

**Darstellung und Reaktionen von aktiven  
Stickstoffspezies mit DNA/RNA-Teilstrukturen  
als biologische Zielmoleküle**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg  
Fachbereich Chemie

vorgelegt von

**Ulrich Riederer**

aus Zwickau

Hamburg 1999

Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Duchstein

Prof. Dr. D. Geffken

Tag der mündlichen Prüfung:

4.Februar.2000

**Für meine Eltern,**

ohne deren unermüdlichen Einsatz bei den Behörden  
ich in der DDR nie hätte Abitur machen dürfen.



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1996 bis Dezember 1999 im Institut für Pharmazie der Universität Hamburg auf Anregung und unter Leitung von

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

dem ich für die Überlassung des Themas, seine zahlreichen Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft und engagierte Betreuung herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. D. Geffken

möchte ich für die Übernahme des Koreferats herzlich danken.

Ferner danke ich dem AK Prof. Dr. J. B. Mielck für Möglichkeit der Gefrier-trocknung, Herrn Dr. T. Keim für die stete Hilfe bei den LC-MS Messungen in Klein-Flottbek, Herrn Oldenburg von der Firma Merck-Darmstadt, Frau C. Bostedt und allen anderen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## Abkürzungsverzeichnis

aromat.	aromatisch
Ber.	berechnet
$\delta$	chemische Verschiebung
d	Dublett
(d <sub>6</sub> -DMSO)	deutertes Dimethylsulfoxid
Gef.	gefunden
Hz	Hertz
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante
m	Multipllett
ppm	parts per million
q	Quartett
quart.	quartär
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Tripllett
tert.	tertiär
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
DC	Dünnschichtchromatogramm
TMS	Tetramethylsilan
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPLC-MS	HPLC-Massenspektrometrie
DAD	Dioden-Array-Detektor
M	mol/L
APCI (API-CI)	Atmospheric-Pressure Chemical Ionisation
API-ES	Atmospheric-Pressure Ionisation-Electrospray

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Entwicklung von Methoden zur Darstellung der reaktiven Stickstoffspezies, Umsetzung der DNA/RNA-Teilstrukturen und Identifizierung der Produkte.....</b>	<b>27</b>
2.1	Darstellung der reaktiven Spezies .....	27
2.1.1	Methode 1: Reaktion von Ozon mit Azid-Ionen .....	28
2.1.2	Methode 2: Autoxidation von Hydroxylamin .....	28
2.1.3	Methode 3: Reaktion von Wasserstoffperoxid mit salpetriger Säure .....	29
2.1.4	Methode 4: Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Alkylnitriten .....	31
2.1.5	Methode 5: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Wasserstoffperoxid.....	32
2.1.6	Methode 6: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit festem Kaliumsuperoxid (KO <sub>2</sub> ).....	33
2.1.7	Methode 7: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Tetramethylammonium-superoxid .....	34
2.1.8	Methode 8: Photolyse von festem Natriumnitrat.....	34
2.1.9	Überblick der Kontaminationen in den einzelnen Methoden.....	35
2.2	Der verwendete Quenched Flow Reaktor.....	38
2.3	Zur Synthese von Peroxynitrit mittels Gasbürette.....	43
2.4	Umsetzung der Kernbasen mit den reaktiven Spezies .....	46
2.4.1	Zur Umsetzung mit Stickstoffdioxid (NO <sub>2</sub> ) .....	48
2.4.2	Zur Umsetzung mit Stickstoffmonoxid (NO).....	50
2.4.3	Die Umsetzungen mit Peroxynitrit .....	52
2.5	Das analytische Konzept.....	58

<b>3</b>	<b>Reaktionen mit den Kernbasen .....</b>	<b>68</b>
3.1	Reaktion der Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies.....	68
3.1.1	Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid.....	68
3.1.2	Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffdioxid.....	72
3.1.3	Ergebnisse der Umsetzungen mit Peroxynitrit .....	77
3.2	Reaktionen der Purinbasen mit den reaktiven Spezies .....	78
3.2.1	Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid.....	78
3.2.2	Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffdioxid.....	80
3.2.3	Ergebnisse der Umsetzung mit Peroxynitrit .....	85
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>Summary .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>103</b>
6.1	Verzeichnis der Geräte und Analysenmethoden.....	103
6.2	Darstellung von Peroxynitrit.....	117
6.2.1	„Quenched Flow Methode“ .....	117
6.2.2	Reaktion von Kaliumsuperoxid mit Stickstoffmonoxid .....	119
6.2.3	Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Stickstoffdioxid.....	120
6.2.4	Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Stickstoffmonoxid.....	120
6.2.5	Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Peroxynitrit .....	121
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Anhang: Gefahrstoffe .....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>140</b>

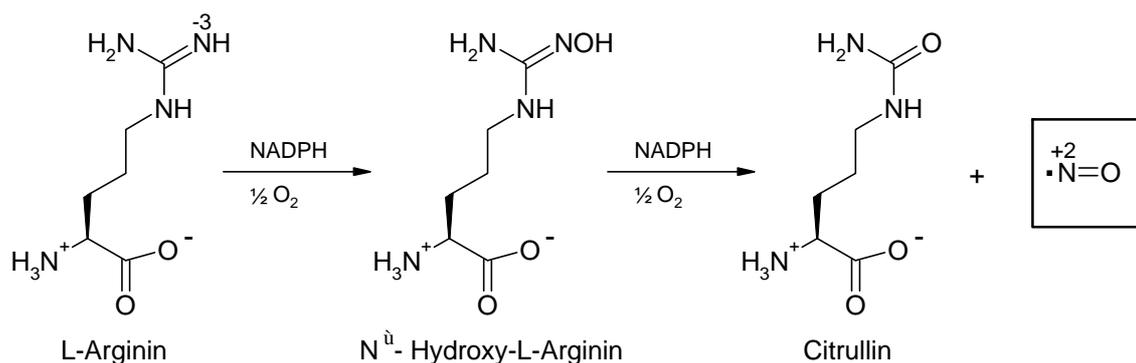
# 1 Einleitung und Problemstellung

1980 wurde die gefäßerweiternde Substanz EDRF (Endothelium derived relaxing factor) im Endothel von Blutgefäßen entdeckt. Wenige Jahre später stellte sich heraus, daß EDRF mit NO (Stickstoffmonoxid) identisch war<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>), dessen gefäßerweiternde Wirkung durch Arzneistoffe wie Natriumnitroprussid, Glyceroltrinitrat und Molsidomin bereits seit langem genutzt wird. Diese Pharmaka stellen als sogenannte NO-Donatoren (exogenes NO) eine Substitutionstherapie für endogen gebildetes NO dar<sup>6</sup>).

In jüngster Zeit testen Ärzte den Einsatz von NO-Gas (20 ppm in Stickstoff<sup>1</sup>) als inhalatives Arzneimittel gegen das oft lebensbedrohende akute Atemnotsyndrom<sup>7</sup>) und bei der operativen Beatmung von Säuglingen mit angeborenem Herzfehler. Der große Vorteil gegenüber systemischen Vasodilatoren ist die lokal begrenzte Wirkung. Toxische Nebenreaktionen konnten bisher nicht beobachtet werden.

Im Organismus wurde die Biosynthese von NO aus L-Arginin aufgeklärt<sup>1, 8, 9</sup>) (siehe Schema 1-1), sowie eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von NO nachgewiesen.

## Schema 1-1 Biosynthese von NO



<sup>1</sup> Im Zigarettenrauch werden bis zu tausend ppm (parts per million) NO gefunden!

In den meisten biologisch aktiven Stickstoffverbindungen besitzt der Stickstoff einen negativen Oxidationszustand (Aminosäuren, Peptide, Nucleinsäuren, Amine usw.). Sogar bei dem durch Bakterien vermittelten Stickstoffzyklus wird der Oxidationszustand  $-3$  nicht verlassen. Deshalb war es eine besonders entscheidende Entdeckung des letzten Jahrzehnts, daß die einzige bis jetzt bekannte Ausnahme dieser Regel in der Anwesenheit von NO in Säugetierzellen besteht.

Die biologischen Eigenschaften (siehe Abbildung 1.1), die dem NO zugeschrieben werden, sind so vielfältig und teilweise gegensätzlich, daß das NO nicht allein dafür verantwortlich gemacht werden kann.

Dies stellt auch einen Grund dar, weshalb die Entdeckung des NO als biologisch potentes Molekül erst Mitte der 80er Jahre stattfand. Bis dahin wurden biologische Effekte beschrieben, ohne den genauen Grund dafür zu kennen. Einem kleinen, aus zwei Atomen bestehenden Molekül ist die Rolle als biologischem Alleskönner bis dahin nicht zugetraut worden. Zu einem überwiegenden Teil sind biologische Vorgänge im Körper durch komplex aufgebaute und wirkende Verbindungen gesteuert (Hormone, Enzyme usw.). Welche biologischen Effekte des NO sind bis heute bekannt?

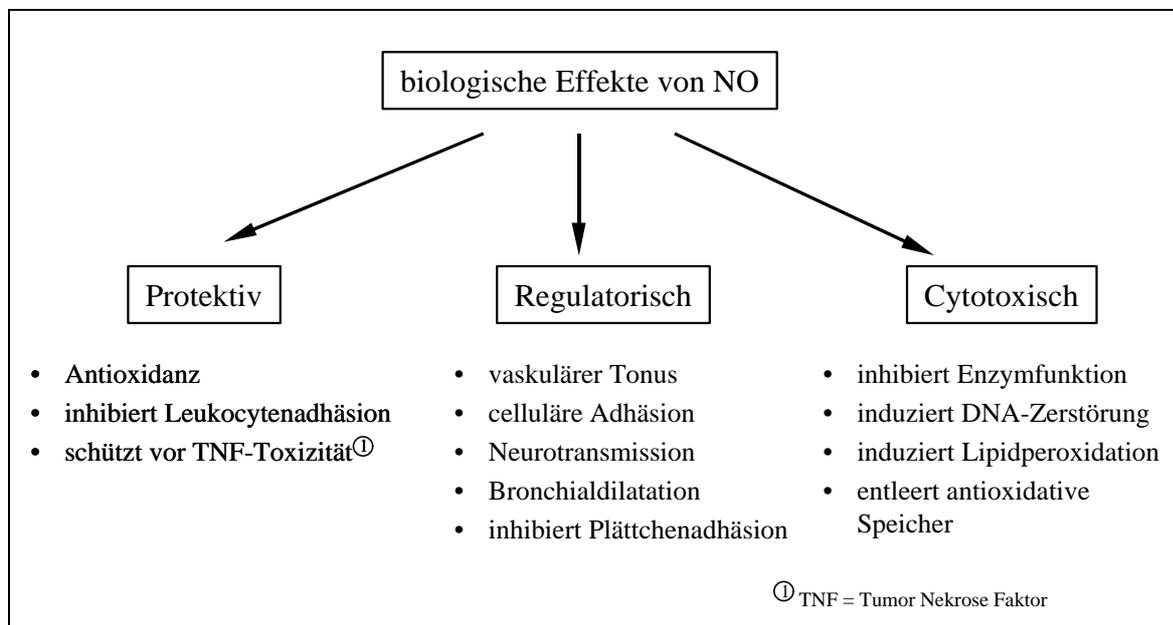


Abbildung 1.1

Biologische Funktionen von NO

Nach der Entdeckung des NO bezüglich seiner *in vivo*-Bedeutung gab es eine Flut neuer Erkenntnisse. Die zwei Gesichter des NO *in vivo* (positive wie negative Wirkungen) bereiteten lange Zeit einen nicht erklärbaren Widerspruch und eröffneten ein neues Forschungsgebiet.

