCl	CHOX+PhIO +MnT4MPyPcI	CHOX+PhIO +FeT4MPyPcI
<b>1</b>	n.d.	3,27	7,99	5,47	6,52	4,84
<b>2</b>	n.d.	3,36	8,77	6,18	6,34	5,02
<b>3</b>	n.d.	3,24	8,71	6,89	7,18	5,42
<b>4</b>	n.d.	3,22	7,81	6,99	7,03	5,52
<b>5</b>	n.d.	3,37	7,73	7,26	8,50	5,57
<b>6</b>	n.d.	3,28	8,95	7,28	8,43	5,77
$\bar{x}$	0	3,29	8,33	6,68	7,33	5,36
s	-	0,06	0,54	0,71	0,93	0,35
Vk	-	1,82	6,48	10,63	12,69	6,53

Tabelle 9-11 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim (CHOX) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in % nach AAV 8

Ansatz	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	Vk
MnTFPPCl lsl.	3,45	3,25	3,21	3,32	3,38	3,42	3,34	0,10	2,99
MnTFPPCl imm.	1,93	2,00	2,06	2,08	2,12	2,14	2,06	0,08	3,88
FeTFPPCl lsl.	1,65	1,67	1,60	1,67	1,71	1,65	1,66	0,04	2,41
FeTFPPCl imm.	0,60	0,58	0,53	0,51	0,57	0,53	0,55	0,04	7,27
MnT4MPyPcI lsl.	1,65	1,72	1,72	1,70	1,75	1,68	1,71	0,04	2,34
MnT4MPyPcI imm.	1,66	1,74	1,72	1,71	1,76	1,68	1,71	0,04	2,34
FeT4MPyPcI lsl.	1,51	1,52	1,53	1,54	1,56	1,60	1,54	0,03	1,95
FeT4MPyPcI imm.	1,55	1,59	1,57	1,56	1,54	1,56	1,56	0,02	1,28

Tabelle 9-12 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim unter Einfluss von löslichen und immobilisierten Metalloporphyrinen, alle Angaben in % nach AAV 9



<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	$\bar{x}$	s	Vk
MnTFPPCl konv.	1,93	2,00	2,06	2,08	2,12	2,14	2,06	0,08	3,88
MnTFPPCl MW	2,00	2,04	1,94	2,05	2,11	2,09	2,04	0,06	2,94
MnTFPPCl MW tr.	2,10	1,99	2,03	2,07	2,01	2,08	2,05	0,04	1,95
FeTFPPCl konv.	0,60	0,58	0,53	0,51	0,57	0,53	0,55	0,04	7,27
FeTFPPCl MW	0,63	0,64	0,51	0,53	0,57	0,52	0,57	0,06	10,53
MnT4MPyPcCl konv.	1,66	1,74	1,72	1,71	1,76	1,68	1,71	0,04	2,34
MnT4MPyPcCl MW	0,77	0,76	0,69	0,72	0,76	0,71	0,74	0,03	4,05
MnT4MPyPcCl MW tr.	1,71	1,68	1,72	1,69	1,74	1,71	1,71	0,02	1,17
FeT4MPyPcCl konv.	1,55	1,59	1,57	1,56	1,54	1,56	1,56	0,02	1,28
FeT4MPyPcCl MW	0,63	0,65	0,63	0,67	0,62	0,61	0,64	0,02	3,13

Tabelle 9-13 Vergleich der NO-Freisetzung aus Cyclohexanonoxim in Bezug auf den Einfluss der Synthesemikrowelle auf die nach verschiedenen Methoden immobilisierten Metalloporphyrine, alle Angaben in % nach AAV 9

### 9.3 Versuche zu Abschnitt 4 (Epoxidierungen)

#### 9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Epoxidierung von Substraten mit biomimetischen Modellsystemen

##### Umsetzung in Anlehnung an die Literaturvorschrift<sup>65</sup> AAV 10

Das von *Groves und Mitarbeitern* beschriebene molare Ansatzverhältnis von Metalloporphyrin zu Substrat zu Sauerstoffdonator von 1:10,4:6 wurde hier analog für die vier verwendeten Metalloporphyrine und die Sauerstoffdonatoren (Abschnitt 2.3) angewendet.

50 nmol des nach AAV 7 immobilisierten Metalloporphyrins werden in einem Probengefäß vorgelegt, 520 nmol Substrat (ggf. in 100 µL einer ethanolischen Stammlösung) und der 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 hinzugegeben. 300 nmol des Sauerstoffdonators werden zuletzt zugegeben (ggf. in 100 µL einer ethanolischen Stammlösung), so dass ein Probenvolumen von 1000 µL erhalten wird. Bei dem Substrat Methyleugenol werden aus Gründen der Löslichkeit 250 µL der Pufferlösung durch Ethanol ersetzt. Wird Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator verwendet, werden dem Reaktionsansatz 2,5 µM Imidazol zugesetzt.

Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (oder entsprechend 10 Minuten bei 25 °C und 25 Watt Leistung mit Trockeneiskühlung in der Synthesemikrowelle gerührt) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, membranfiltriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter 13 mm, 0,45 µm, Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und analysiert.

##### Umsetzung im molaren Ansatzverhältnis von 1:10:100 AAV 11

52 nmol des nach AAV 7 immobilisierten Metalloporphyrins werden in einem Probengefäß vorgelegt, 520 nmol Substrat (ggf. in 100 µL einer ethanolischen Stammlösung) und der 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 hinzugegeben. 5,2 µmol des Sauerstoffdonators werden zuletzt zugegeben (ggf. in 100 µL einer ethanolischen Stammlösung), so dass ein

Probenvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  erhalten wird. Bei dem Substrat Methyleugenol werden aus Gründen der Löslichkeit 250  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung durch Ethanol ersetzt. Wird Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator verwendet, werden dem Reaktionsansatz 2,5  $\mu\text{M}$  Imidazol zugesetzt.

Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (oder entsprechend 10 Minuten bei 25 °C und 25 Watt Leistung mit Trockeneiskühlung in der Synthesemikrowelle gerührt) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, membranfiltriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter 13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$ , Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und analysiert.

#### Umsetzung im molaren Ansatzverhältnis von 1:10:500 AAV 12

52 nmol des nach AAV 7 immobilisierten Metalloporphyrins werden in einem Probengefäß vorgelegt, 520 nmol Substrat (ggf. in 100  $\mu\text{L}$  einer ethanolischen Stammlösung) und der 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 hinzugegeben. 26  $\mu\text{mol}$  des Sauerstoffdonators (in 100  $\mu\text{L}$  einer ethanolischen Stammlösung) werden langsam in drei Anteilen im Abstand von 30 Sekunden unter Schwenken zugegeben, so dass ein Probenvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  erhalten wird. Bei dem Substrat Methyleugenol werden aus Gründen der Löslichkeit 250  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung durch Ethanol ersetzt. Wird Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator verwendet, werden dem Reaktionsansatz 2,5  $\mu\text{M}$  Imidazol zugesetzt.

Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (oder entsprechend 10 Minuten bei 25 °C und 25 Watt Leistung mit Trockeneiskühlung in der Synthesemikrowelle gerührt) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, membranfiltriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter 13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$ , Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und analysiert.

### 9.3.2 Methoden und Messdaten der Umsetzung von Carbamazepin

#### HPLC-Methode

Mit dieser Methode können Carbamazepin, Carbamazepin-10,11-epoxid und Acetanilid als interner Standard detektiert werden.

Säule:	Lichrosphere <sup>®</sup> RP-18 (5µm), 125-4 (Merck)
Elutionsmittel:	Methanol/Wasser (50:50)
Flussrate:	1 mL/min
Wellenlänge:	215 nm
Probenvolumen:	10 µL
Dauer:	10 min
Elutionstyp:	isokratisch

#### Kalibrierung der HPLC-Methode

Für die Kalibrierung von Carbamazepin und Carbamazepin-10,11-epoxid wurden Lösungen beider Analyten in fünf verschiedenen Konzentrationsniveaus hergestellt und jeweils zweimal vermessen. Aus den Messergebnissen resultierten die in Abbildung 9-6 abgebildeten Kalibrierkurven. Mit den für die beiden Ausgleichsgeraden angegebenen Regressionsgleichungen wurden die Konzentrationen der Analyten berechnet und die Ausbeuten in Prozent zur eingesetzten Substanz angegeben.

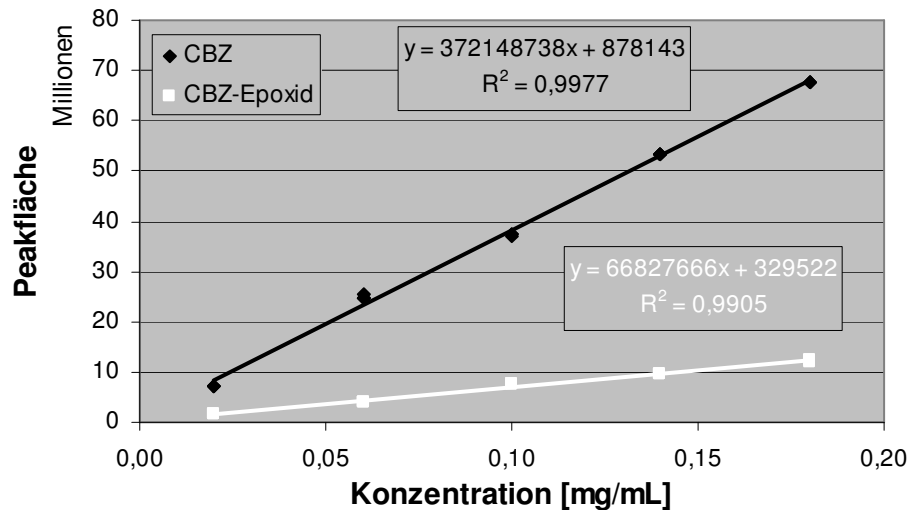


Abbildung 9-6 Kalibrierkurve zur Quantifizierung von Carbamazepin (CBZ) und Carbamazepin-10,11-epoxid (CBZ-Epoxid)

### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit positiver Ionisierung am ESI-MS (ESI-Spannung 3,0 kV, Kapillarentemperatur 220 °C, Beschleunigungsspannung 5 kV, Scanrate 3 Scans/Dekade). Die membranfiltrierten Reaktionsansätze konnten direkt mit 200 µL/min versprüht werden. Es wurde auf die Massen von Carbamazepin von m/z 236 +1 und dem Epoxid von m/z 252 +1 gescannt.