Je nach Angriffspunkt und Zelle kann NO gegensätzlich wirken. In niedrigen Konzentrationen dient es als intrazellulärer Botenstoff, dagegen können höhere Konzentrationen von NO Zellen zerstören (Cytotoxizität). Dies ist bei der Immunabwehr eingedrungener Erreger erwünscht, bei Autoimmunerkrankungen und Entzündungsreaktionen wird der Organismus jedoch durch seine eigene erhöhte NO-Bildung geschädigt.

Auch im Gefäßsystem kann NO je nach Konzentration nützen oder schaden. Während es in physiologischen Konzentrationen den Blutdruck senkt, fördert ein Überschuß an NO nach Endothelschäden arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße.

Diese Ambivalenz des NO, Botenstoff und Zellgift, wird besonders im Nervensystem, bei der Immunabwehr (Abwehr von Bakterien und Parasiten bei der Phagocytose, aber auch Transplantatabstoßung) und im kardiovaskulären System deutlich.

Im ZNS besteht ein konzentrationsabhängiger Übergang vom Botenstoff zum Zellgift. In Gegenwart hoher Konzentrationen von Glutamat (z.B. zerebraler Ischämie, Gehirnschlag) kommt es durch langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und Aktivierung der NO-Synthase I (siehe Schema 1-2) zu einer überschießenden NO-Bildung. Das so gebildete NO tötet benachbarte Neurone ab und führt zum bekannten Krankheitsbild.

Auf der anderen Seite ist der neuroprotektive Effekt auch auf gebildetes NO zurückzuführen. Hier werden durch S-Nitrosylierung spezifische Thiolgruppen des NMDA-Rezeptors<sup>10)</sup> substituiert und damit die toxische Wirkung als Folge des Einströmens großer Mengen  $Ca^{2+}$ -Ionen verhindert<sup>11, 12, 13)</sup>. NO hat sich als einer der wichtigsten Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems erwiesen.

Im kardiovaskulären System wird der dilatierende Effekt schon seit langer Zeit zur Linderung von Krankheiten genutzt (Angina pectoris Anfälle). NO diffundiert aus den Endothelzellen, welche alle Gefäßinnenwände auskleiden<sup>1</sup>, sowohl in das Gefäßlumen als auch in die Gefäßwand. Hier erweitert es die Muskelzellen oder hemmt ihre Kontraktion, erhöht den Blutfluß und damit die Sauerstoffzufuhr in die betroffenen Gewebe.

Luminal freigesetztes NO hemmt die Thrombozytenaggregation und die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Damit werden arteriosklerotische Prozesse verhindert.

Andererseits wirkt NO beim septischen Schock als starkes Zellgift. Die glatten Muskelzellen der Blutgefäße sind der Wirkort des aus den Endothelzellen freigesetzten NO<sup>2</sup>. Wird aber ein Schwellenwert durch Immun- und Entzündungsmediatoren überschritten (Lipopolysaccharide aus Bakterien, also Endotoxine; Zytokine wie z.B.  $\gamma$ -Interferon und Interleukine) bilden die Zellen der glatten Blutgefäßmuskulatur selbst und damit endothelunabhängig große Mengen NO (Expriemierung der iNOS). Ein massiver Blutdruckabfall mit einer Letalitätsrate von 25 bis zu 90% ist die Folge.

Die sehr unterschiedlichen Wirkorte und Konzentrationen warfen Fragen bezüglich der Bildung von NO auf. In Schema 1-1 ist die Biosynthese von NO dargestellt. Die Katalyse dieser Reaktion erfolgt mittels des Enzyms NO-Synthase (NOS). Die NO-Synthase kommt in 3 Isoformen<sup>14)</sup> vor, und diese befinden sich auf verschiedenen Genloci.

Alle 3 Isoformen gehören zur Cytochrom P-450 (Cyt. P-450) Familie. Man unterscheidet grundsätzlich eine induzierbare NO-Synthase (auch iNOS oder NOS II), welche nur nach Stimulation von Geweben durch Zytokine expriemiert wird, von zwei konstitutiv expriemierten NO-Synthasen. Dies sind die endotheliale NO-Synthase<sup>3</sup> (auch eNOS oder NOS III) und die neuronale NO-Synthase<sup>1(Seite 13)</sup> (nNOS oder NOS I). NOS I und NOS III produzieren NO mit einer basalen Rate (ca. 100 nmol) oder kurzfristig als Antwort auf eine Rezeptorstimulation (Kontrollmechanismus<sup>16)</sup>), so daß Ihre Aktivität im

---

<sup>1</sup> Der Körper besitzt ca. 1000 m<sup>2</sup> Gefäßinnenwand; die Endothelzellen haben somit ein Gesamtgewicht, das dem der Leber entsprechen dürfte.

<sup>2</sup> Sie bilden normalerweise selbst kein NO.

<sup>3</sup> Sie kommt hauptsächlich in Blutplättchen, im Endothel und der Niere vor.

Organismus also überwiegend reguliert wird. NOS I und III binden Calmodulin und werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert<sup>17)</sup>. Die induzierbare NO-Synthase kommt ohne Expressierung im Organismus normalerweise nicht vor. Sie wird nur als Antwort auf unterschiedliche Reize wie Zytokine, Endotoxine, den Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin gebildet, fördert dann aber stark Entzündungsprozesse (siehe septischer Schock).

Der wichtigste Unterschied zu den beiden konstitutiven NO-Synthasen besteht in der gebildeten Menge an NO. So kann die NOS II bis zu tausend mal mehr NO bilden als NOS I und NOS III.

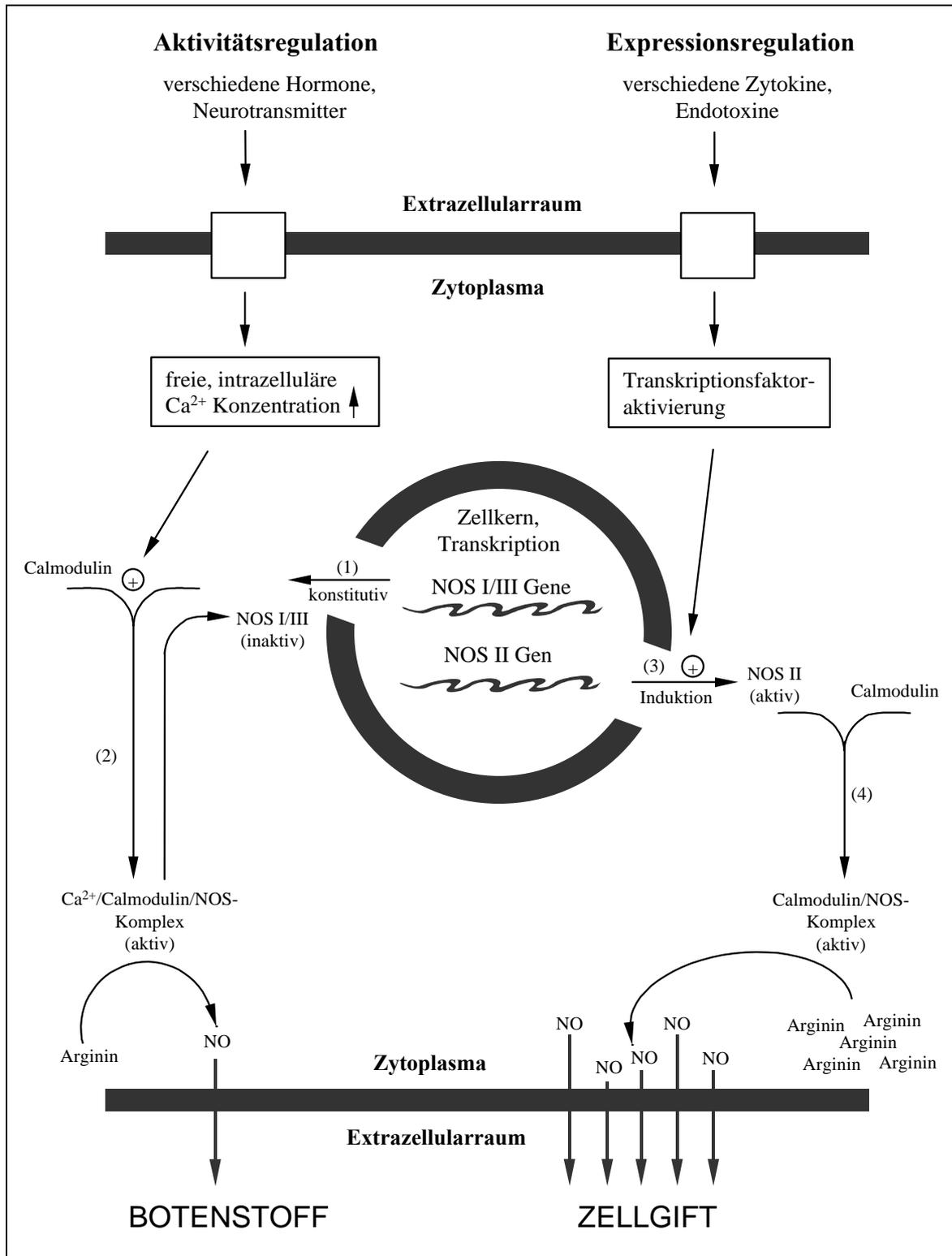
Die Wirkungen von NO werden, von einigen Ausnahmen wie der Immunabwehr abgesehen, durch die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase in den betroffenen Zellen vermittelt<sup>18)</sup>. Diese bildet dann cGMP, welches zu einer Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinasen führt, die durch Phosphorylierungsreaktionen die jeweiligen Effekte auslöst (siehe Schema 1-2).

Ausgehend von den beschriebenen gravierenden Unterschieden in der Wirkung von NO stellt sich die Frage, welche chemischen Reaktionen und physikalischen Eigenschaften des NO zum Absterben der Zelle führen bzw. welche physiologischen Bedingungen Stickstoffmonoxid zum Zellgift im Organismus werden lassen.

Für diesen Effekt sind in jedem Fall höhere Konzentrationen von NO und/oder längere Einwirkzeiten als für seine Botenstofffunktion notwendig. Wie im vorigen Absatz beschrieben, werden diese Konzentrationen weder durch die NOS I oder NOS III erreichbar sein. Nur die NOS II ist in der Lage, NO in solch großen Mengen zu produzieren, um schädigende Wirkungen auf die Zelle auszuüben.

---

<sup>1</sup> Sie kommt vorwiegend in Nervenzellen<sup>15)</sup> vor.



**Schema 1-2:** Regulation der NO Biosynthese: NO-Synthase I und NO-Synthase III werden konstitutiv gebildet (1), sind aber nur bei erhöhter Konzentration von intrazellulärem freiem Ca<sup>2+</sup> aktiv, und zwar durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung von Calmodulin (2). NO-Synthase II ist ein induzierbares Protein, welches durch zytokininduzierte Transkription gebildet wird (3) und anschließend Ca<sup>2+</sup>-unabhängig an Calmodulin bindet (4).<sup>19)</sup>

Um die Wirkungen erklären zu können, ist es notwendig sich die Chemie und die Eigenschaften des NO anzuschauen. Dabei ergeben sich folgende Fragen:

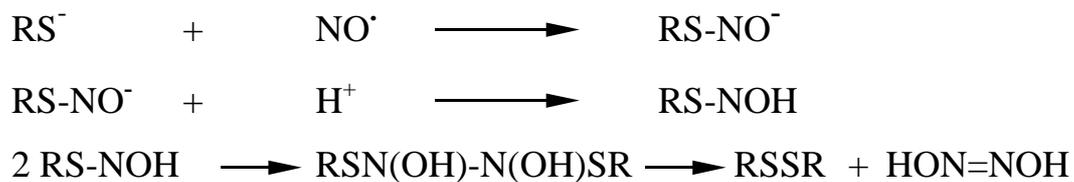
- Welche biologischen Moleküle können direkt mit NO reagieren?
- Bilden sich durch Reaktionen erst reaktive Spezies, welche die beobachteten Effekte auslösen (siehe Abbildung 1.1)?