### Messdaten der Umsetzung von Carbamazepin

Ansatz	CBZ	CBZ+PhIO	CBZ+PhIO +MnT4MPyPcI	CBZ+PhIO +FeT4MPyPcI	CBZ+PhIO +MnTFPPcI	CBZ+PhIO +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	0,89	20,30	18,92	14,34	16,56
<b>2</b>	n.d.	0,88	20,37	18,91	14,44	16,49
<b>3</b>	n.d.	0,90	18,64	19,09	14,27	16,52
$\bar{x}$	0	0,89	19,77	18,97	14,35	16,52
s	-	0,01	0,98	0,10	0,09	0,04
Vk	-	1,12	4,96	0,53	0,63	0,24

Tabelle 9-14 Vergleich der Bildung von Carbamazepin-10,11-epoxid aus Carbamazepin (CBZ) mit Iodosobenzol (PhIO) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	CBZ	CBZ+MMPP	CBZ+MMPP +MnT4MPyPCL	CBZ+MMPP +FeT4MPyPCL	CBZ+MMPP +MnTFPPCL	CBZ+MMPP +FeTFPPCL
<b>1</b>	n.d.	0,95	7,54	7,10	5,51	6,56
<b>2</b>	n.d.	0,94	6,51	7,22	5,34	6,38
<b>3</b>	n.d.	0,97	7,30	6,95	5,39	6,10
$\bar{x}$	0	0,95	7,12	7,09	5,41	6,35
s	-	0,02	0,54	0,14	0,09	0,23
Vk	-	2,11	7,58	1,97	1,66	3,62

Tabelle 9-15 Vergleich der Bildung von Carbamazepin-10,11-epoxid aus Carbamazepin (CBZ) mit Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	CBZ	CBZ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CBZ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +MnT4MPyPCL	CBZ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +FeT4MPyPCL	CBZ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +MnTFPPCL	CBZ+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +FeTFPPCL
<b>1</b>	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	6,95	5,35
<b>2</b>	n.d.	0,30	n.d.	n.d.	7,10	5,70
<b>3</b>	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	7,00	5,73
$\bar{x}$	0	0,25	0	0	7,02	5,59
s	-	0,05	-	-	0,08	0,21
Vk	-	20,00	-	-	1,14	3,76

Tabelle 9-16 Vergleich der Bildung von Carbamazepin-10,11-epoxid aus Carbamazepin (CBZ) mit Wasserstoffperoxid unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	CBZ	CBZ+mCPBA	CBZ+mCPBA +MnT4MPyPCL	CBZ+mCPBA +FeT4MPyPCL	CBZ+mCPBA +MnTFPPCL	CBZ+mCPBA +FeTFPPCL
<b>1</b>	n.d.	1,62	36,03	35,21	27,44	35,00
<b>2</b>	n.d.	1,72	37,33	34,66	28,07	31,97
<b>3</b>	n.d.	1,95	35,00	34,31	27,56	34,75
$\bar{x}$	0	1,76	36,12	34,73	27,69	33,91
s	-	0,17	1,17	0,45	0,33	1,68
Vk	-	9,66	3,24	1,30	1,19	4,95

Tabelle 9-17 Vergleich der Bildung von Carbamazepin-10,11-epoxid aus Carbamazepin (CBZ) mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	CBZ	CBZ+TBAP	CBZ+TBAP +MnT4MPyPcI	CBZ+TBAP +FeT4MPyPcI	CBZ+TBAP +MnTFPPcI	CBZ+TBAP +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	1,12	10,63	10,48	4,34	4,23
<b>2</b>	n.d.	1,14	10,63	10,47	4,33	4,22
<b>3</b>	n.d.	1,11	10,72	10,43	4,36	4,25
$\bar{x}$	0	1,12	10,66	10,46	4,34	4,23
s	-	0,02	0,05	0,03	0,02	0,02
Vk	-	1,79	0,45	0,29	0,46	0,47

Tabelle 9-18 Vergleich der Bildung von Carbamazepin-10,11-epoxid aus Carbamazepin (CBZ) mit Tetra-*N*-butylammoniumperiodat (TBAP) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	CBZ	CBZ + <i>m</i> CPBA	CBZ+ <i>m</i> CPBA +MnT4MPyPcI	CBZ+ <i>m</i> CPBA +FeT4MPyPcI	CBZ+ <i>m</i> CPBA +MnTFPPcI	CBZ+ <i>m</i> CPBA +FeTFPPcI
<b>1</b>	99,21	89,97	58,15	56,76	60,77	57,22
<b>2</b>	99,79	89,60	57,49	57,91	61,15	56,75
<b>3</b>	99,48	89,26	57,93	56,84	60,40	56,29
$\bar{x}$	99,49	89,61	57,86	57,17	60,77	56,75
s	0,29	0,36	0,34	0,64	0,38	0,47
Vk	0,29	0,40	0,59	1,12	0,63	0,83

Tabelle 9-19 Nach Reaktion von Carbamazepin (CBZ) mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA) im Reaktionsansatz detektierbares Carbamazepin, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	37,43	59,23	86,75
<b>2</b>	36,82	57,91	82,99
<b>3</b>	39,19	55,19	88,71
$\bar{x}$	37,81	57,44	86,15
s	1,23	2,06	2,91
Vk	3,25	3,59	3,38

Tabelle 9-20 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Carbamazepin mit MnT4MPyPcI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure, alle Angaben in %

<b>Carbamazepin-10,11-epoxid</b>					
<b>Ansatz</b>	2 min	10 min	30 min	60 min	10 min, o. Porphyrin
<b>1</b>	58,73	62,51	60,28	60,99	8,87
<b>2</b>	58,33	63,05	60,34	61,79	9,32
<b>3</b>	57,49	62,78	60,91	61,83	8,69
$\bar{x}$	58,18	62,78	60,51	61,54	8,96
s	0,63	0,27	0,35	0,47	0,32
Vk	1,08	0,43	0,58	0,76	3,57
<b>Carbamazepin</b>					
<b>1</b>	33,27	28,35	31,73	29,78	87,31
<b>2</b>	33,02	28,73	31,42	30,86	86,40
<b>3</b>	32,66	28,23	32,12	30,52	87,64
$\bar{x}$	32,98	28,44	31,76	30,39	87,12
s	0,31	0,26	0,35	0,55	0,64
Vk	0,94	0,91	1,10	1,81	0,73

Tabelle 9-21 Gehalt an Edukt und Produkt im Reaktionsansatz (mit MnT4MPyPCI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure) nach Reaktion in der Synthesemikrowelle bei 25 °C, alle Angaben in %

<b>Carbamazepin-10,11-epoxid</b>						
<b>Ansatz</b>	25 °C	40 °C	50 °C	70 °C	100 °C	150 °C
<b>1</b>	62,51	42,03	35,44	31,32	19,60	2,05
<b>2</b>	63,05	42,95	37,55	32,05	16,82	3,51
<b>3</b>	62,78	40,36	36,91	33,85	15,52	3,79
$\bar{x}$	62,78	41,78	36,63	32,41	17,31	3,12
s	0,27	1,31	1,08	1,30	2,08	0,93
Vk	0,43	3,14	2,95	4,01	12,02	29,81
<b>Carbamazepin</b>						
<b>1</b>	28,35	50,14	51,31	50,97	53,37	44,29
<b>2</b>	28,73	45,84	51,34	52,00	57,65	43,44
<b>3</b>	28,23	46,79	53,61	52,99	54,81	43,63
$\bar{x}$	28,44	47,59	52,09	51,99	55,28	43,79
s	0,26	2,26	1,32	1,01	2,18	0,45
Vk	0,91	4,75	2,53	1,94	3,94	1,03

Tabelle 9-22 Gehalt an Edukt und Produkt im Reaktionsansatz (mit MnT4MPyPCI und *m*-Chlorperoxybenzoesäure) nach Reaktion in der Synthesemikrowelle für 10 min, alle Angaben in %



<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	41,53	62,51	92,31
<b>2</b>	40,99	63,05	93,54
<b>3</b>	40,92	62,78	94,33
$\bar{x}$	41,15	62,78	93,39
s	0,33	0,27	1,02
Vk	0,80	0,43	1,09

Tabelle 9-23 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Carbamazepin mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure in der Synthesemikrowelle für 10 min bei 25 °C, alle Angaben in %

### 9.3.3 Methoden und Messdaten der Umsetzung von Protriptylin

#### HPLC-Methode

Mit dieser Methode konnten Protriptylin und Protriptylin-10,11-epoxid quantifiziert werden.

Säule: Purosphere<sup>®</sup>STAR RP-18 endcapped (5µm), 250-4 (Merck)  
 Elutionsmittel: Wasser pH 6,0 mit Ameisensäure/Acetonitril (99:1)  
 Flussrate: 0,3 mL/min  
 Wellenlänge: 220 nm  
 Probenvolumen: 10 µL  
 Dauer: 15 min  
 Elutionstyp: isokratisch

#### Kalibrierung der HPLC-Methode

Für die Kalibrierung von Protriptylin und Protriptylin-10,11-epoxid wurden mit Protriptylin Lösungen fünf verschiedener Konzentrationsniveaus hergestellt und jeweils zweimal vermessen. Aus den Messergebnissen resultierte die in Abbildung 9-7 abgebildete Kalibrierkurve. Mit den für die

Ausgleichsgerade angegebenen Regressionsgleichungen wurden die Konzentrationen von Protriptylin berechnet. Da für das Epoxid keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand und im Chromatogramm keine Nebenpeaks gegenüber dem Chromatogramm des Blindwertes detektierbar waren, wurde die Ausbeute mit Hilfe der 100 %-Methode berechnet und in Prozent angegeben. Die Werte sind als Näherung an die tatsächlichen Werte anzusehen, da sich ein möglicherweise größerer Fehler durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der beiden Analyten nicht vermeiden ließ.

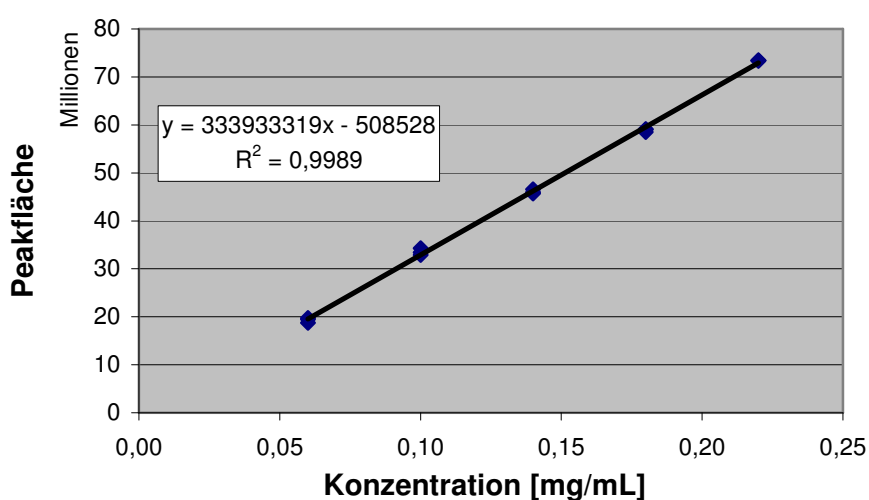


Abbildung 9-7 Kalibrierkurve zur Quantifizierung von Protriptylin

### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit positiver Ionisierung am ESI-MS (ESI-Spannung 3,0 kV, Kapillarentemperatur 220 °C, Beschleunigungsspannung 5 kV, Scanrate 3 Scans/Dekade). Die membranfiltrierten Reaktionsansätze konnten direkt mit 200  $\mu$ L/min versprüht werden. Es wurde auf die Massen von Protriptylin von  $m/z$  263 +1 und dem Epoxid von  $m/z$  279 +1 gescannt.