NO bindet sowohl an freies als auch an proteingebundenes Eisen. Letzteres kann als Porphyrin-, Schwefel- oder Sauerstoffkomplex vorliegen. Das eisenreichste Protein ist das Speicherprotein Ferritin. NO kann dem Ferritin Eisen entziehen. Bei dieser Reaktion entstehen unter Beteiligung niedermolekularer Thiole Eisennitrosylkomplexe<sup>20</sup>). Diese können im Unterschied zu nicht komplexierten Eisenionen die Zellmembran passieren und stellen daher eine Transportform für Eisen dar. Isolierte Endothelzellen der Blutgefäße scheinen durch eine kontinuierliche Freisetzung von NO an Eisen zu verarmen<sup>21</sup>). Zellen der Immunabwehr nutzen diesen Mechanismus dazu, Bakterien und Tumorzellen das Eisen zu entziehen. Essentielle Enzyme der mitochondrialen Atmung und DNS Replikation reagieren besonders empfindlich auf eine Senkung der intrazellulären Eisenkonzentration. Sie werden durch NO in ihrer Aktivität besonders gehemmt.

Weitere bekannte Reaktionspartner sind die Eisen-Schwefel Cluster in vielen Enzymen (z.B. cis-Aconitase, mitochondriale Atmung Komplex I, III). Diese Clusterbildung führt zur Inhibierung der entsprechenden Prozesse bei den von diesen Enzymen vermittelten Reaktionen.

Nicht nur für die Reaktion mit Eisen besitzt NO eine hohe biologische Bedeutung. Die im Organismus häufig vorkommenden freien oder proteingebundenen Thiolgruppen (SH-Enzyme der Glycolyse, z.B. Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und der DNA-Biosynthese, z.B. Ribonucleotid-Reduktase<sup>22)</sup>) reagieren direkt mit Stickstoffmonoxid. Die Inaktivierung dieser Enzyme geschieht durch Reaktion der SH-Gruppen zu Nitrosothiolen. Die Folgeprodukte sind die korrespondierenden Disulfide und die Hyposalpetrige Säure (siehe Schema 1-3)<sup>23)</sup>.

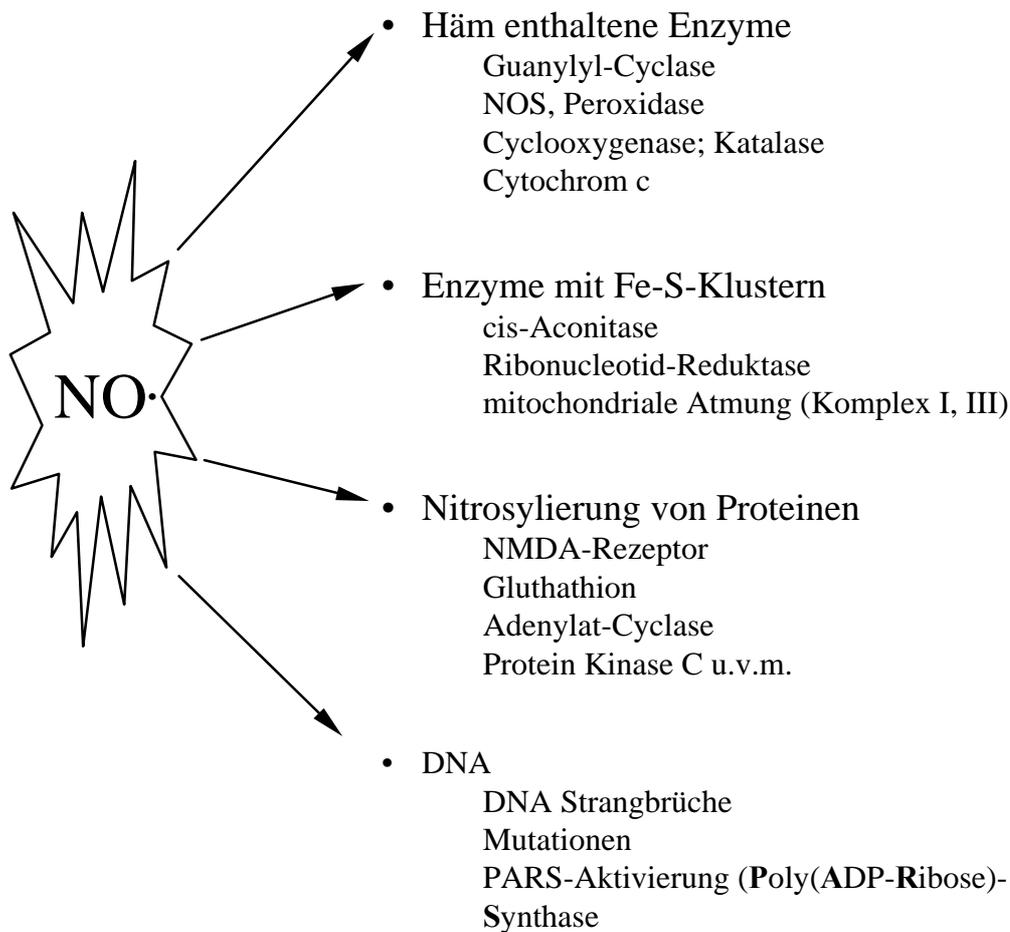
### Schema 1-3



Eine weitere wichtige und pathogene Wirkung von NO ist die Hemmung der DNA-Synthese<sup>24)</sup> und die Interaktion mit den Nucleinsäuren. Intensivere Untersuchungen hierzu wiesen in Gegenwart von Sauerstoff sogar auf Punktmutationen (Basenaustausch durch Desaminierungen) und Strangbrüche in der DNA hin<sup>25, 26, 27)</sup>. Daß durch Reaktionen mit NO mutagene Wirkungen auf DNA-Teilstrukturen ausgeübt werden, bedeutete eine neue Wertstellung. Angewendete Pharmaka waren hinsichtlich dieser Ergebnisse neu zu bewerten. Die Freisetzung des NO erst am Wirkort bekommt immer größere Bedeutung (Prodrugs).

In Schema 1-4 ist die Vielfalt der molekularen Ziele von Stickstoffmonoxid dargestellt.

## Schema 1-4



Daß diese große Vielfalt an Reaktionen im Organismus nur auf das NO allein zurückzuführen ist, ist kaum vorstellbar. Die Beteiligung an all diesen Wirkungen ist unstrittig, aber das Wie und was reagiert ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Womit kann also NO eventuell vorher noch reagiert haben, um diese vom Organismus zum Teil gravierenden Antworten zu erzeugen<sup>1</sup>. Welche *in vivo* vorkommenden bzw. bei pathologischen Prozessen gebildete Spezies kommen in Frage?

In seiner elektronischen Struktur ist das NO ein Radikal und ist besonders gut in einem MO-Schema darstellbar. Hier erkennt man das einsame, den Radikalcharakter ausmachende Elektron. Daraus resultiert formal eine 2½ fach Bindung (Abbildung 1.2).

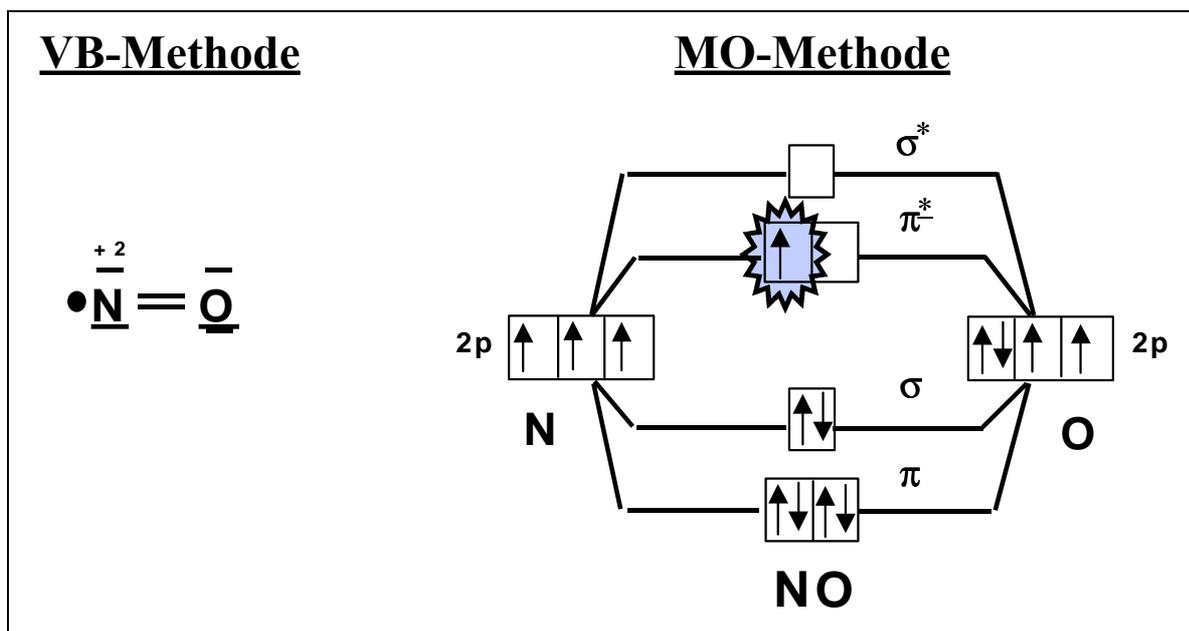
---

<sup>1</sup> z.B. Gehirnschlag, Mutagenität, Cytotoxizität, septischer Schock u.v.m.

Ist NO erst einmal gebildet, so ist es bei Abwesenheit von Sauerstoff so stabil, daß es sogar in Druckgasflaschen abgefüllt werden kann.

Eine hervorzuhebende Eigenschaft von Radikalen ist nicht, wie oft angenommen, ihre hohe Reaktionsfähigkeit<sup>1</sup> sondern die bevorzugte Reaktion mit anderen Molekülen, welche ebenfalls ungepaarte Elektronen besitzen. Auf diese Eigenschaft wird weiter unten noch besonders eingegangen.

**Abbildung 1.2**



Auf Grund des relativ niedrigen Ionisierungspotentials des NO (9,25eV) kann durch Abspaltung eines Elektrons das NO zum Nitrosyl-Kation oxidiert werden. Wenn NO hingegen ein Elektron aufnimmt, wird das NO zum Nitroxylat-Anion reduziert. Dieses zerfällt nach Protonierung und Dimerisierung zu N<sub>2</sub>O (Gleichung 1).

**Gleichung 1**



Diese Reaktion ist für den Nachweis der NO<sup>-</sup> Entstehung *in vivo* von großer Bedeutung<sup>28, 29</sup>).

<sup>1</sup> Auch molekularer Sauerstoff ist ein Radikal.

Was bedeutet aber beispielsweise die gleichzeitige Anwesenheit von O<sub>2</sub> (oder anderer Sauerstoffspezies) und NO auf die Reaktivität und die biologische Wirkung?

So stellt die spontane Reaktion bei hoher NO Konzentration (z.B. beim Öffnen einer NO Druckgasflasche) mit molekularem Sauerstoff zu NO<sub>2</sub> (nitrose Gase) eine allseits bekannte Reaktion dar und wird in der Atmosphäre beim sogenannten „Los Angeles Smog“ beobachtet.

Welche Bedeutung besitzt diese Reaktion *in vivo*? Dafür ist die biologische Halbwertszeit von großer Bedeutung. Diese liegt zwischen 1-10s und erlaubt dem neutralen, nahezu unpolaren NO relativ große Diffusionsstrecken, sogar durch Membranen hindurch, zurückzulegen. Diese Eigenschaft führt zu einer Ausbreitung von NO über Zellgrenzen hinweg.