Messdaten der Umsetzung von Protriptylin

<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	7,43	11,12	34,84
<b>2</b>	6,89	12,55	35,72
<b>3</b>	5,47	10,08	31,39
$\bar{x}$	6,60	11,25	33,98
s	1,01	1,24	2,29
Vk	15,30	11,02	6,74

Tabelle 9-24 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Protriptylin mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	10,10	17,93	44,24
<b>2</b>	10,69	17,86	45,91
<b>3</b>	11,23	16,57	44,87
$\bar{x}$	10,67	17,45	45,01
s	0,57	0,77	0,84
Vk	5,34	4,41	1,87

Tabelle 9-25 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Protriptylin mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure in der Synthesemikrowelle für 10 min bei 25 °C, alle Angaben in %

### 9.3.4 Methoden und Messdaten der Umsetzung von Methyleugenol

#### HPLC-Methode

Mit dieser Methode können Methyleugenol und das entstandene Epoxid quantifiziert werden.

Säule:	Purosphere <sup>®</sup> STAR RP-18 endcapped (5µm), 250-4 (Merck)
Elutionsmittel:	Methanol/Wasser (60:40)
Flussrate:	0,5 mL/min
Wellenlänge:	230 nm
Probenvolumen:	10 µL
Dauer:	12 min
Elutionstyp:	isokratisch

#### Kalibrierung der HPLC-Methode

Für die Kalibrierung von Methyleugenol und 2-(3,4-Dimethoxybenzyl)-oxiran wurden mit Methyleugenol Lösungen fünf verschiedener Konzentrationsniveaus hergestellt und jeweils zweimal vermessen. Aus den Messergebnissen resultierte die in Abbildung 9-8 dargestellte Kalibrierkurve. Mit den für die Ausgleichsgerade angegebenen Regressionsgleichungen wurden die Konzentrationen von Methyleugenol berechnet. Da für das Epoxid wie im Fall des Protriptylins keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand und im Chromatogramm keine Nebenpeaks gegenüber dem Chromatogramm des Blindwertes detektierbar waren, wurde die Ausbeute mit Hilfe der 100 %-Methode berechnet und in Prozent angegeben. Die Werte sind als Näherung an die tatsächlichen Werte anzusehen, da sich ein möglicherweise größerer Fehler durch die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der beiden Analyten nicht vermeiden ließ.

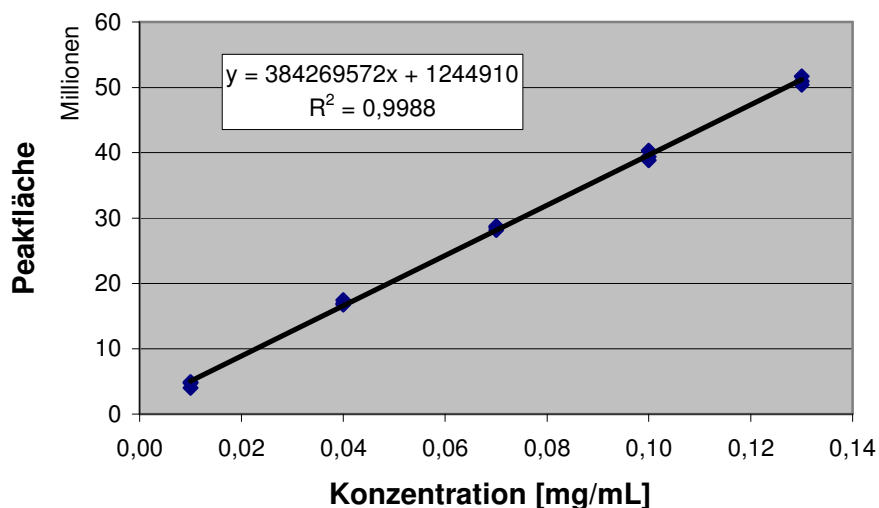


Abbildung 9-8 Kalibrierkurve zur Quantifizierung von Methyleugenol

### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit positiver Ionisierung am ESI-MS (ESI-Spannung 3,0 kV, Kapillarentemperatur 230 °C, Beschleunigungsspannung 5 kV, Scanrate 3 Scans/Dekade). Die membranfiltrierten Reaktionsansätze konnten direkt mit 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  versprüht werden. Es wurde auf die Massen von Methyleugenol von  $m/z$  178 +1 und dem Epoxid von  $m/z$  194 +1 gescannt.

### Messdaten der Umsetzung von Methyleugenol

<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	46,74	54,82	68,07
<b>2</b>	45,63	51,79	66,99
<b>3</b>	43,44	50,99	64,49
$\bar{x}$	45,27	52,53	66,52
s	1,68	2,02	1,84
Vk	3,71	3,85	2,77

Tabelle 9-26 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Methyleugenol mit MnT4MPyPCl und *m*-Chlorperoxybenzoesäure, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	AAV 10	AAV 11	AAV 12
<b>1</b>	48,34	61,10	70,67
<b>2</b>	49,11	61,03	70,53
<b>3</b>	48,21	60,76	70,10
$\bar{x}$	48,55	60,96	70,43
s	0,49	0,18	0,30
Vk	1,01	0,30	0,43

Tabelle 9-27 Variationen des Ansatzverhältnisses bei der Reaktion von Methyleugenol mit MnT4MPyPCL und *m*-Chlorperoxybenzoesäure in der Synthesemikrowelle für 10 min bei 25 °C, alle Angaben in %

### 9.3.5 Methode zur Bestimmung von Acrylamid

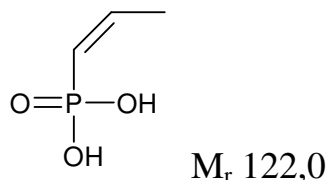
#### HPLC-Methode

Mit dieser Methode können Acrylamid und Glycidamid detektiert werden.

Säule: Purosphere®STAR RP-18 endcapped (5µm), 250-4  
(Merck)  
 Elutionsmittel: Methanol/Wasser (1:99)  
 Flussrate: 0,5 mL/min  
 Wellenlänge: 220 nm  
 Probenvolumen: 10 µL  
 Dauer: 12 min  
 Elutionstyp: isokratisch

### 9.3.6 Synthese von *cis*-1-Propenylphosphonsäure

Die Synthese von *cis*-1-Propenylphosphonsäure erfolgte in Anlehnung an die von *Hirao und Mitarbeitern*<sup>72</sup> erstellte Vorschrift zur palladiumkatalysierten Herstellung von Dialkylvinylphosphonaten. Im Anschluss daran erfolgte unmittelbar die Esterspaltung mit TMSBr ohne eine vorangehende Reinigung des Zwischenprodukts.



Zu einer Lösung aus 0,52 mL (4 mmol) Diethylphosphit, 0,55 mL (4 mmol) Triethylamin und 0,23 g (0,2 mmol) Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) in 1 mL Toluol werden 0,58 g (4,8 mmol) *cis*-1-Brom-1-propen unter Stickstoffatmosphäre hinzugefügt. Die resultierende Lösung wird drei Stunden bei 90 °C gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Diethylether wird ausgefallenes Triethylamin-Hydrobromid durch Filtration dem Reaktionsgemisch entzogen. Nach Entfernen der Lösungsmittel unter vermindertem Druck resultiert eine niedrigviskose Flüssigkeit, die in 10 mL wasserfreiem Dichlormethan aufgenommen wird. Anschließend wird nach Zugabe von 4 mL (32 mmol) TMSBr 24 Stunden unter Eiskühlung gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL wasserfreiem Tetrahydrofuran aufgenommen. Nachfolgend werden zwei Tropfen Wasser zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren wird das Lösungsmittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Es folgt eine säulenchromatographische Reinigung des Rückstands an Kieselgel mit Ethylacetat und n-Hexan.

Ausbeute: 78 % (0,38 g), schwach gelbes Öl

<sup>1</sup>H-NMR ([D<sub>6</sub>]-DMSO), δ (ppm):

1,94-1,99 (m, 3H, PCHCHCH<sub>3</sub>); 5,59-5,67 [m, 1H, PCHCHCH<sub>3</sub>];  
6,20-6,41 (m, PCHCHCH<sub>3</sub>);

Masse: m/z 121,0 [M-H]<sup>-</sup>

### 9.3.7 Methoden zur Bestimmung von Fosfomycin

#### Kapillarelektrophoretische Methode

Mit dieser Methode können *cis*-1-Propenylphosphonsäure und Fosfomycin detektiert werden.

Kapillare:	Kieselglaskapillare 50/57 cm, 50 µm ID
Hintergrundelektrolyt:	20 mM Benzoesäure und 0,3 mM Cetrimid in bidestilliertem Wasser; mit 1 M Trometamol-Lösung auf pH 8,4 eingestellt
Spannung:	- 30 kV nach 0,5 min
Polarität:	negativ
Temperatur:	25 °C
Injektion:	50 mbar für 9 s Probelösung 50 mbar für 4 s Wasser
Präkonditionierung:	2,5 min mit Hintergrundelektrolyt
Wellenlänge:	254 nm
Dauer:	10 min

#### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mit negativer Ionisierung am ESI-MS (ESI-Spannung 2,8 kV, Kapillarentemperatur 230 °C, Beschleunigungsspannung 5 kV, Scanrate 3 Scans/Dekade). Die membranfiltrierten Reaktionsansätze konnten direkt mit 200 µL/min versprüht werden. Es wurde auf die Massen von *cis*-1-Propenylphosphonsäure von  $m/z$  122 -1 und Fosfomycin von  $m/z$  138 -1 gescannt.



## 9.4 Versuche zu Abschnitt 5 (Desalkylierungen)

### 9.4.1 Methodenoptimierung mit *N*-Hydroxyharnstoff

#### Bestimmung der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff

Die Messungen erfolgten nach **AAV 8** und der entsprechenden Kalibrierung unter Verwendung einer 6 mM ethanolischen *N*-Hydroxyharnstofflösung, die unter der Zytostatikawerkbank HERAsafe® HSP 18 hergestellt wurde.

#### Messdaten der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff

Die Messwerte in nmol wurden in Bezug auf die eingesetzte Menge Substrat in Prozent angegeben.

Ansatz	NHH	NHH+PhIO	NHH+PhIO +MnT4MPyPcI	NHH+PhIO +FeT4MPyPcI	NHH+PhIO +MnTFPPcI	NHH+PhIO +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	1,93	4,44	83,35	100,02	1,22
<b>2</b>	n.d.	2,06	3,97	76,68	98,80	1,22
<b>3</b>	n.d.	1,51	4,63	70,22	99,90	1,25
$\bar{x}$	0	1,83	4,35	76,75	99,57	1,23
s	-	0,29	0,34	6,57	0,67	0,02
Vk	-	15,85	7,82	8,56	0,67	1,63

Tabelle 9-28 Vergleich der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit Iodosobenzol (PhIO) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	NHH	NHH+MMPP	NHH+MMPP +MnT4MPyPcI	NHH+MMPP +FeT4MPyPcI	NHH+MMPP +MnTFPPcI	NHH+MMPP +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	n.d.	35,11	4,52	37,93	9,02
<b>2</b>	n.d.	n.d.	38,45	4,03	34,36	8,14
<b>3</b>	n.d.	n.d.	41,85	3,78	39,50	11,11
$\bar{x}$	0	0	38,47	4,11	37,26	9,42
s	-	-	3,37	0,38	2,63	1,53
Vk	-	-	8,76	9,25	7,06	16,24

Tabelle 9-29 Vergleich der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	NHH	NHH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NHH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +MnT4MPyPcI	NHH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +FeT4MPyPcI	NHH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +MnTFPPcI	NHH+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,77	21,82
<b>2</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	32,96	22,03
<b>3</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34,91	24,32
$\bar{x}$	0	0	0	0	34,21	22,72
s	-	-	-	-	1,09	1,39
Vk	-	-	-	-	3,19	6,12

Tabelle 9-30 Vergleich der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit Wasserstoffperoxid unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	NHH	NHH+mCPBA	NHH+mCPBA +MnT4MPyPcI	NHH+mCPBA +FeT4MPyPcI	NHH+mCPBA +MnTFPPcI	NHH+mCPBA +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	10,62	10,39	23,59	31,59	11,75
<b>2</b>	n.d.	11,66	14,45	22,78	32,20	12,62
<b>3</b>	n.d.	15,39	15,32	25,56	31,73	10,98
$\bar{x}$	0	12,56	13,39	23,98	31,84	11,78
s	-	2,24	2,63	1,43	0,32	0,82
Vk	-	17,83	19,64	5,96	1,01	6,96

Tabelle 9-31 Vergleich der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit *m*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*CPBA) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	NHH	NHH+TBAP	NHH+TBAP +MnT4MPyPcI	NHH+TBAP +FeT4MPyPcI	NHH+TBAP +MnTFPPcI	NHH+TBAP +FeTFPPcI
<b>1</b>	n.d.	1,15	4,80	7,33	16,09	3,09
<b>2</b>	n.d.	1,14	4,17	6,03	14,32	3,35
<b>3</b>	n.d.	1,11	3,94	6,59	18,37	3,09
$\bar{x}$	0	1,13	4,30	6,65	16,26	3,18
s	-	0,02	0,45	0,65	2,03	0,15
Vk	-	1,77	10,47	9,77	12,48	4,72

Tabelle 9-32 Vergleich der NO-Freisetzung aus *N*-Hydroxyharnstoff (NHH) mit Tetra-*N*-butylammoniumperiodat (TBAP) unter Einfluss verschiedener Metalloporphyrine, alle Angaben in %

## 9.4.2 Desalkylierung von Roxithromycin und Ceftazidim

### Bestimmung der NO-Freisetzung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Messungen erfolgten nach **AAV 8** und der entsprechenden Kalibrierung unter Verwendung einer 6 mM ethanolischen Lösung des entsprechenden Antibiotikums. Als Lösungsmittel wurden die Puffer mit pH 4,5, pH 7,4 und pH 9,0 verwendet.

### Messdaten der NO-Freisetzung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Messwerte in nmol wurden in Bezug auf die eingesetzte Menge Substrat in Prozent angegeben.

Ansatz	pH 9,0	pH 7,4	pH 4,5	pH 9,0+Cu <sup>2+</sup>	pH 7,4+Cu <sup>2+</sup>	pH 4,5+ Cu <sup>2+</sup>
1	n.d.	0,011	n.d.	n.d.	0,032	n.d.
2	n.d.	0,012	n.d.	n.d.	0,030	n.d.
3	n.d.	0,011	n.d.	n.d.	0,032	n.d.
$\bar{x}$	0	0,011	0	0	0,031	0
s	-	0,001	-	-	0,001	-
Vk	-	9,090	-	-	3,226	-

Tabelle 9-33 NO-Freisetzung aus Roxithromycin (RXM) bei verschiedenen pH-Werten und Zusatz von Kupfer(II)-Ionen, alle Angaben in %

Ansatz	pH 9,0	pH 7,4	pH 4,5	pH 9,0+Cu <sup>2+</sup>	pH 7,4+Cu <sup>2+</sup>	pH 4,5+Cu <sup>2+</sup>
1	n.d.	0,006	0,005	n.d.	0,014	0,007
2	n.d.	0,005	0,005	n.d.	0,013	0,009
3	n.d.	0,006	0,004	n.d.	0,012	0,008
$\bar{x}$	0	0,006	0,005	0	0,013	0,008
s	-	0,001	0,001	-	0,001	0,001
Vk	-	16,667	20,000	-	7,690	12,500

Tabelle 9-34 NO-Freisetzung aus Ceftazidim (CDM) bei verschiedenen pH-Werten und Zusatz von Kupfer(II)-Ionen, alle Angaben in %

### Bestimmung der Nitrit-Bildung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Messungen erfolgten nach **AAV 9** und der entsprechenden Kalibrierung unter Verwendung von 15  $\mu\text{L}$  einer 6 mM ethanolischen Lösung des entsprechenden Antibiotikums, 100  $\mu\text{L}$  einer 6 mM Metalloporphyrinlösung und 100  $\mu\text{L}$  einer 60 mM Iodosobenzollösung. Als Lösungsmittel wurden die Puffer mit pH 4,5, pH 7,4 und pH 9,0 verwendet.

### Messdaten der Nitrit-Bildung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Messwerte in nmol wurden in Bezug auf die eingesetzte Menge Substrat in Prozent angegeben.

<b>pH 4,5</b>	5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
<b>1</b>	n.d.	1,22	1,81	1,54	0,99
<b>2</b>	n.d.	1,53	1,92	1,41	0,98
<b>3</b>	n.d.	1,72	1,68	1,32	1,08
$\bar{x}$	-0	1,49	1,80	1,42	1,02
s	-	0,25	0,12	0,11	0,06
Vk	-	16,78	6,67	7,75	5,88
<b>pH 7,4</b>					
<b>1</b>	3,85	3,85	4,24	4,32	3,31
<b>2</b>	4,02	3,23	5,31	4,41	3,51
<b>3</b>	3,57	3,44	4,29	3,1	4,32
$\bar{x}$	3,81	3,51	4,61	3,94	3,71
s	0,23	0,32	0,60	0,73	0,53
Vk	6,04	9,12	13,02	18,53	14,29
<b>pH 9,0</b>					
<b>1</b>	7,64	9,35	10,33	9,44	9,12
<b>2</b>	8,70	8,72	10,07	8,97	8,47
<b>3</b>	7,59	8,16	9,94	9,95	8,92
$\bar{x}$	7,98	8,74	10,11	9,45	8,84
s	0,63	0,60	0,20	0,49	0,33
Vk	7,89	6,86	1,98	5,19	3,73
<b>pH 9,0 + Cu<sup>2+</sup></b>					
<b>1</b>	10,31	11,03	12,94	11,92	11,93
<b>2</b>	10,01	12,74	12,04	12,94	13,43
<b>3</b>	10,12	10,92	11,98	11,82	10,99
$\bar{x}$	10,15	11,56	12,32	12,23	12,12
s	0,15	1,02	0,54	0,62	1,23
Vk	1,48	8,82	4,38	5,07	10,15

Tabelle 9-35 Nitrit-Bildung aus Roxithromycin (RXM) bei verschiedenen pH-Werten und Zusatz von Kupfer(II)-Ionen, alle Angaben in %

<b>pH 4,5</b>	5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
<b>1</b>	1,86	3,31	2,83	2,45	3,42
<b>2</b>	2,01	2,72	3,12	3,65	2,52
<b>3</b>	2,41	2,45	2,72	2,81	2,99
$\bar{x}$	2,09	2,83	2,89	2,97	2,98
s	0,28	0,44	0,21	0,62	0,45
Vk	13,4	15,55	7,27	20,88	15,10
<b>pH 7,4</b>					
<b>1</b>	4,01	4,16	3,04	4,39	3,92
<b>2</b>	3,44	3,29	4,46	4,47	3,41
<b>3</b>	3,17	3,64	4,41	3,04	4,45
$\bar{x}$	3,54	3,70	3,97	3,97	3,93
s	0,43	0,44	0,81	0,80	0,52
Vk	12,15	11,89	20,4	20,15	13,23
<b>pH 9,0</b>					
<b>1</b>	1,61	1,71	2	2,39	3,12
<b>2</b>	1,72	2,39	2,96	2,41	2,69
<b>3</b>	1,84	1,9	2,47	3,27	2,15
$\bar{x}$	1,72	2,00	2,48	2,69	2,65
s	0,12	0,35	0,48	0,50	0,49
Vk	6,98	17,5	19,35	18,58	18,49
<b>pH 9,0 + Cu<sup>2+</sup></b>					
<b>1</b>	6,89	7,28	6,2	6,62	6,92
<b>2</b>	6,59	6,87	7,29	7,41	7,12
<b>3</b>	6,79	6,36	7,21	6,76	6,72
$\bar{x}$	6,76	6,84	6,90	6,93	6,92
s	0,15	0,46	0,61	0,42	0,20
Vk	2,23	6,72	8,84	6,06	2,89

Tabelle 9-36 Nitrit-Bildung aus Ceftazidim (CDM) bei verschiedenen pH-Werten und Zusatz von Kupfer(II)-Ionen, alle Angaben in %

### Bestimmung der Nitrat-Bildung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Ansätze erfolgten analog zu denen zur Nitrit-Bestimmung unter Verwendung von 15 µL einer 6 mM ethanolischen Lösung des entsprechenden Antibiotikums, 100 µL einer 6 mM Metalloporphyrinlösung und 100 µL einer 60 mM Iodosobenzollösung. Als Lösungsmittel wurde der Puffer mit dem pH-Wert 9,0 verwendet.

### Kalibrierung für die Nitrat-Bestimmung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Da Nitrat in salzsaurer gesättigter Vanadium(III)-chloridlösung bei 95 °C zu NO reduziert wird, wurden für die Herstellung des Reduktionsgemisches 0,2 g Vanadiumchlorid mit 2 mL konz. Salzsäure versetzt und mit Wasser auf 25,0 mL aufgefüllt. 5 mL dieses Gemisches wurden im Reaktionsgefäß des NOA™ vorgelegt. Mit einer gasdichten Spritze wurden fünf definierte Volumina einer 100 µM Kaliumnitratlösung jeweils dreimal injiziert. Bei dem Auftragen der durch Integration erhaltenen Peakflächen gegen die injizierte Konzentration an Nitrat ergab sich folgende Kalibrierkurve:

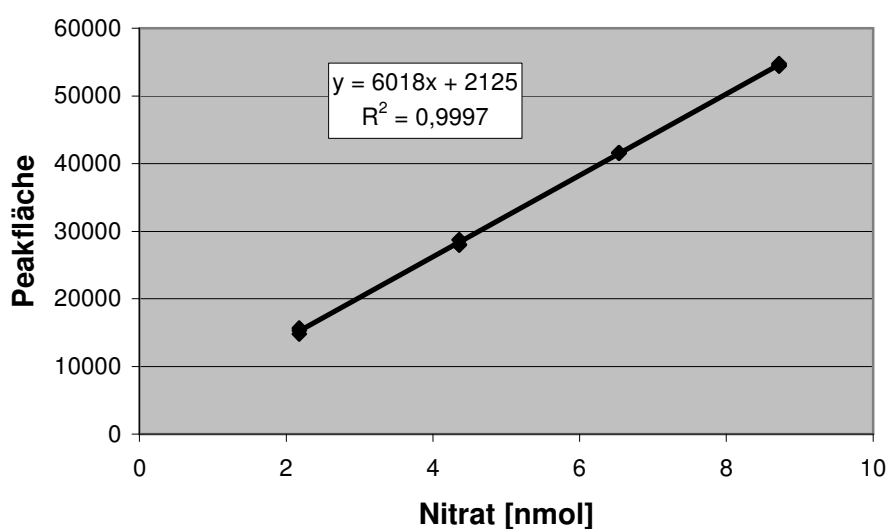


Abbildung 9-9 Kalibrierkurve für die Nitrat-Bestimmung aus Roxithromycin und Ceftazidim

### Messdaten der Nitrat-Bildung aus Roxithromycin und Ceftazidim

Die Messwerte in nmol wurden in Bezug auf die eingesetzte Menge Substrat in Prozent angegeben.