Auch die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion liegt mit  $2 \cdot 10^6 \text{ L}^2/\text{mol}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  sehr hoch. Da es sich bei der Reaktion um eine Reaktion 2.Ordnung bezüglich der NO-Konzentration handelt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit vom Quadrat der NO-Konzentration abhängig. Legt man die physiologische NO-Konzentration von etwa 100 nmol/L zu Grunde, so beträgt die Halbwertszeit *in vivo* ungefähr 45 min. Bezogen auf die biologische Halbwertszeit von NO (siehe oben) wird deutlich, daß die Reaktion von molekularem Sauerstoff mit NO *in vivo* keine Bedeutung hat.

Wenn nun also die Reaktion von molekularem Sauerstoff mit NO zu NO<sub>2</sub> *in vivo* nicht relevant ist, muß es noch andere Reaktionspartner für das NO geben.

Ein weiterer Kandidat für die Reaktion von NO ist das Superoxidradikalanion (O<sub>2</sub><sup>'-</sup>), welches verstärkt in entzündlichem Gewebe auftritt<sup>30, 31, 32, 33, 34</sup>). Daher wurde diese Reaktion intensiv untersucht<sup>35</sup>). Ein wichtiger Aspekt für eine *in vivo* Relevanz ist, daß das Superoxidanionradikal durch die ubiquitär im Organismus vorhandene NADPH-Oxidase gebildet werden kann (siehe Abbildung 1.4). Beim sogenannten oxidativen Stress<sup>1</sup>, der nach Zellschädigungen in Gang gesetzt wird, tritt eine verstärkte Produktion von O<sub>2</sub><sup>'-</sup> mit den bekannten cytotoxischen Wirkungen für die Zelle auf (z.B. Zelltod beim respiratorischen Ausbruch in phagozytierenden Zellen, siehe

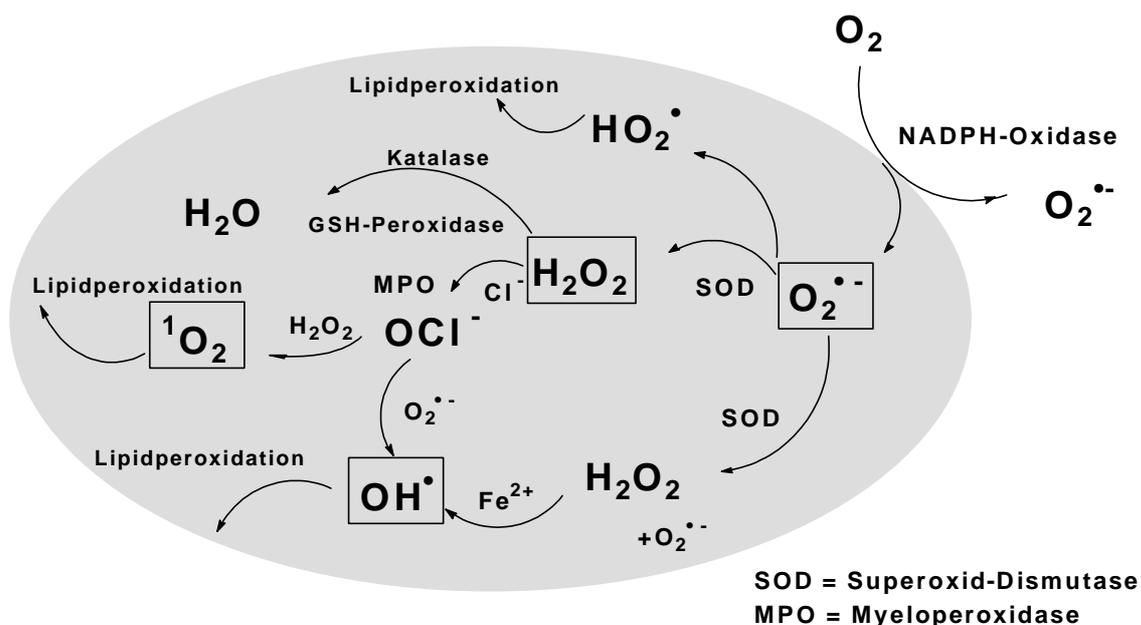
---

<sup>1</sup> In geschädigte Zellen treten Leukozyten ein und bekämpfen diese. Der daraus resultierende erhöhte Sauerstoffverbrauch unter Bildung von O<sub>2</sub><sup>'-</sup> und weiterer Folgeprodukte wird als oxidativer Stress bezeichnet.

Abbildung 1.3). Von besonderer Bedeutung ist, daß gerade unter diesen Bedingungen die iNOS exprimiert wird und somit die NO-Produktion ansteigt.

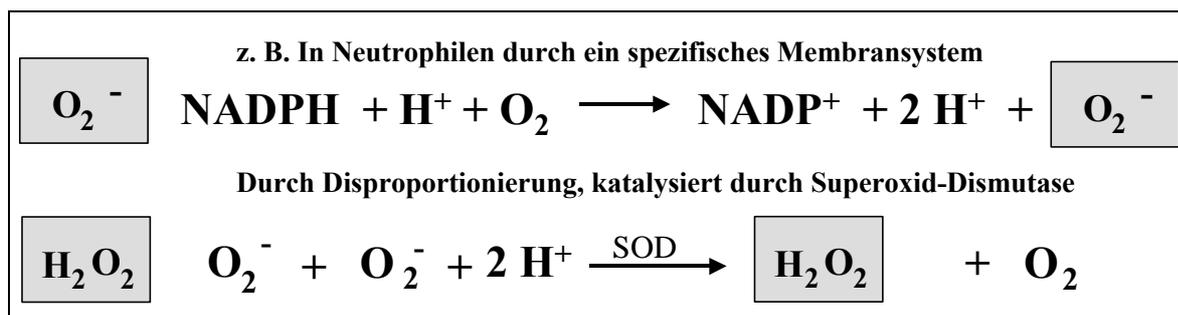
**Abbildung 1.3**

### Respiratorischer Ausbruch in phagocytierenden Zellen



So wurde das  $O_2^{\bullet-}$  schon seit einiger Zeit mit der Wirkung von NO in Verbindung gebracht. Es konnte beobachtet werden, daß der vasorelaxierende Effekt von NO durch die Anwesenheit von Superoxid-Dismutase (SOD) deutlich gesteigert werden kann<sup>36)</sup>. Wird also  $O_2^{\bullet-}$  durch zusätzliche Gabe des die Disproportionierung ausführenden Enzyms entfernt (siehe Abbildung 1.4), so steigert sich der biologische Effekt deutlich, das bedeutet, daß  $O_2^{\bullet-}$  hier möglichen Reaktionen mit NO entzogen wird.

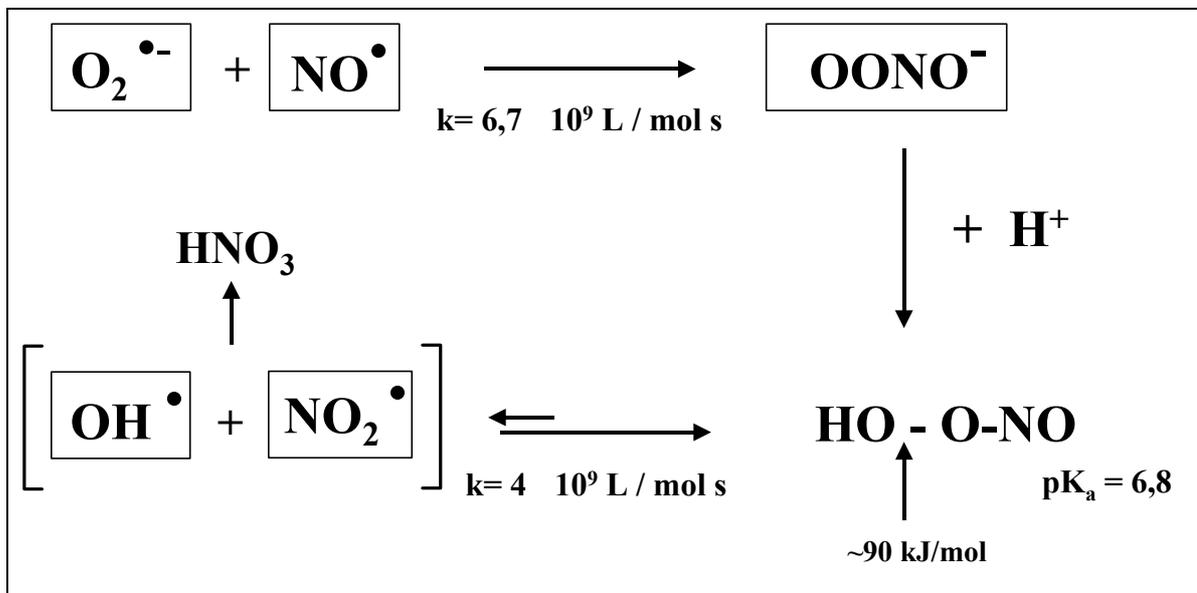
**Abbildung 1.4**



Aus diesem Grund wurde die Reaktion von NO und  $O_2^{\bullet -}$  in jüngster Zeit eingehender untersucht.

Die Reaktion der beiden Radikale NO und  $O_2^{\bullet -}$  führt zur Bildung eines starken Oxidationsmittels, dem Peroxynitrit-Anion. Überraschend war, daß diese Reaktion *in vivo* auch in Gegenwart von SOD relevant ist. Der Grund für diesen Befund ist in der Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion zu finden. Sie ist etwa drei mal so hoch, wie die für die Dismutasereaktion von  $O_2^{\bullet -}$ . Bei einem  $pK_s$ -Wert von 6,8 liegt das Peroxynitrit unter physiologischen Bedingungen protoniert vor (dies gilt insbesondere in entzündlichem Gewebe, pH-Wert  $\geq 7,4$ ). Die peroxysalpetrige Säure zerfällt sehr schnell unter physiologischen Bedingungen.

**Abbildung 1.5**



Aus diesen Eigenschaften wird deutlich, daß diese Reaktion biologische Bedeutung haben sollte. Aus zwei nicht besonders reaktiven Radikalen entsteht in einer mit enormer Geschwindigkeit ablaufenden Reaktion ein starkes Oxidans, welches die cytotoxische Wirkung nach Freisetzung von NO gut erklären konnte. Auch die Parallelität der gesteigerten Bildung während des respiratorischen Ausbruchs ist damit gut in Übereinstimmung zu bringen. Mit dieser Reaktion ergäbe sich auch eine neue modifizierte Erklärung für die Superoxid-Toxizität, bzw. für die Reaktivität von aktiven Sauerstoffspezies (siehe auch Abbildung 1.3).

Ist Peroxynitrit erst einmal gebildet, findet es viele verschiedene biologische Zielstrukturen. Es kommt zur Reaktion mit Aminosäuren, z.B. mit Tyrosin. Bei dieser Reaktion entsteht 3-Nitrotyrosin<sup>37)</sup>, wobei diese Reaktion derzeit sogar vielfach für das *in vivo* Auftreten von Peroxynitrit analytisch als Nachweis- bzw. Beweisreaktion genutzt<sup>1</sup>. Auch die Peroxidation von Membranlipiden und die Reaktion mit Kernbasen der DNA/RNA<sup>38, 39, 40)</sup> mit nachfolgenden Strangbrüchen ist eine vielfach beobachtete Wirkung, wenn Peroxynitrit *in vivo* gebildet wird.