<b>pH 9,0 + Cu<sup>2+</sup></b>	Roxithromycin	Ceftazidim
<b>1</b>	14,91	9,62
<b>2</b>	15,02	9,71
<b>3</b>	14,37	9,32
$\bar{x}$	14,77	9,55
s	0,35	0,2
Vk	2,36	2,14

Tabelle 9-37 Nitrat-Bildung aus Roxithromycin und Ceftazidim bei pH 9,0 und Zusatz von Kupfer(II)-Ionen, alle Angaben in %

### **9.4.3 Hydroxylamin als Zwischenprodukt der NO-Freisetzung**

#### Bestimmung von Hydroxylamin AAV 13

Es werden 180  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Lösung des entsprechenden Antibiotikums zusammen mit 60 mg immobilisiertem MnTFPPCl (nach AAV 7) und 640  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer pH 7,4 in einem Probengefäß vorgelegt. Anschließend werden 1000  $\mu\text{L}$  einer 1 M Natriumcarbonatlösung und 1000  $\mu\text{L}$  einer 1 %igen 8-Hydroxychinolinlösung zugegeben. (Dieser Ansatz entspricht einer 6 mM Lösung des Antibiotikums.) Das Probengefäß wird für 15 Minuten mit Argon anaerobisiert und auf 37 °C temperiert. Zum Initiieren der Reaktion werden 180  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Iodosobenzollösung injiziert und der Ansatz exakt sechs Minuten geschwenkt. Aus jedem Ansatz werden dreimal mit einer gasdichten Spritze 500  $\mu\text{L}$  des Überstandes entnommen und direkt in eine Mikroküvette im UV/VIS-Spektrometer gegeben. Die spektroskopische Detektion erfolgt bei 700 nm gegen eine identisch hergestellte und behandelte Blindlösung, die kein Antibiotikum enthält ( $n = 3$ ).



### Kalibrierung der Konventionsmethode zur Hydroxylamin-Bestimmung

Für die Erstellung einer Kalibrierkurve wurden Probengefäße mit je 1000  $\mu\text{L}$  1 %iger ethanolischer 8-Hydroxychinolinlösung und 1000  $\mu\text{L}$  1 M Natriumcarbonatlösung gefüllt, verschlossen und mit Argon begast. Aus einer 30 mM Hydroxylamin-HCl-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe von 10-300  $\mu\text{M}$  angefertigt, 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und bei 700 nm gegen den Blindwert vermessen.

Nach dem Auftragen der gemessenen Absorption gegen die Konzentration wurde die in Abbildung 9-10 dargestellte Kalibrierkurve erhalten.

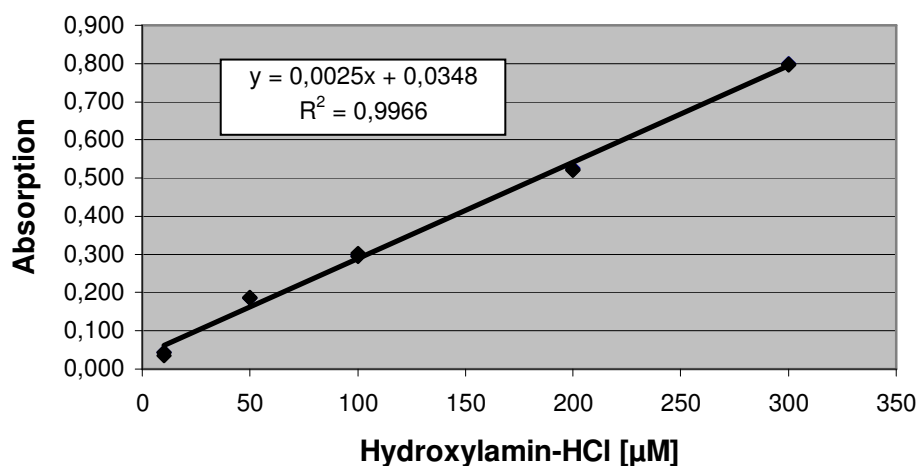


Abbildung 9-10 Kalibrierkurve für die quantitative Bestimmung von Hydroxylamin

Messdaten der Hydroxylamin-Bestimmung aus Roxithromycin und Ceftazidim

<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>1. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	89,68	80,38	81,78	
<b>2. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	87,82	79,91	81,31	
<b>3. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	87,36	79,91	81,31	
$\bar{x}$ [ $\mu\text{M}$ ]	88,29	80,07	81,47	83,27
s [ $\mu\text{M}$ ]	1,23	0,27	0,27	4,40
Vk [%]	1,39	0,34	0,33	5,28

Tabelle 9-38 Bestimmung von Hydroxylamin als Zwischenprodukt der Freisetzung von oxidierten Stickstoffspezies aus Roxithromycin

<b>Ansatz</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>1. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	135,89	139,03	125,31	
<b>2. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	134,61	139,84	123,57	
<b>3. Messung [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	133,80	138,80	122,29	
$\bar{x}$ [ $\mu\text{M}$ ]	134,77	139,22	123,72	132,57
s [ $\mu\text{M}$ ]	1,05	0,55	1,52	7,98
Vk [%]	0,78	0,39	1,23	6,02

Tabelle 9-39 Bestimmung von Hydroxylamin als Zwischenprodukt der Freisetzung von oxidierten Stickstoffspezies aus Ceftazidim

## 9.5 Versuche zu Abschnitt 6 (Hydroxylierungen)

### 9.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Hydroxylierung von Substraten mit biomimetischen Modellsystemen

#### Umsetzung in Anlehnung an Literaturvorschrift<sup>94</sup> AAV 13

Das von *Iida und Mitarbeitern* beschriebene molare Ansatzverhältnis von Metalloporphyrin zu Substrat zu Sauerstoffdonator zu Imidazol von 1:20:1884:160 wurde in dieser Vorschrift umgesetzt.

2,5  $\mu\text{mol}$  des nach AAV 7 immobilisierten Metalloporphyrins werden in einem Probengefäß vorgelegt, 50  $\mu\text{mol}$  Substrat (in 500  $\mu\text{L}$  einer wässrigen Stammlösung), 0,4 mmol Imidazol (in 500  $\mu\text{L}$  einer wässrigen Stammlösung) und 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 0,1 M HCl hinzugegeben. 4,71 mmol des Sauerstoffdonators Wasserstoffperoxid werden zuletzt zugegeben, so dass ein Probenvolumen von 2000  $\mu\text{L}$  erhalten wird.

Der Reaktionsansatz wird 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (oder entsprechend 20 Minuten bei 25 °C und 25 Watt Leistung mit Trockeneiskühlung in der Synthesemikrowelle gerührt) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, membranfiltriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter 13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$ , Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und nach einem Verdünnungsschritt (1:3) analysiert.

#### Umsetzung im molaren Ansatzverhältnis von 1:10:500 AAV 14

2,5  $\mu\text{mol}$  des nach AAV 7 immobilisierten Metalloporphyrins werden in einem Probengefäß vorgelegt, 25  $\mu\text{mol}$  Substrat (in 500  $\mu\text{L}$  einer wässrigen Stammlösung), 250  $\mu\text{M}$  Imidazol (in 500  $\mu\text{L}$  einer wässrigen Stammlösung) und der 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 0,1 M HCl als Lösungsmittel hinzugegeben. 1,25 mmol des Sauerstoffdonators Wasserstoffperoxid werden langsam unter Schwenken zugegeben, so dass ein Probenvolumen von 2000  $\mu\text{L}$  resultiert.

Der Reaktionsansatz wird 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (oder entsprechend 20 Minuten bei 25 °C und 25 Watt Leistung mit Trockeneis-

eiskühlung in der Synthesemikrowelle gerührt) und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, membranfiltriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter 13 mm, 0,45 µm, Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und nach einem Verdünnungsschritt (1:1) analysiert.

## 9.5.2 Methoden und Messdaten der Umsetzung von Phenylalanin

### HPLC-Methode

Für die Analytik von Phenylalanin, Tyrosin und DOPA wurde eine HPLC-Methode aus der Applikationsdatenbank der VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Für eine noch stärkere Trennleistung wurde in dieser Arbeit eine längere Säule verwendet. Daher mussten das Verhältnis des Elutionsmittelgemisches und die Flussrate angeglichen werden.

Säule: Purosphere<sup>®</sup>STAR RP-18 endcapped (5µm), 250-4 (Merck)  
Elutionsmittel: 20 mM Kaliumdihydrogenphosphatlösung/Methanol (98:2)  
Flussrate: 0,8 mL/min  
Wellenlänge: 254 nm  
Probenvolumen: 10 µL  
Dauer: 15 min  
Elutionstyp: isokratisch

### Kalibrierung der HPLC-Methode

Für die Kalibrierung von Phenylalanin, Tyrosin und DOPA wurden Lösungen fünf verschiedener Konzentrationsniveaus aller Analyten hergestellt und jeweils zweimal vermessen. Aus den Messergebnissen resultierte die in Abbildung 9-11 abgebildete Kalibrierkurve. Mit den für die Ausgleichsgerade angegebenen Regressionsgleichungen wurden die Konzentrationen aller Analyten berechnet.