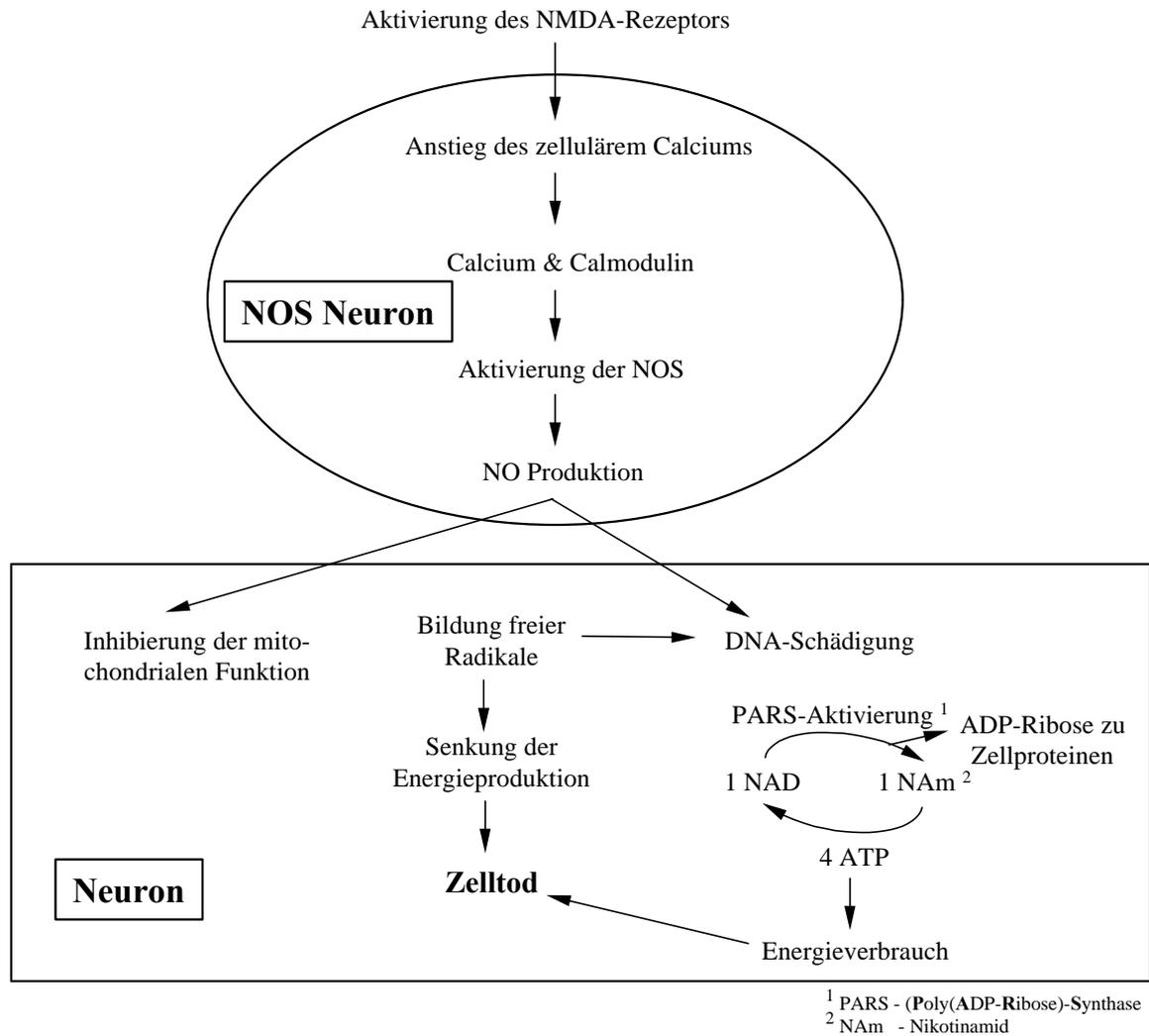
Die Reaktion von NO mit dem Superoxid-Anion zu Peroxynitrit wird in jüngster Zeit auch für die gravierenden Folgen des Gehirnschlags verantwortlich gemacht (siehe Abbildung 1.6).

Da Peroxynitrit stabiler ist als vergleichsweise NO oder  $O_2^-$  und die somit größere Entfernungen als das NO durch Zellmembranen zurücklegen kann, wird ein lokale Ausbreitung der zerebralen Schädigungen erklärbar.

---

<sup>1</sup> U.S. patent application was filed in August 1994, siehe <http://www.uab.edu/uabrf/beckman.html>

**Abbildung 1.6 Mechanismus der NO bedingten Neurotoxizität**



Auf Grund der Vielzahl der Erkrankungen bei denen eine Überproduktion von NO auftritt (siehe Abbildung 1.7) stellen therapeutische Ansätze zum Abfangen der reaktiven Spezies (NO,  $O_2^-$ ,  $ONOO^-$ ) *in vivo* oder Inhibierung der NOS (insbesondere der iNOS) vielversprechende Ansätze dar.

## Abbildung 1.7

### Auswahl der Erkrankungen bei denen eine Überproduktion von NO auftritt

- Diabetes , Ulcera, Arthritis, Asthma
- septischer Schock
- Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson
- Multiple Sklerose
- Entzündungen, Infektionen
- Ischämie

Die vielfach beobachtete und durch die verstärkte NO Produktion induzierte Mutagenität ist bisher hauptsächlich in ihrer „Vollendung“, d.h. über Strangbrüche, beobachtet worden<sup>41)</sup>. Erste Untersuchungen an Zellen ließen eine besondere Häufigkeit von oxidativen DNA-Schädigungen des Guanosins erkennen<sup>42)</sup>. Auch wurde vielfach zusätzlich eine Reaktion zu 8-Oxoguanosin bzw. 8-Oxoguanin dabei beschrieben<sup>40, 43)</sup>.

Dieser Aspekt, die mutagenen Eigenschaften durch verstärkte NO-Produktion und dessen Folgeprodukten (Peroxynitrit) ist zwar bekannt, es fehlen aber die molekularen Grundlagen, die sich aus chemischen Reaktionen mit DNA/RNA oder Teilstrukturen dieser biologischen Zielmoleküle ergeben. Die oben erwähnten Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung nicht nur von NO schließen. Hieraus leitet sich die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ab, reaktive Stickstoffspezies mit DNA/RNA Teilstrukturen einzeln zur Reaktion zu bringen.

Um zu erforschen, ob und welchen Einfluß aktive Stickstoffspezies auf verschiedene Teilstrukturen der DNA/RNA besitzen, muß zunächst durch *in vitro* Reaktionen geklärt werden, welche möglichen Reaktionsprodukte entstehen können.

Ziel einer solchen Untersuchung soll die Zuordnung von reaktiven Spezies zu ihren Reaktionsprodukten sein, d.h. werden bestimmte Verbindungen

*in vivo* detektiert, läßt sich so unter bestimmten Voraussetzungen auf die an ihrer Bildung beteiligten Substanzen schließen.

Die zur Bildung dieser reaktiven Spezies notwendigen Edukte, z.B. NO und  $O_2^{\cdot-}$  für die Bildung von Peroxynitrit, müßten dann beispielsweise vorher *in vivo* produziert worden sein.

Als allgemeine Überlegungen sind voranzustellen:

- Welche reaktiven Spezies werden für die durchzuführenden Reaktionen ausgewählt?
- Mit welchen DNA/RNA Teilstrukturen werden die Reaktionen durchgeführt?
- Entstehen eventuell mehrere Substanzen mit den reaktiven Spezies?
- Können Leitverbindungen für die durchgeführten Reaktionen gefunden werden?

Bei der Auswahl der reaktiven Spezies muß vor allem das Stickstoffmonoxid als das biologisch aktive Molekül eingesetzt werden. Die Vielzahl der Krankheiten, bei der NO eine Bedeutung besitzt (siehe Abbildung 1.7), die verstärkte Bildung von NO im Körper bei allen entzündlichen Prozessen, die cytotoxischen Eigenschaften in Verbindung mit reaktiven Sauerstoffspezies usw. machen die Verwendung zwingend erforderlich.

Eine weitere reaktive Spezies ist das Peroxynitrit, welches durch die hohe Geschwindigkeitskonstante bei der Bildung *in vivo* und seiner Reaktivität von großer Bedeutung bei Reaktionen mit DNA/RNA Teilstrukturen sein muß. Wie schon erwähnt, soll Peroxynitrit beispielsweise an der Ausbildung und Ausbreitung des Gehirnschlags beteiligt sein. Auch die mutagenen und cancerogenen Nebenwirkungen von NO-Pharmaka werden vielfach dem Peroxynitrit zugeschrieben.

Da für das Peroxynitrit auch Nitrierungsreaktionen beobachtet worden sind<sup>44)</sup>, ist der Vergleich der Reaktionsprodukte, wie sie aus der Reaktion von DNA/RNA Teilstrukturen mit Stickstoffdioxid oder Peroxynitrit entstehen, wichtig. Bilden sich sogar gleiche Reaktionsprodukte, sind zusätzlich Aussagen zu eventuell ablaufenden Zerfallsreaktionen des Peroxynitrit, welches in dieser Hinsicht große Rätsel aufgibt möglich. Außerdem wird bei der Reaktion von Peroxynitrit ein Zerfall unter Bildung von OH- und NO<sub>2</sub>'-Radikalen diskutiert, die dann die eigentlichen Reaktionspartner für die biologischen Zielstrukturen darstellen.

Aus diesen Gründen wird neben Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit auch Stickstoffdioxid als reaktive Spezies verwendet.

Als DNA/RNA Teilstrukturen bieten sich die entsprechenden Purin- und Pyrimidinbasen Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin an. So können im Einzelfall die Reaktionen der reaktiven Spezies mit den entsprechenden DNA/RNA-Bausteinen untersucht und anschließend miteinander verglichen werden.

## **2 Entwicklung von Methoden zur Darstellung der reaktiven Stickstoffspezies, Umsetzung der DNA/RNA-Teilstrukturen und Identifizierung der Produkte**

### **2.1 Darstellung der reaktiven Spezies**

Wie in der Einleitung bereits ausführlich erläutert, sollten die praktischen Arbeiten in der Umsetzung von DNA/RNA-Teilstrukturen mit NO, NO<sub>2</sub> und Peroxynitrit, sowie der Strukturaufklärung der erhaltenen Reaktionsprodukte bestehen.

Dazu war es notwendig, die Reaktanden in höchst möglicher Reinheit einzusetzen. So sollte sichergestellt werden, daß ausschließlich die reaktiven Spezies<sup>1</sup> mit den Purin- bzw. Pyrimidinbasen reagieren, und dadurch Fehlinterpretationen der Ergebnisse verhindert werden.

Da NO und NO<sub>2</sub> in Druckgasflaschen mit ausreichender Reinheit erhältlich waren, mußte hierfür kein Syntheseweg entwickelt werden.

Ein Problem stellte jedoch das Peroxynitrit dar. Um ein sinnvolles Arbeiten mit Peroxynitrit zu ermöglichen, war es wichtig, zu klären, auf welchem Weg Peroxynitrit synthetisiert werden sollte. In den folgenden Kapiteln soll ein Überblick über die in der Literatur bekannten Synthesewege gegeben werden.

Die Auswahl der verwendeten Synthesemethoden mußte in Übereinstimmung mit der Problemstellung, den Reaktionen der Purin- bzw. Pyrimidinbasen erfolgen.

Auch war es für die Planung der Umsetzungen erforderlich, die physikalischen und chemischen Eigenschaften zu kennen.

---

<sup>1</sup> NO, NO<sub>2</sub>, Peroxynitrit

### 2.1.1 Methode 1: Reaktion von Ozon mit Azid-Ionen

Diese Synthese wurde erstmals von *Pryor*<sup>45)</sup> beschrieben und kann mit folgender Gleichung zusammengefaßt werden.