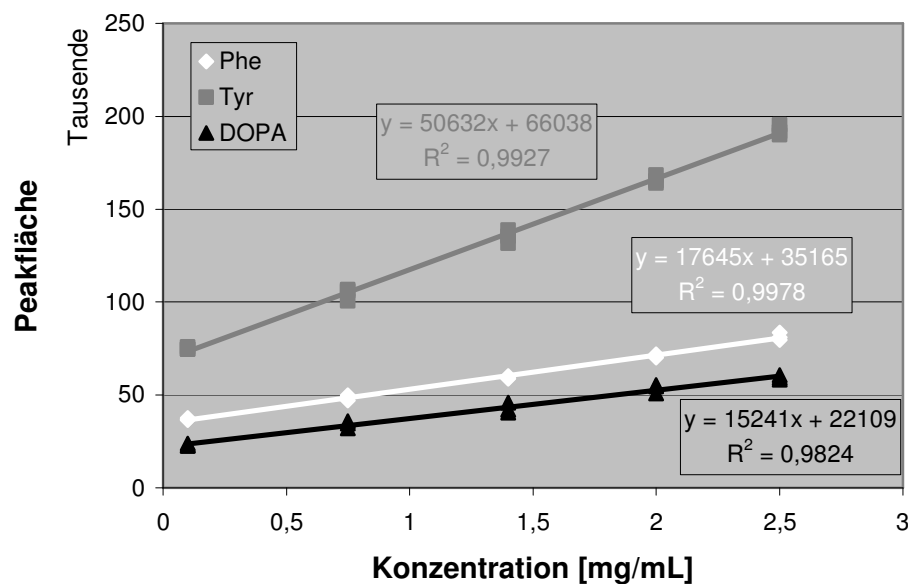


Abbildung 9-11 Kalibrierkurven zur Quantifizierung von Phenylalanin, Tyrosin und DOPA

### Messdaten der Umsetzung von Phenylalanin

Ansatz	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
1	41,83	n.d.	31,04
2	38,55	n.d.	32,72
3	39,01	n.d.	33,82
$\bar{x}$	39,80	0	32,53
s	1,78	-	1,40
Vk	4,47	-	4,30

Tabelle 9-40 Konventionelle Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer pH 7,4 nach AAV 13, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	n.d.	21,93	34,27
<b>2</b>	n.d.	22,74	31,89
<b>3</b>	n.d.	23,57	33,71
$\bar{x}$	0	22,75	33,29
s	-	0,82	1,24
Vk	-	3,60	3,72

Tabelle 9-41 Umsetzung von Phenylalanin in der Synthesemikrowelle mit Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer pH 7,4 nach AAV 13, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	43,92	n.d.	27,16
<b>2</b>	41,70	n.d.	25,58
<b>3</b>	37,26	n.d.	27,99
$\bar{x}$	40,96	0	26,91
s	3,39	-	1,22
Vk	8,28	-	4,53

Tabelle 9-42 Konventionelle Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid in 0,1 M HCl nach AAV 13, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	n.d.	23,21	41,08
<b>2</b>	n.d.	24,10	40,97
<b>3</b>	n.d.	25,38	43,29
$\bar{x}$	0	24,23	41,78
s	-	1,09	1,31
Vk	-	4,50	3,14

Tabelle 9-43 Umsetzung von Phenylalanin in der Synthesemikrowelle mit Wasserstoffperoxid in 0,1 M HCl nach AAV 13, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	62,10	7,91	23,43
<b>2</b>	63,77	5,34	21,85
<b>3</b>	59,30	8,17	24,47
$\bar{x}$	61,72	7,14	23,25
s	2,26	1,56	1,32
Vk	3,66	21,85	5,68

Tabelle 9-44 Konventionelle Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer pH 7,4 nach AAV 14, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	n.d.	19,50	32,41
<b>2</b>	n.d.	18,57	31,05
<b>3</b>	n.d.	18,30	30,70
$\bar{x}$	0	18,79	31,39
s	-	0,63	0,90
Vk	-	3,35	2,87

Tabelle 9-45 Umsetzung von Phenylalanin in der Synthesemikrowelle mit Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer pH 7,4 nach AAV 14, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	64,19	8,86	19,79
<b>2</b>	63,98	8,80	21,63
<b>3</b>	61,25	9,74	22,19
$\bar{x}$	63,14	9,13	21,20
s	1,64	0,53	1,26
Vk	2,60	5,81	5,94

Tabelle 9-46 Konventionelle Umsetzung von Phenylalanin mit Wasserstoffperoxid in 0,1 M HCl nach AAV 14, alle Angaben in %

<b>Ansatz</b>	Phenylalanin	Tyrosin	DOPA
<b>1</b>	n.d.	21,69	39,27
<b>2</b>	n.d.	19,80	37,91
<b>3</b>	n.d.	20,24	38,07
$\bar{x}$	0	20,58	38,42
s	-	0,99	0,74
Vk	-	4,81	1,93

Tabelle 9-47 Umsetzung von Phenylalanin in der Synthesemikrowelle mit Wasserstoffperoxid in 0,1 M HCl nach AAV 14, alle Angaben in %

### 9.5.3 Methode zur Bestimmung von Acetylsalicylsäure und Salicylsäure

#### Kapillarelektrophoretische Methode

Mit dieser Methode können Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und die Dihydroxybenzoesäuren (DHBA) 2,3-DHBA, 2,4-DHBA, 2,5-DHBA, 2,6-DHBA, 3,4-DHBA und 3,5-DHBA detektiert werden.

Kapillare:	Kieselglaskapillare 30/37 cm, 50 $\mu$ m ID
Hintergrundelektrolyt:	50 mM Natriumtetraborat-Puffer pH 9,3
Spannung:	12 kV nach 0,5 min
Polarität:	positiv
Temperatur:	20 °C
Injektion:	25 mbar für 5 s Probelösung
Präkonditionierung:	2 min mit 1 M NaOH, 0,5 min mit Wasser, 3,0 min mit Hintergrundelektrolytlösung
Wellenlänge:	220 nm
Dauer:	20 min



## 10 Literaturverzeichnis

1. **Lüllmann, H., Moor, K.**, *Pharmakologie und Toxikologie*, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999).
2. **Mansuy, D., Battioni, P.**, *Diversity of Reactions Catalyzed by Heme-Thiolate Proteins*, in: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, **4**, Academic Press, New York, 2000, 1-15.
3. **Lippard, S. J., Berg, J. M.**, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg (1995).
4. **Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M., Bouvier, G., Kriek, E., Bartsch, H.**, *CYP1A1 and GSTM1 Genotypes Affect Benzo[a]pyrene DNA Adducts in Smokers' Lung: Comparison with Aromatic/Hydrophobic Adduct Formation*, *Carcinogenesis*, **23**, 1969-1977 (2002).
5. **Vaz, A. D. N., McGinness, D. F., Coon, M. J.**, *Epoxidation of Olefins by Cytochrome P450: Evidence from Site-specific Mutagenesis for Hydroperoxo-iron as an Electrophilic Oxidant*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3555-3560 (1998).
6. **Langner, A.**, *Substitute and Supplementary Methods for the Study of Drug Biotransformation*, *Pharm. unserer Zeit*, **24**, 207-218 (1995).
7. **Mansuy, D.**, *Cytochrome P-450 and Synthetic Models*, *Pure Appl. Chem.*, **59**, 759-770 (1987).
8. **Mansuy, D., Battioni, P., Battioni, J.-P.**, *Chemical Model Systems for Drug-metabolizing Cytochrome-P-450-dependent Monooxygenases*, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 267-285 (1989).
9. **Mansuy, D.**, *The Great Diversity of Reactions Catalyzed by Cytochromes P 450*, *Comp. Biochem. Phys.*, **Part C 121**, 5-14 (1997).
10. **Shimidzu, T., Iyoda, T., Kanda, N.**, *Hydroxylation of Phenylalanine by Aqueous Hydrogen Peroxide in the Presence of an Artificial Water-soluble Iron Porphyrin Complex*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1206-1207.
11. **Gross, Z., Ini, S.**, *Asymmetric Catalysis by a Chiral Ruthenium Porphyrin: Epoxidation, Hydroxylation, and Partial Kinetic Resolution of Hydrocarbons*, *Org. Lett.*, **1**, 2077-2080 (1999).
12. **Mori, T., Santa, T., Higuchi, T., Mashino, T.**, *Oxygen Activation by Iron(III)-Porphyrin/NaBH<sub>4</sub>/Me<sub>4</sub>NOH System as Cytochrome P-450 Model. Oxygenation of Olefin, N-Dealkylation of Tertiary Amine, Oxidation of Sulfide, and Oxydative Cleavage of Ether Bond*, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 292-295 (1993).

13. **Meunier, B., Robert, A., Pratviel, G., Bernadou, J.,** *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations and Oxidative DNA Cleavage*, in: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, **4**, Academic Press, New York, 2000, 119-187.
14. **Jørgensen, K. A.,** *Transition-metal-catalysed Epoxidations*, *Chem. Rev.*, **89**, 431-458 (1989).
15. **Balogh, G. T., Keseru, G. M.,** *Metalloporphyrin Mediated Biomimetic Oxidations. A Useful Tool for the Investigation of Cytochrome P450 Catalyzed Oxidative Metabolism*, *ARKIVOC* **2004**, 124-139. ([www.arkat-usa.org/ark/journal/2004/I07\\_Antus/SA-974R/974R.pdf](http://www.arkat-usa.org/ark/journal/2004/I07_Antus/SA-974R/974R.pdf))
16. **Oda, Y., Imaoka, S., Nakahira, Y., Asada, A., Fujimori, M., Fujita, S., Funae, Y.,** *Metabolism of Lidocaine by Purified Rat Liver Microsomal Cytochrome P-450 Isoenzymes*, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 4439-4444 (1989).
17. **Imaoka, S., Enomoto, K., Oda, Y., Asada, A., Fujimori, M., Shimada, T., Fujita, S., Guengerich, F. P., Funae, Y.,** *Lidocaine Metabolism by Human Cytochrome P-450s Purified from Hepatic Microsomes: Comparison of Those with Rat Hepatic Cytochrome P-450s*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 1385-1391 (1990).
18. **Bargetzi, M. J., Aoyama, T., Gonzalez, F. J., Meyer, U. A.,** *Lidocaine Metabolism in Human Liver Microsomes by Cytochrome P450III A4*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **46**, 521-527 (1989).
19. **Carrier, M. N., Battioni, P., Mansuy, D.,** *Studying Drug Metabolic Oxidation with Biomimetic Metalloporphyrin Systems: Problems and Solutions in the Case of Lidocaine*, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **130**, 405-416 (1993).
20. **Wasielewski, M. R.,** *Photoinduced Electron Transfer in Supramolecular Systems for Artificial Photosynthesis*, *Chem. Rev.*, **92**, 435-461 (1992).
21. **Hill, J. S., Kahl, S. B., Stylli, S. S., Nakamura, Y., Koo, M.-S., Kaye, A. H.,** *Selective Tumor Kill of Cerebral Glioma by Photodynamic Therapy Using a Boronated Porphyrin Photosensitizer*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 12126-12130 (1995).
22. **Joussen, A. M., Kruse, F. E., Kaus, M., Volcker, H. E.,** *Endogenous Porphyrins for Photodynamic Therapy of Cataracts in Vitro*, *Der Ophthalmologe*, **94**, 428-435 (1997).
23. **Duchstein, H.-J.,** *Oxygen Activation and Deactivation in the Presence of Simple Metal-chelates*, *Free Rad. Res. Commun.*, **4**, 61-67 (1987).
24. **Ding, L., Etemad-Moghadam, G., Meunier, B.,** *Oxidative Cleavage of DNA Mediated by Hybrid Metalloporphyrin Ellipticine Molecules and Functionalized Metalloporphyrin Precursors*, *Biochemistry*, **29**, 7868-7875 (1990).