#### **Gleichung 2**

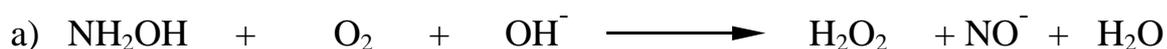


Diese Ozonisierung (etwa 100 min bei einem Fluß von 300 mL/min) von Aziden (z.B.  $\text{NaN}_3$ ) findet in alkalischer Lösung pH 12 bei 0-4°C statt, wobei das benötigte Ozon mit einem Ozongenerator erzeugt wird (ca. 1% Ozon in Sauerstoff v/v). Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels UV-Messung bei 302 nm verfolgt<sup>46)</sup>. Mit dieser Methode können Peroxynitrit-Konzentrationen bis 80 mM/L erreicht werden, welche wenig NaOH (bei  $\text{NaN}_3$ ) und kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  enthalten. Lediglich unverbrauchtes Azid tritt als Verunreinigung auf. Verlängert man das Einleiten von Ozon, kann diese Kontamination noch gesenkt werden, jedoch verringert sich die Ausbeute an Peroxynitrit. Weitere Untersuchungen hierzu sind von *Uppu et al.*<sup>47)</sup> beschrieben worden.

### 2.1.2 Methode 2: Autoxidation von Hydroxylamin

Die Autoxidation von Hydroxylamin führt ebenfalls zur Bildung von Peroxynitrit<sup>48, 49, 50)</sup>.

#### **Gleichung 3**



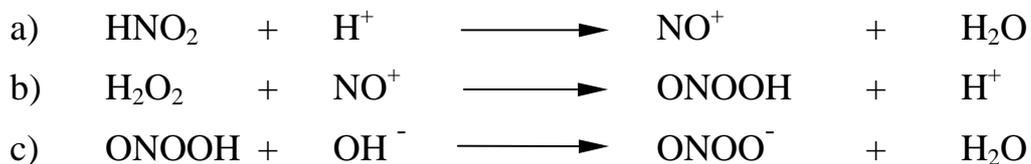
Durch eine Hydroxylaminlösung (0,05 M) wird Sauerstoff geleitet (0,5 L/min) und die Reaktion wird in 0,5 N NaOH durchgeführt. Die Ausbeuten liegen bei ca. 25%, bezogen auf die Ausgangskonzentration an

Hydroxylamin wobei als Verunreinigungen Nitrit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und unverbrauchtes Hydroxylamin auftreten.

### 2.1.3 Methode 3: Reaktion von Wasserstoffperoxid mit salpetriger Säure

Erste Arbeiten hierzu wurden 1964 von *Papée* publiziert<sup>51)</sup>. Dieser Methode liegt die spontane, unmittelbare Reaktion von acidifizierter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung mit einer NaNO<sub>2</sub>-Lösung zugrunde. Durch hohe OH<sup>-</sup>Konzentrationen (z.B. NaOH) kann anschließend das Produkt, peroxysalpetrige Säure, unter Bildung von Peroxynitrit-Anion stabilisiert werden.

#### **Gleichung 4**



Auf der Grundlage dieser Reaktion entwickelte *Reed*<sup>52)</sup> einen sogenannten „Quenched-Flow“-Reaktor. Mit Hilfe dieses Verfahrens können Peroxynitrit-Konzentrationen bis 185 mMol/L erreicht werden<sup>53)</sup> wobei die Reaktion bei Temperaturen zwischen 2 und 4°C durchgeführt wird. Durch Tiefkühlfraktionierung kann die Ausbeute auf Konzentrationen bis zu 800 mM/L gesteigert werden<sup>54)</sup>.

Unter „Quenched-Flow“<sup>1</sup> versteht man im Allgemeinen das Prinzip, nach dem zwei Reaktanden, welche sich in getrennten Gefäßen befinden, über eine Schlauchverbindung miteinander zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktionszeit wird durch die Zuleitung eines weiteren Reagenzes, das geeignet ist, die Reaktion zu stoppen, bestimmt.

Bei der von *Beckman* und *Reed* beschriebenen Methode erhält man hohe Kontaminationen an OH<sup>-</sup>, Nitrit und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Von *Saha et.al.* wurden neueste Untersuchungen zum „Quenched-Flow-Reaktor“ beschrieben<sup>55)</sup>. So bestimmten sie in ihrer Arbeit, in Übereinstimmung mit früheren Resultaten<sup>56)</sup>, eine

---

<sup>1</sup> quenched flow: (engl.) unterbrochener Fluß

Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall von Peroxynitrit von ca. 6s bei 8°C und pH 7,4 (beschrieben auf Seite 56 in Abschnitt 2.4.3 ).

Vorrangiges Ziel Ihrer Untersuchungen war die Steigerung der Peroxynitritausbeute. Dazu wurden die Ausgangskonzentrationen aller eingesetzten Lösungen zueinander und die Reaktionszeit von  $\text{NO}^+$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe Gleichung 4b) optimiert. Die Reaktionszeit ist über das Reaktionsvolumen<sup>1</sup> und den Fluß veränderbar. Zur Variation des Flusses (0,1-200 mL/min) verwendeten *Saha et.al.* eine computergesteuerte Schlauchpumpe. Durch diesen großen apparativen Aufwand konnten über die Änderung des Reaktionsvolumens zwischen den Mischkammern<sup>2</sup> und die Änderung des Flusses Reaktionszeiten von 10 ms noch genau eingestellt werden.

Folgende Bedingungen wurden von *Saha et.al.* vorgeschlagen:

- Nahezu gleiche Konzentrationen an Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$  für Systeme, bei denen Nitrat als Verunreinigung erlaubt ist, aber nicht Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Etwas höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ - als Nitritkonzentrationen für Systeme, bei denen kein Nitrit aber  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Verunreinigung tolerabel ist<sup>3</sup>.

Diese Ergebnisse konnten in den wesentlichen Aussagen bestätigt werden (siehe Abschnitt 2.2).

Zusätzlich zur Variation von Reaktionszeit und Konzentration, sind alle Messungen bei 0°C, 20°C und 25°C durchgeführt worden.

Als ein wichtiges Ergebnis bezüglich des Temperatureinflusses stellten *Saha et.al.* fest, daß zwar ein effektiv arbeitender „Quenched-Flow-Reaktor“ einen maßgeblichen Einfluß auf die Ausbeute an Peroxynitrit hat, nicht aber wie oft beschrieben<sup>57)</sup>, die Temperatur der Reaktionslösungen. So wurden, bei ansonsten gleichen Bedingungen, nur rund 7% weniger<sup>4</sup> Peroxynitrit bei 25°C gefunden als bei 0°C (87% bei 0°C).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine effektive Vermischung der Reaktionslösungen in Verbindung mit einer optimal abgestimmten

---

<sup>1</sup> Es ist das Volumen nach Vermischen von acidifizierter  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{NaNO}_2$  bis zum Quenchen der Lösungen mit NaOH gemeint. Dies wurde über ein Rohr mit verschiedenen Längen erreicht.

<sup>2</sup> Kammer 1:  $\text{NaNO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}^+$  (Reaktionslösung)  
Kammer 2: NaOH kommt zur Reaktionslösung hinzu

<sup>3</sup> Bei doppelter  $\text{H}_2\text{O}_2$  – Konzentration entsteht praktisch kein Nitrit, aber viel  $\text{H}_2\text{O}_2$  bleibt übrig

<sup>4</sup> Diese 7% sind als Nitrat gefunden worden

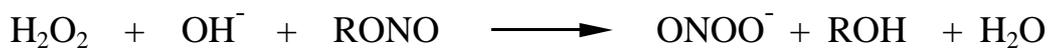
Reaktionszeit die entscheidenden Kriterien für die Höhe der Ausbeute an Peroxynitrit sind<sup>55)</sup>.

Die spätere Verwendung des Peroxynitrit bestimmt hauptsächlich das Verhältnis der Reaktionslösungen zueinander und den daraus resultierenden Verunreinigungsgrad (in veränderlichen Gewichtsanteilen Nitrit, Nitrat oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Soll beispielsweise streng auf Nitritfreiheit geachtet werden, so muß mit deutlichem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überschuß gearbeitet werden.

#### 2.1.4 Methode 4: Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Alkylnitriten

Durch Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Alkylnitriten (RONO) ist Peroxynitrit ebenfalls synthetisierbar. Der Alkylrest kann beispielsweise 2-Ethoxyethyl<sup>58)</sup>, 2-Methoxyethyl<sup>59)</sup> oder 2-Methylbutyl (isoamyl)<sup>60)</sup> sein. Als allgemeine Reaktionsgleichung gilt:

##### **Gleichung 5**



Verwendet man wasserlösliche Alkylnitrite<sup>58)</sup>, kann die Reaktion als 1-Phasenreaktion unter alkalischen Bedingungen durchgeführt werden. Hierbei werden in äquimolaren Ansätzen nahezu quantitative Ausbeuten an Peroxynitrit erhalten, welche nur schwach mit Nitrit- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-verunreinigt sind. Allerdings verbleibt der entsprechende Alkohol ebenfalls in der Lösung.

Setzt man wasserunlösliche Alkylnitrite ein, findet die Reaktion in einem 2-Phasensystem statt<sup>61)</sup>. In der organische Phase liegt das Alkylnitrit vor, die wässrige Phase wird durch die alkalische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gebildet.

Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sich das entstandene Peroxynitrit in der wässrigen Phase sammelt und der ebenfalls anfallende Alkohol (siehe Gleichung 5) in der organischen Phase verbleibt. Somit kann das Peroxynitrit leicht von der organischen Phase mittels ausschütteln im Scheidetrichter abgetrennt werden.

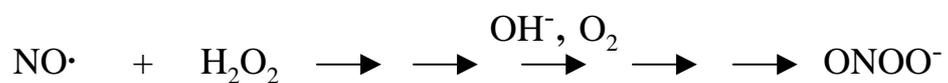
Uppu<sup>61)</sup> konnte so Peroxynitrit-Konzentrationen bis 1 mol/L erhalten. Als Kontaminationen werden Nitrit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>-Ionen und der Alkohol

beobachtet. Ein weiteres Ausschütteln der wässrigen Phase mit Dichlormethan wird empfohlen<sup>60</sup>).

### 2.1.5 Methode 5: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Wasserstoffperoxid

*Petriconi*<sup>62</sup>) berichtet, daß NO in alkalischer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (pH 12,5-13,5) zu Peroxynitrit in Ausbeuten von 2 mol% bezogen auf die Ausgangskonzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert.

#### **Gleichung 6**



Der Mechanismus dieser Reaktion ist unbekannt.

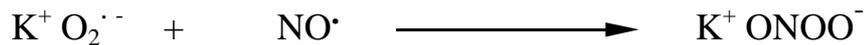
Da NO kein Nitrosierungsreagenz darstellt und bei der Reaktion wahrscheinlich Sauerstoff benötigt wird, vermutet man eine reaktive Spezies wie N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (aus der Reaktion von NO mit NO<sub>2</sub>) die in der Lage ist, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu nitrosieren.

Diese Reaktion wird für die Detektion von NO aus perfundierten Organen im picomolaren Bereich, die auf einer Chemilumineszenzreaktion mit Luminol basiert, angewendet<sup>63</sup>).

### 2.1.6 Methode 6: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit festem Kalium-superoxid (KO<sub>2</sub>)

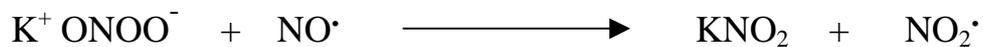
Diese Methode beruht auf der Reaktion von NO-Gas mit festem KO<sub>2</sub>.

#### **Gleichung 7**



Eine frühere Studie von *Firsova* und *Filatov*<sup>64)</sup> beschreibt, daß bei dieser Reaktion äquimolare Mengen KNO<sub>2</sub> und KNO<sub>3</sub> entstehen. *Koppenol*<sup>50)</sup> konnte dies erstmals 1996 widerlegen und auf diesem Weg in ca. 50%iger Ausbeute, bezogen auf das KO<sub>2</sub>, Kaliumperoxynitrit (K<sup>+</sup>ONOO<sup>-</sup>) synthetisieren. Er beschrieb, daß bei Verwendung von mehr als einem Äquivalent NO-Gas (bezogen auf KO<sub>2</sub>) folgende Nebenreaktion an Bedeutung gewinnt.