25. **Hoffmann, S.**, *Biomimetische Oxygenierungen von aromatischen Kohlenwasserstoffen - Modelle für Cytochrom P450-abhängige Reaktionen*, Dissertation Universität Hamburg, (2003).
26. **Meunier, B.**, *Metalloporphyrin-catalysed Oxygenation of Hydrocarbons*, Bull. Soc. Chim. Fr., **1986**, 578-594.
27. **Zhang, R., H., H. J., Newcomb, M.**, *Laser Flash Photolysis Generation and Kinetic Studies of Porphyrin-manganese-oxo Intermediates. Rate Constants for Oxidations Effected by Porphyrin-Mn(V)-oxo Species and Apparent Disproportionation Equilibrium Constants for Porphyrin-Mn(IV)-oxo Species*, J. Am. Chem. Soc., **127**, 6573-6582 (2005).
28. **Battioni, P., Lallier, J.-P., Barloy, L., Mansuy, D.**, *Monooxygenase-like Oxidation of Hydrocarbons using Supported Manganese-Porphyrin Catalysts: Beneficial Effects of a Silica Support for Alkane Hydroxylation*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., **16**, 1149-1151 (1989).
29. **Traylor, T. G., Byun, Y. S., Traylor, P. S., Battioni, P., Mansuy, D.**, *Polymeric Polyhalogenated Metalloporphyrin Catalysts for Hydroxylation of Alkanes and Epoxidation of Alkenes*, J. Am. Chem. Soc., **113**, 7821-7823 (1991).
30. **Traylor, P. S., Dolphin, D., Traylor, T. G.**, *Sterically Protected Hemins with Electronegative Substituents: Efficient Catalysts for Hydroxylation and Epoxidation*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., **1984**, 279-80.
31. **Bartoli, J. F., Brigaud, O., Battioni, P., Mansuy, D.**, *Hydroxylation of Linear Alkanes Catalysed by Iron Porphyrins: Particular Efficacy and Regioselectivity of Perhalogenated Porphyrins*, J. Chem. Soc., Chem. Commun., **12**, 440-442 (1991).
32. **Prince, S., Korber, F., Cooke, P. R., Smith, J. R. L., Mazid, M. A.**, *Structure of Monomeric Hydrated Manganese(III) tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin Pentachloride*, Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun., **49**, 1158-60 (1993).
33. **Zakrzewski, J., Cesario, M., Guilhelm, J., Giannotti, C.**, *Reduction of [FeIII(tfpp)Cl][tfpp = 5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorophenyl)porphyrinate] by Azaferrocene. The Crystal Structure of [FeII(tfpp){Fe(C5H5)(C4H4N)}2]*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **1992**, 3059-3060.
34. **SYBYL 7.0, T. I., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA,**
35. **Bonnet, R., Dimsdale, M. J.**, *The Meso-Reactivity of Porphyrins and Related Compounds. Part V. The Meso-Oxidation of Metalloporphyrins*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2540-2548 (1972).

36. **Schaefer, W. H., Harris, T. M., Guengerich, F. P.**, *Characterization of the Enzymic and Nonenzymic Peroxidative Degradation of Iron Porphyrins and Cytochrome P-450 Heme*, *Biochemistry*, **24**, 3254-63 (1985).
37. **Lucas, H. J., Kennedy, E. R.**, *Iodoxybenzene, I. Disproportionation of Iodosobenzene*, *Org. Synth.*, **22**, 72-72 (1942).
38. **Lichtenberger, F., Nastainczyk, W., Ullrich, V.**, *Cytochrome P450 as an Oxene Transferase*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 939-946 (1976).
39. **Tabushi, I.**, *Reductive Dioxygen Activation by Use of Artificial P-450 Systems*, *Coord. Chem. Rev.*, **86**, 1-42 (1988).
40. **Baciacchi, E., Lanzalunga, O., Lapi, A.**, *Formation of Quinones in the Iron Porphyrin Catalyzed Oxidation of Benzene and Alkylbenzenes by Magnesium Monoperoxyphthalate*, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3547-3548 (1995).
41. **Takata, T., Ando, W.**, *Mild and Selective Oxygen Atom Transfer: Tetrabutylammonium Periodate (Bu<sub>4</sub>NIO<sub>4</sub>) with Metalloporphyrins*, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3631-4 (1983).
42. **Hildebrandt, H.**, *Psyhyrembel, Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin (1998).
43. **Rickerts, B.**, *Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Oximen und Dephostatinderivaten*, Dissertation Universität Hamburg, (2005).
44. **Kim, C. J., Chang, Y. K., Chun, G.-T., Jeong, Y.-H., Lee, S. J.**, *Continuous Culture of Immobilized Streptomyces Cells for Kasugamycin Production*, *Biotechnol. Prog.*, **17**, 453-461 (2001).
45. **Kennedy, J. F., Melo, E. H. M., Jumel, K.**, *Immobilized Enzymes and Cells*, *Chem. Eng. Prog.*, **86**, 81-89 (1990).
46. **Bedioui, F.**, *Zeolite-encapsulated and Clay-intercalated Metal Porphyrin, Phthalocyanine and Schiff-base Complexes as Models for Biomimetic Oxidation Catalysts: an Overview*, *Coord. Chem. Rev.*, **144**, 39-68 (1995).
47. **Mori, T., Santa, T., Hirobe, M.**, *Synthesis and Cytochrome P-450-like Reactivity of Polypeptide-bound Porphyrinatoiron(III)*, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 5555-5558 (1985).
48. **Nenoff, T. M., Showalter, M. C., Salaz, K. A.**, *Supported Metalloporphyrins Catalyze the Oxidation of Isobutane by Dioxygen*, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **121**, 123-129 (1997).
49. **Battioni, P., Bartoli, J. F., Mansuy, D., Byun, Y. S., Traylor, T. G.**, *An Easy Access to Polyhalogenated Metalloporphyrins Covalently Bound to Polymeric Supports as Efficient Catalysts for Hydrocarbon Oxidation*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **15**, 1051-1053 (1992).

50. **Gaget, C., Morel, D., Traoré, M., Serpinet, J.**, *Analyse des Silices Greffées par Attaque au Moyen d'Acide Fluorhydrique Aqueux et Chromatographie en Phase Gazeuse*, *Analisis*, **12**, 386-392 (1984).
51. **Lidström, P., Tierney, J., Wathey, J., Westman, J.**, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, *Tetrahedron*, **57**, 9225-9283 (2001).
52. **Dzierba, C. D., Combs, A. P.**, *Microwave-assisted Chemistry as a Tool for Drug Discovery*, *Ann. Rep. Med. Chem.*, **37**, 247-256 (2002).
53. **Varma, R. S., Dahiya, R., Saini, R. K.**, *Iodobenzene Diacetate on Alumina: Rapid Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds in Solventless System Using Microwaves*, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7029-7032 (1997).
54. **Varma, R. S., Saini, R. K., Dahiya, R.**, *Active Manganese Dioxide on Silica: Oxidation of Alcohols under Solvent-free Conditions Using Microwaves*, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7823-7824 (1997).
55. **Hashemi, M. M., Rahimi, A., Karimi-Jaberi, Z., Ahmadibeni, Y.**, *A Mild and Efficient Oxidation of Benzylic Alcohols without Solvent using Iodic Acid Supported on Wet Montmorillonite K10 or Silica Gel under Microwave Irradiation*, *Acta Chim. Slov.*, **52**, 86-87 (2005).
56. **Runge, I.**, *Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Hydroxyimino-Verbindungen und Organischen Nitraten*, Dissertation Universität Hamburg, (2000).
57. **Runge, I., Duchstein, H.-J.**, *Model Reactions for the Release of Nitric Oxide from Different 2-Hydroxyimino-compounds under Oxidative Conditions*, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **333**, 26 (2000).
58. **Wang, C., 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.*, **121**, 12094-12103 (1999).
59. **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.*, 165-168 (1998).
60. **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.*, **12**, 952-957 (1999).
61. **Okazaki, O., Persmark, M., Guengerich, F. P.**, *N-Nitroso-N-methylvinylamine: Reaction of the Epoxide with Guanyl and Adenyl Moieties to Yield Adducts Derived from Both Parts of the Molecule*, *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 168-173 (1993).
62. **Guengerich, F. P.**, *Cytochrome P450 Oxidations in the Generation of Reactive Electrophiles: Epoxidation and Related Reactions*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **409**, 59-71 (2003).

63. **Wood, M. L., Smith, J. R. L., Garner, R. C.,** *Aflatoxin B1 Activation to a Plasmid Mutagen by a Chemical Model of Cytochrome P-450*, *Mutation Res.*, **176**, 11-20 (1987).
64. **Traylor, T. G., Nakano, T., Dunlap, B. E., Traylor, P. S., Dolphin, D.,** *Mechanisms of Hemin-catalyzed Alkene Epoxidation. The Effect of Catalyst on the Regiochemistry of Epoxidation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2782-2784 (1986).
65. **Groves, J. T., Lee, J., Marla, S. S.,** *Detection and Characterization of an Oxomanganese(V) Porphyrin Complex by Rapid-Mixing Stopped-Flow Spectrophotometry*, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6269-6273 (1997).
66. **Frigerio, A., Cavo-Briones, M., Belvedere, G.,** *Formation of Stable Epoxides in the Metabolism of Tricyclic Drugs*, *Drug Metab. Rev.*, **5**, 197-218 (1976).
67. **Liu, M.-H., Su, Y. O.,** *Selective Electrocatalysis of Alkene Oxidations in Aqueous Media. Electrochemical and Spectral Characterization of Oxo-ferryl Porphyrin, Oxo-ferryl Porphyrin Radical Cation and Their Reaction Products with Alkenes at Room Temperature*, *J. Electroanal. Chem.*, **452**, 113-125 (1998).
68. **Iten, F., Saller, R., Reichling, J.,** *Sind Naturprodukte mit Methyleugenol kanzerogen?*, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **28**, 42-49 (2004).
69. **Spreitzer, H.,** *Acrylamid - ein "übersehenes" Lebensmittelgift*, *Österr. Apoth. Ztg.*, **19**, 10-22 (2003).
70. **Sumner, S. C. J., Fennell, T. R., Moore, T. A., Chanas, B., Gonzalez, F., Ghanayem, B. I.,** *Role of Cytochrome P450 2E1 in the Metabolism of Acrylamide and Acrylonitrile in Mice*, *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1110-1116 (1999).
71. **Friedman, M.,** *Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamid. A Review*, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4504-4526 (2003).
72. **Hirao, T., Masunaga, T., Yamada, N., Ohshiro, Y., Agawa, T.,** *Palladium-catalyzed New Carbon-Phosphorus Bond Formation*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 909-913 (1982).
73. **Leveque, D., Gallion, C., Tarral, E., Monteil, H., Jehl, F.,** *Determination of Fosfomycin in Biological Fluids by Capillary Electrophoresis*, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, **655**, 320-324 (1994).
74. **Petsch, M., Mayer-Helm, B. X., Sauermann, R., Joukhadar, C., Kenndler, E.,** *Capillary Electrophoresis Analysis of Fosfomycin in Biological Fluids for Clinical Pharmacokinetic Studies*, *Electrophoresis*, **25**, 2292-2298 (2004).
75. **Wang, X.-Y., Shi, H.-C., Xu, S.-Y.,** *Kinetics and Mechanism on the Epoxidation of cis-1-Propenylphosphonic Acid in H<sub>2</sub>O Catalyzed by Tungstate(VI) or Molybdate (VI)*, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **206**, 213-223 (2003).

76. **Pautet, F., Barret, R., Daudon, M.,** *Optimization of Biomimetic Oxidation Reactions Involving the Iodosylbenzene-meso-tetraphenylporphyrinatoiron(III) Chloride System: Application to Antergan*, *Pharm. Acta Helv.*, **63**, 140-144 (1988).
77. **Culmsee, C., Gerling, N., Landshammer, S., Rickerts, B., Duchstein, H.-J., Umezawa, K., Klumpp, S., Kriegelstein, J.,** *Nitric Oxide Donors Induce Neutrophin-like Survival Signaling and Protect Neurons Against Apoptosis*, *Mol. Pharmacol.*, **68**, 1006-1017 (2005).
78. **King, S. B.,** *The Nitric Oxide Producing Reactions of Hydroxyurea*, *Curr. Med. Chem.*, **10**, 427-452 (2003).
79. **Zhong, D., Li, X., Wang, A., Xu, Y., Wu, S.,** *Identification of the Metabolites of Roxithromycin in Humans*, *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 552-559 (2000).
80. **Aktan, B., Taysi, S., Gümüstekin, K., Ücüncü, H., Memisogullari, R., Save, K., Bakan, N.,** *Effect of Macrolide Antibiotics on Nitric Oxide Synthase and Xanthine Oxidase Activities, and Malondialdehyde Level in Erythrocyte of the guinea pigs with Experimental Otitis Media with Effusion*, *Pol. J. Pharmacol.*, **55**, 1105-1110 (2003).
81. **Leroy, A., Fillastre, J. P., Humbert, G., Borsa, F., Leguy, F., Spencer, G. R.,** *Pharmacokinetics of Ceftazidime in Healthy and Renal Failure Subjects*, *Presse Méd.*, **17**, 1917-1920 (1988).
82. **Berg, R., Becker, E.,** *Ein neuer Nachweis von Hydroxylamin durch Bildung von Chinolinchinon-(5.8)-[8-oxychinolyl-5-imid]-(5), genannt "Indo-oxin"*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **73**, 172-173 (1940).
83. **Bacocchi, E., Lanzalunga, O., Lapi, A., Manduchi, L.,** *Kinetic Deuterium Isotope Effect Profiles and Substituent Effects in the Oxidative N-Demethylation of N,N-Dimethylanilines Catalyzed by Tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin(III) Chloride*, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5783-5787 (1998).
84. **Chauhan, S. M. S., Sahoo, B. B.,** *Biomimetic Oxidation of Ibuprofen with Hydrogen Peroxide Catalysed by Horseradish Peroxidase (HRP) and 5,10,15,20-Tetrakis-(2',6'-dichloro-3'-sulphonatophenyl)porphyrinatoiron(III) and Manganese(III) Hydrates in AOT Reverse Micelles*, *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 2629-2634 (1999).
85. **Chandra, S.,** *EPR and Electronic Spectral Studies on Copper(II) Complexes of Some NO Donor Ligands*, *J. Indian Chem. Soc.*, **81**, 203-206 (2004).
86. **Chakravorty, A.,** *Structural Chemistry of Transition Metal Complexes of Oximes*, *Coord. Chem. Rev.*, **13**, 1-46 (1974).
87. **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.*, **156**, 333-362 (1996).

88. **Jousserandot, A., Boucher, J.-L., Henry, Y., Nikolaus, 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*, **37**, 17179-17191 (1998).
89. **Seddon, T., Michelle, I., Chenery, R. J.**, *Comparative Drug Metabolism of Diazepam in Hepatocytes Isolated from Man, Rat, Monkey and Dog*, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1657-1665 (1989).
90. **Othman, S., Mansuy-Mouries, V., Benzoussan, C., Battioni, P., Mansuy, D.**, *Hydroxylation of Diclofenac: an Illustration of the Complementary Roles of Biomimetic Metalloporphyrin Catalysts and Yeasts Expressing Human Cytochromes P450 in Drug Metabolism Studies*, *C. R. Acad. Sci., Ser. IIC: Chim.*, **3**, 751-755 (2000).
91. **Woggon, W.-D.**, *Modelle für Cytochrom P450*, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **36**, 890-895 (1988).
92. **Mancy, A., Antignac, M., Minoletti, C., Dijols, S., Mouries, V., Ha-Duong, N.-T., Battioni, P., Dansette, P. M., Mansuy, D.**, *Diclofenac and Its Derivatives As Tools for Studying Human Cytochromes P450 Active Sites: Particular Efficiency and Regioselectivity of P450 2Cs*, *Biochemistry*, **38**, 14264-14270 (1999).
93. **Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M.**, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg (1998).
94. **Iida, K., Nango, M., Okada, K., Matsumoto, S., Matsuura, M., Yamashita, K., Tsuda, K., Kurono, Y., Kimura, Y.**, *Ring Hydroxylations of Aromatic Amino Acid Derivatives and Toluene by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Manganese Halogenated Porphyrins in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O and Lipid Bilayers*, *Chem. Lett.*, 1307-1310 (1994).
95. **Saltzman, H., Sharefkin, J. G.**, *Iodosobenzene*, *Org. Synth.*, **43**, 60-61 (1963).
96. *Europäisches Arzneibuch 4.00*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn (2002).



## 11 Anhang: Gefahrstoffe

Lösungsmittel	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Acetonitril	T, F	11-23/24/25	16-27-45
Cyclohexan	Xn, F, N	11-38-50/53-65-67	2-9-16-33
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylenglycoldimethyl-ether	T	10-19-60-61	45-53
Dimethylformamid	T	20/21-36-61	45-53
Eisessig	C	10-35	23-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Methanol	T, F	11-23/24/25-36/37/38	7-16-36/37-45
Tetrahydrofuran	Xi, F	11-19-36/37	2-16-29-33
Toluol	Xn, F	11-20	16-25-29-33

Reagenzien	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetylsalicylsäure	Xn	22	-
Acrylamid	T	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45
Aminopropyl-Kieselgel	-	-	24/25
Ammoniak	C, N	34-50	26-29-36/37/39-45
Ammoniumsulfid	F, C	11-31-34	16-23-26-36/37/39-45
Argon	F <sup>+</sup>	12	9-16-33
Borsäure	-	-	-
<i>cis</i> -1-Brom-1-propen	F	11-36/37/38	16-26-37/39
Carbamazepin	Xn	22-42/43	22-24-27

Carbamazepin-10,11-epoxid	Xn	22-36/37/38	26-36
Ceftazidim	Xn	42/43	22-36/37-45
Cetrimid	Xn, N	22-36/38-50/53	26-39-61
<i>m</i> -Chlorperoxybenzoesäure	O, Xi	5-8-36/37/38	17-26-36
Citronensäure Monohydrat	Xi	36	26
Cyclohexanonoxim	Xn	22	24/25
Diethylphosphit	Xi	36/37/38	26-37
2,3-DHBA	Xi	36/37/38	26-36
2,4-DHBA	Xi	36/37/38	26-36
2,5-DHBA	Xi	22-36/37/38	26-36
2,6-DHBA	Xi	36/37/38	26-36
3,4-DHBA	Xi	36/37/38	26-36
3,5-DHBA	Xi	36/37/38	26-36
Dinatriumhydrogenphosphat	-	-	24/25
DOPA	Xn	36/37/38	26-36
8-Hydroxychinolin	Xn	20/22	24/25
<i>N</i> -Hydroxyharnstoff	T	46-61	53-45
Hydroxylamin-HCl	Xn	22-36/38-43-48/22-50	22-24-37-61
4-Hydroxybenzoesäure	Xi	36/37/38	26-36
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Iodosobenzoldiacetat	T	8-22	22-24/25-17-36-60
Kaliumhexacyanoferrat(II)	-	52/53	50-61
Kaliumiodid	-	36/37/38-42/43-63	22-26-36
Kaliumnitrat	O	8-22-36/37/38	7-17-26-36
Kaliumnitrit	O, T, N	8-25	45
Kieselgel 60	-	-	22
Kupfer(II)sulfat	Xn, N	22-36/38	22
Lanthannitrat	O, Xi	41	26-39

Magnesiummonoperoxyphthalat	Xi, O	8-36/37/38	17-26-37-60
Methyleugenol	Xn	22-36/37/38-40	26-36/37/39
Mn/FeT4MPyPCL	Xi	36/37/38	26-36
Mn/FeTFPPCL	Xi	36/37/38	26-36
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumfluorid	T	26-32-36/38	22-36-45
Natriumhydroxid	C	35	1/2-26-37/39-45
Natriumtetraborat	Xn	62	36/37
Natronlauge 1 M	C	34	26-36/37/39-45
Natronlauge 3 M	C	35	26-36/37/39-45
Protriptylin	Xn	22-42/43	22-24-27
Roxithromycin	Xn	42/43	24-37-45
Salicylsäure	Xn	22-41	22-24-26-39
Salzsäure 0,1 M	-	-	-
Salzsäure 2 M	Xi	36/37/38	36/37/39
Salzsäure konz.	C	35-36/37/38	2-26
Schwefelsäure konz.	C	35	26-30-45
Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0)	-	-	22-24
Tetra- <i>N</i> -butylammoniumperiodat	O, Xi	8-36/37/38	17-26-36
Triethylamin	C, F	11-20/21/22-35	1/2-26-36/37/39-45
Trimethylsilylbromid	C	10-14-34-37	7/9-26-36/37/39-45
Trometamol	Xi	36/38	-
Vanadium(III)-chlorid	C	22-34	20-26-36/37/39-45-60
Wasserstoffperoxid 30 %	C	34	1/2-3-28-36/39



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Andrea Nicola Lübbe  
 Geburtsdatum: 17. März 1978  
 Geburtsort: Hamburg

### Schulbildung

1984 – 1988 Grundsule Kerschensteinerstraße, Hamburg  
 1988 – 1997 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg  
 Abitur

### Studium

1997 – 2002 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg  
 2002 – 2003 Praktisches Jahr im Rahmen der Approbationsordnung für Apotheker in der Neuen Barmbeker Apotheke, Hamburg und in der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein  
 Mai 2003 Approbation als Apothekerin

### Promotion

2002-2003 Landesgraduiertenstipendium der Nachwuchsförderung, Universität Hamburg  
 Anfertigung einer Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein  
 seit Oktober 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie, Betreuung des Praktikums „Arzneistoffanalytik unter besonderer Berücksichtigung der Arzneibücher (Qualitätskontrolle und -sicherung bei Arzneistoffen) und der entsprechenden Normen bei Medizinprodukten“

### Berufstätigkeit

seit Mai 2003 Teilzeitbeschäftigung als Apothekerin in der Neuen Barmbeker Apotheke, Hamburg