#### **Gleichung 8**



Nach vorheriger starker Erwärmung werden zusätzlich eine Explosion und die NO<sub>2</sub>-Freisetzung beobachtbar sein. Die Reaktion in Gleichung 8 und der thermische Zerfall sind der Grund für die früheren Beobachtungen, daß es unmöglich schien, K<sup>+</sup>ONOO<sup>-</sup> zu synthetisieren.

### 2.1.7 Methode 7: Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Tetramethylammonium-superoxid

*Bohle*<sup>65)</sup> beschrieb erstmals die Reaktion von Stickstoffmonoxid und Tetramethylammonium-superoxid in flüssigem Ammoniak (siehe Gleichung 9). Die Reaktion kann mit folgender Reaktionsgleichung beschrieben werden:

#### **Gleichung 9**

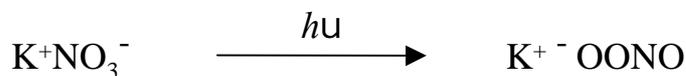


Gemäß einer von *Bohle et al.* veröffentlichten Arbeit<sup>66)</sup> kann mit dieser Methode durch fraktionierte Kristallisation aus flüssigem Ammoniak analytisch reines Tetramethylammonium-Peroxyinitrit gewonnen werden. Dieses ist dann bei trockener Lagerung unter Stickstoff mehrere Monate haltbar.

### 2.1.8 Methode 8: Photolyse von festem Natriumnitrat

Als letzte Methode zur Darstellung von Peroxyinitrit soll hier die Bestrahlung von festem Natriumnitrat mit UV-Licht bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  <sup>67, 68)</sup> vorgestellt werden.

#### **Gleichung 10**



Bei diesen von *Edwards* und *Plumb* beschriebenen Verfahren liegen die Ausbeuten nur bei ca. 0,3% . Zusätzlich weist das entstandene Peroxyinitrit eine hohe Verunreinigung durch Kaliumnitrat und -nitrit auf. Die Nitritverunreinigung steigt mit zunehmender Bestrahlungszeit sogar weiter an.

### 2.1.9 Überblick der Kontaminationen in den einzelnen Methoden

In der folgenden Tabelle wird eine Übersicht über die bei den einzelnen Synthesen auftretenden anorganischen Verunreinigungen gegeben.

**Tabelle 2.1**

	<b>anorganische Kontaminationen</b>			
	<b>Nitrit</b>	<b>Nitrat</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Alkali</b>
<b>Methode 1</b> <i>Ozon + Azid</i>	mittel	k.A.	keine	gering
<b>Methode 2</b> <i>Autoxidation von Hydroxylamin</i>	hoch	gering	hoch	hoch
<b>Methode 3</b> <i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HNO<sub>2</sub></i>	verschieden <sup>1</sup>	hoch	hoch	sehr hoch
<b>Methode 4</b> <i>Alkylnitrit + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	gering <sup>2</sup>	k.A.	gering	hoch
<b>Methode 5</b> <i>NO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	kein	k.A.	hoch	hoch
<b>Methode 6</b> <i>KO<sub>2</sub> + NO</i>	gering	kein	hoch	gering <sup>3</sup>
<b>Methode 7</b> <i>NO + (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup> OONO<sup>-</sup></i>	gering	k.A.	kein	gering <sup>3</sup>
<b>Methode 8</b> <i>NO<sub>3</sub> Photolyse</i>	mittel	sehr hoch	kein	gering <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Es hängt von der Konzentration der Edukte zueinander und der Reaktionszeit ab (ausführlich siehe <sup>55</sup>)

<sup>2</sup> Bei Amylnitrit ist es deutlich höher.

<sup>3</sup> Bezieht sich nur auf die Reaktionsprodukte. Zu diesen Reaktionsprodukten muß jedoch noch verdünnte Alkalilösung hinzugegeben werden, um das Peroxynitrit zu extrahieren und zu stabilisieren.

Bei der Beurteilung des Kontaminationsgrades muß beachtet werden, daß OH<sup>-</sup>-Ionen eine unvermeidliche Verunreinigung darstellen, da Peroxynitrit nur als Anion bei pH ≥ 11 stabil ist. Für den Fall, daß darauf verzichtet werden muß, müssen dann aber entsprechende Puffersysteme eingesetzt werden.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen kann als Oxidationsmittel selbst mit den Substraten reagieren und somit zur Mißdeutung der Ergebnisse führen<sup>69, 70</sup>). Hinzu kommt, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peroxynitrit miteinander unter Sauerstoffbildung reagieren<sup>71</sup>), die Entfernung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt jedoch keinerlei Problem dar, wie Untersuchungen von *Uppu* und *Pryor* zeigen<sup>61</sup>). Sie stellten fest, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 99,9% durch MnO<sub>2</sub> unter Verlust von 16% Ausbeute an Peroxynitrit entfernt werden kann.

Je nach verwendeter Methode treten noch weitere Verunreinigungen auf, die sich störend auf die Umsetzungen von Peroxynitrit mit Substraten auswirken können und daher beachtet werden müssen.

- Methode 1: Azide
- Methode 2: Hydroxylamin
- Methode 4: Alkylnitrit und die korrespondierenden Alkohole
- Methode 7: bei Verwendung von Tetramethylammonium-Hydroxid

So können Überreste von Hydroxylamin mit Carbonylfunktionen Oxime bilden und eine Vielzahl von Enzymen hemmen (Oxidasen, Katalasen, Alkohol-Dehydrogenase u.v.m.).

Nachdem alle Möglichkeiten zur Synthese von Peroxynitrit beschrieben wurden, soll nun die Frage geklärt werden, welche Methode die beste ist.

Auf diese Frage gibt es keine allgemeingültige Antwort, da die Auswahl der Methode zur Herstellung von Peroxynitrit stark von dessen geplanter Verwendung abhängt. Um beispielsweise qualitative Zerfallsstudien<sup>1</sup> durchzuführen, wäre Methode 8 ungeeignet, da hier hohe Konzentrationen an Nitrit/Nitrat bei der Synthese anfallen. Als Methode der Wahl würde sich

---

<sup>1</sup> Hier sind die anorganischen Zerfallsprodukte gemeint und keine Untersuchungen zur Geschwindigkeit

zu diesem Zweck Methode 4 anbieten (2-Ethoxyethyl-Nitrit/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), bei welcher die geringsten Verunreinigungen durch Nitrit/Nitrat auftreten.

*Radi*<sup>72)</sup> verwendete für seine Untersuchungen zur Kinetik des Zerfalls von Peroxynitrit mit der „Stopped-Flow“-Spektroskopie<sup>73)</sup> Methode 1 (Azid/Ozon), da die Kontamination durch Alkali bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> so gering wie möglich sein mußten.

Sind besonders hohe Konzentrationen an Peroxynitrit erforderlich, so bietet sich Methode 4 mit Isoamylnitrit an.

Wird kristallines Peroxynitrit benötigt, so bleibt nur die Reaktion von Tetramethylammonium-Superoxid mit NO (siehe Gleichung 9 auf Seite 34).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß es von entscheidender Bedeutung ist, die Kontaminationen der jeweils eingesetzten Methode zu kennen, um die Ergebnisse von Studien über die chemischen und biochemischen Effekte von Peroxynitrit richtig beurteilen zu können.

Um die Synthesemethode auszuwählen, die zur Lösung der hier vorgelegten Problemstellung am geeignetsten erscheint, müssen folgende Überlegungen vorangestellt werden.

Mit welchen der in Tabelle 2.1 aufgeführten Verunreinigungen können die Purin- bzw. Pyrimidinbasen reagieren und sind eventuell Kreuzreaktionen zu erwarten?

Da weder direkte Reaktionen mit den Purin- bzw. Pyrimidinbasen noch Kreuzreaktionen mit anderen Reagentien zu erwarten sind, spielten eventuelle Verunreinigungen mit Nitrat daher keinerlei Rolle.

Anders ist dies bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches selbst ein starkes Oxidations- bzw. Reduktionsmittel ist. Da es aber leicht aus der Peroxynitrit-Lösung zu entfernen ist<sup>1</sup>, sollte auch dies keinerlei Problem für die durchzuführenden Reaktionen darstellen.

Da alle Umsetzungen mit Peroxynitrit im alkalischen pH-Bereich begonnen wurden, sind auch Alkalikontaminationen für die hier durchgeführten Untersuchungen nicht von Bedeutung. Natrium- oder Kaliumionen sind nicht in der Lage, selbst mit den Substraten eine Reaktion einzugehen, so daß dadurch keine Störung zu erwarten war.

---

<sup>1</sup> Mit granuliertem MnO<sub>2</sub> lassen sich 99,9% des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entfernen, siehe auch unter 6.2.1 „Quenched Flow“ Methode (ab Seite 117)

Es sollte jedoch unbedingt vermieden werden, organische Kontaminationen in die Reaktion einzuschleppen, welche die Isolierung und Struktur- aufklärung der Reaktionsprodukte erheblich erschweren würden. Auch war die Wahl eines gegenüber Peroxynitrit inerten Lösungsmittels wichtig.

Aus diesem Grund wurde auf Methoden verzichtet, bei denen organische Verbindungen beteiligt sind. Des weiteren schieden bestimmte Synthesemethoden aufgrund fehlender apparativer Ausrüstung aus. So zählt beispielsweise ein Ozongenerator nicht zur Laborausstattung.

Aus den aufgeführten Gründen werden zwei, in unserer Arbeitsgruppe praktikable Methoden vorgestellt:

1. Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit salpetriger Säure (Methode 3 Seite 29)
2. Reaktion von kristallinem Kaliumsuperoxid mit NO-Gas (Methode 6 Seite 33 )

In den folgenden Abschnitten soll die Entwicklung der benötigten Apparaturen sowie die Durchführung der Synthese genauer erläutert werden.

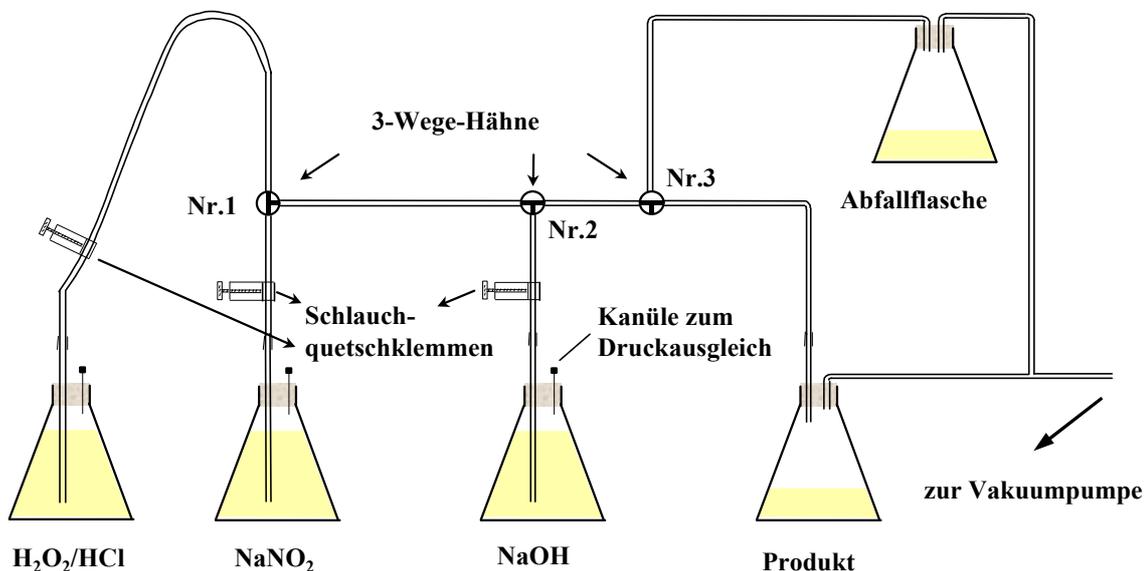
## 2.2 Der verwendete Quenched Flow Reaktor

Die Reaktion von salpetriger Säure mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (siehe Gleichung 4 auf Seite 28) gilt als erste und älteste Methode zur Synthese von Peroxynitrit in größeren Mengen und wurde bereits 1964 von *Papée*<sup>51)</sup> beschrieben.

*Reed*<sup>52)</sup> hat 1974 durch die Entwicklung des sogenannten „Quenched-Flow-Reaktors“ eine deutliche Verbesserung der Methode erreicht (siehe Seite 29). Zum Transport der einzelnen Lösungen aus ihren Vorratsflaschen und zur Einstellung einer bestimmten Flußgeschwindigkeit verwendete *Reed* Stickstoff aus Druckgasflaschen. Dies machte die Handhabung der Apparatur recht umständlich. Eine deutliche Verbesserung im Gebrauch der Apparatur brachte *Beckmans*<sup>74)</sup> Vorschlag, normales Hausvakuum an Stelle des Druckgases zu verwenden. Auf der Grundlage dieser Veröffentlichungen wurde ein „Quenched-Flow“-Reaktor entwickelt, der die Vorteile aller bisher beschriebenen Methoden auf sich vereinigt.

In Abbildung 2.1 ist der Aufbau des von mir verwendeten Reaktors schematisch dargestellt.

**Abbildung 2.1 Quenched-Flow -Reaktor**

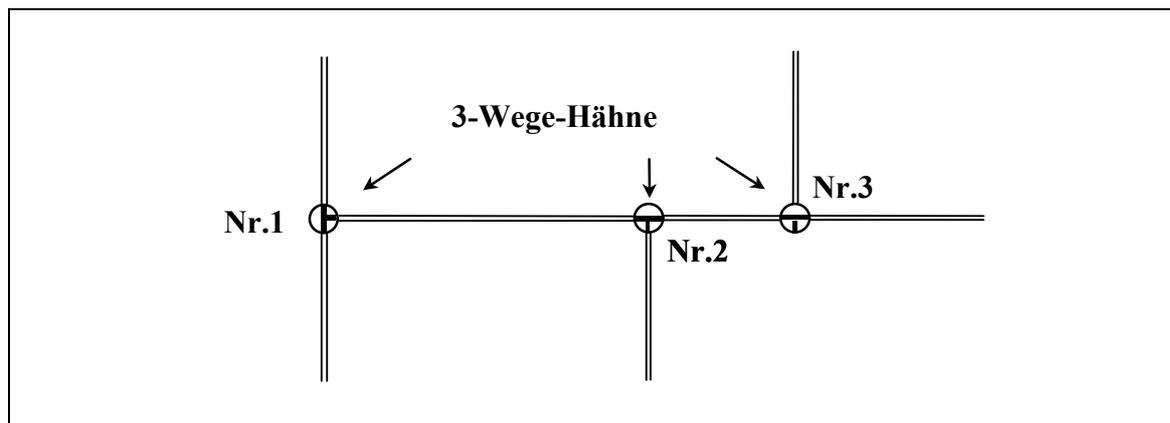


Die Apparatur besteht aus je einem Weithals-Erlenmeyerkolben für jedes Reagenz, für das Produkt, sowie einem Auffanggefäß für den Abfall. Alle Kolben sind mit durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die Gummistopfen wird ein Saugrohr geführt, welches bis kurz über den Boden des Kolbens reicht.

Um für einen Druckausgleich während der Reaktion zu sorgen, wurde jeder Gummistopfen zusätzlich mit einer Kanüle ( $\varnothing 0,6 \text{ mm}$ ) durchstoßen.

Die Saugrohre wurden nun untereinander über PVC-Schläuche mit einem Glasrohrsystem verbunden (siehe Abbildung 2.2), wobei der Innendurchmesser dieser Glasrohre 2 mm betrug. Durch Anlegen eines Vakuums können jetzt die Reaktionsflüssigkeiten aus den Vorratsgefäßen herausgesaugt und im Schlauchsystem miteinander zur Reaktion gebracht werden.

Abbildung 2.2      Ausschnitt aus dem Quenched-Flow -Reaktor



Bevor die Apparatur in Betrieb genommen werden konnte, mußte der Fluß für jede Flasche separat eingestellt werden. Dazu wurde Wasser in die einzelnen Weithals-Erlenmeyerkolben gefüllt und mit der Vakuumpumpe ein Unterdruck angelegt<sup>1</sup>. Die 3-Wegehähne 1 und 2 und alle Schlauchquetschklappen<sup>2</sup> waren zu diesem Zeitpunkt geschlossen. Nun wurden für die jeweilige Vorratsflasche die entsprechende Klemme und die Hähne 1 und 2 geöffnet<sup>3</sup>. Es wurde das Volumen bestimmt, das während einer vorgegebenen Zeit in die Produktflasche gelangte. Über die jeweilige Schlauchklemme wurde die Fließgeschwindigkeit reguliert. Diese Kalibrierung wurde für alle drei Vorratsgefäße analog durchgeführt, so daß nach Beendigung der Kalibrierung die Flüssigkeiten in allen Vorratsflaschen die gleiche Fließgeschwindigkeit besaßen.

Im Anschluß daran wurden nun die Vorratsgefäße mit den jeweiligen Reaktionslösungen, welche bereits im Kühlschrank vorgekühlt worden waren, befüllt und weiter im Eisbad auf ca. 2°C abgekühlt<sup>4</sup>. Da die Ergebnisse von *Saha et. al.*<sup>55)</sup> zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren, sind alle Umsetzungen bei ca. 2°C durchgeführt worden (siehe Abschnitt 2.1.3).

Anschließend wurden die 3-Wegehähne Nr.1 und Nr.2 möglichst gleichzeitig geöffnet, so daß alle drei Lösungen durch den Unterdruck angesaugt

<sup>1</sup> Sollwert 50 mbar,  $\Delta p = +10$  bar

<sup>2</sup> Die Klemmen sind auf den PVC Schläuchen montiert (siehe Abbildung 2.1).

<sup>3</sup> Die Klemmen der anderen beiden Vorratsflaschen sind verschlossen.

<sup>4</sup> Die Temperatur lag während der Umsetzungen immer zwischen 2°C und 4°C.

wurden. Hahn Nr.3, welcher es ermöglicht, zwischen Abfallflasche und Produktgefäß zu wechseln, wurde zunächst in Richtung Abfallflasche geschaltet. Wenn nach einigen Sekunden eine konstant gelbe Färbung der aufgefangenen Flüssigkeit beobachtet werden konnte, wurde auf Produktsammlung umgeschaltet. Es war darauf zu achten, daß zu keinem Zeitpunkt Luft in das Schlauchsystem gesaugt wurde<sup>1</sup>.

Anschließend wurde das Produkt zur Bestimmung der Peroxynitritkonzentration bei 302 nm photometrisch vermessen<sup>46)</sup>.

Zur Optimierung der Ausbeute an Peroxynitrit wurden verschiedene Parameter der Apparatur wie Ausgangskonzentrationen der Stammlösungen, die Reaktionsstrecke<sup>2</sup> und die Fließgeschwindigkeit variiert. Es wurde immer nur ein Parameter auf einmal geändert, um die Veränderungen genau beurteilen zu können.

Um den Einfluß der Konzentration der Stammlösungen festzustellen, wurde jeweils einmal die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl-oder die NaNO<sub>2</sub>-Stammlösung im Überschuß hinzugegeben. Die Variation der Ausgangskonzentration hatte jedoch nur einen geringen Einfluß auf die Ausbeute an Peroxynitrit. Dies war auch nicht verwunderlich, da die Reaktanden äquimolar miteinander reagieren und beide außerordentlich reaktiv sind.



Bei einem Überschuß an Nitrit wurde nicht abreagiertes Nitrit gefunden. Im anderen Fall lag noch nicht abreagiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vor. Da Nitrit selbst oxidierende Eigenschaften besitzt, mußte bei dem verwendeten System ein Nitritüberschuß im Reaktionsansatz unbedingt vermieden werden, während nicht abreagiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kein Problem darstellte, da die Zerstörung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit MnO<sub>2</sub> einfach durchzuführen war.

Die Fließgeschwindigkeit hatte hingegen einen erheblichen Einfluß auf die Ausbeuten. Diese schwankten zwischen 36 mM/L bei 150 mL/min und 120 mM/L bei 600 mL/min. Jedoch führte ein Fluß von über 600 ml/min zu keiner weiteren Steigerung der Konzentration an Peroxynitrit. Die

---

<sup>1</sup> vorher wird wieder in Richtung Abfallflasche geschaltet

<sup>2</sup> Die Reaktionsstrecke ist die Strecke zwischen Hahn 1 und 2.

Reaktionsstrecke betrug für alle Messungen, bei der die Fließgeschwindigkeit variiert wurden, 11 cm.

Abschließend wurde die Reaktionsstrecke in einem Bereich zwischen 5 und 40 cm variiert. Durch die Verkürzung oder Verlängerung der Reaktionsstrecke konnten große Änderungen in den Ausbeuten erreicht werden.

Eine Variation des Flusses bzw. der Reaktionsstrecke sind im Grunde gleichzusetzen mit einer Veränderung der Reaktionszeit. Die Ausbeute erwies sich hierbei in gewissen Grenzen als umgekehrt proportional zur Wegstrecke. Es konnte beobachtet werden, daß die Ausbeute bis zu einem Grenzwert um so höher ist, je kürzer die Reaktionszeit ist. Wird diese Zeit jedoch unterschritten, so reicht die Zeit nicht mehr aus, daß die Edukte vollständig zu Peroxynitrit abreagieren können. Ein Beleg dafür ist, daß unverbrauchtes Nitrit und  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachweisbar sind.

Eine Variation der Reaktionszeit kann durch eine Erhöhung des Flusses oder durch eine Verkürzung der Reaktionsstrecke erreicht werden. Es ist allerdings sinnvoller, die Wegstrecke anstatt des Flusses zu verändern, da dies einfacher in der Praxis durchzuführen ist.

Als Optimum erwies sich die Kombination von 11 cm Wegstrecke und einem Fluß von 600 mL/min, welche zu einer Ausbeute von 120 mMol/L führte. Die gebildete Peroxynitrit-Lösung konnte bei Temperaturen  $< -25^\circ\text{C}$  mehrere Wochen aufbewahrt werden.

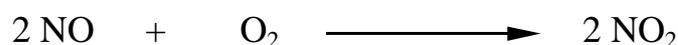
Der Vorteil dieser Methode zur Darstellung von Peroxynitrit besteht darin, daß große Mengen hergestellt werden können. Nachteilig ist die hohe Salzbelastung der Peroxynitrit-Lösung durch anorganische Salze (vor allem NaOH und  $\text{KNO}_3$ ).

## 2.3 Zur Synthese von Peroxynitrit mittels Gasbürette

Die Reaktion von Kaliumsuperoxid und NO-Gas wurde prinzipiell schon in Abschnitt 2.1.6 besprochen.

Anhand dieser Reaktion und der von *Koppenol et. al.* <sup>50)</sup> gewonnenen Erkenntnissen wurde eine Apparatur zur Synthese von Kaliumperoxynitrit entwickelt.

Das wichtigste Kriterium für die Funktionsfähigkeit der Apparatur ist die absolute Dichtigkeit und Sauerstofffreiheit, da NO<sup>•</sup> spontan mit Luft-sauerstoff zu NO<sub>2</sub> reagiert.



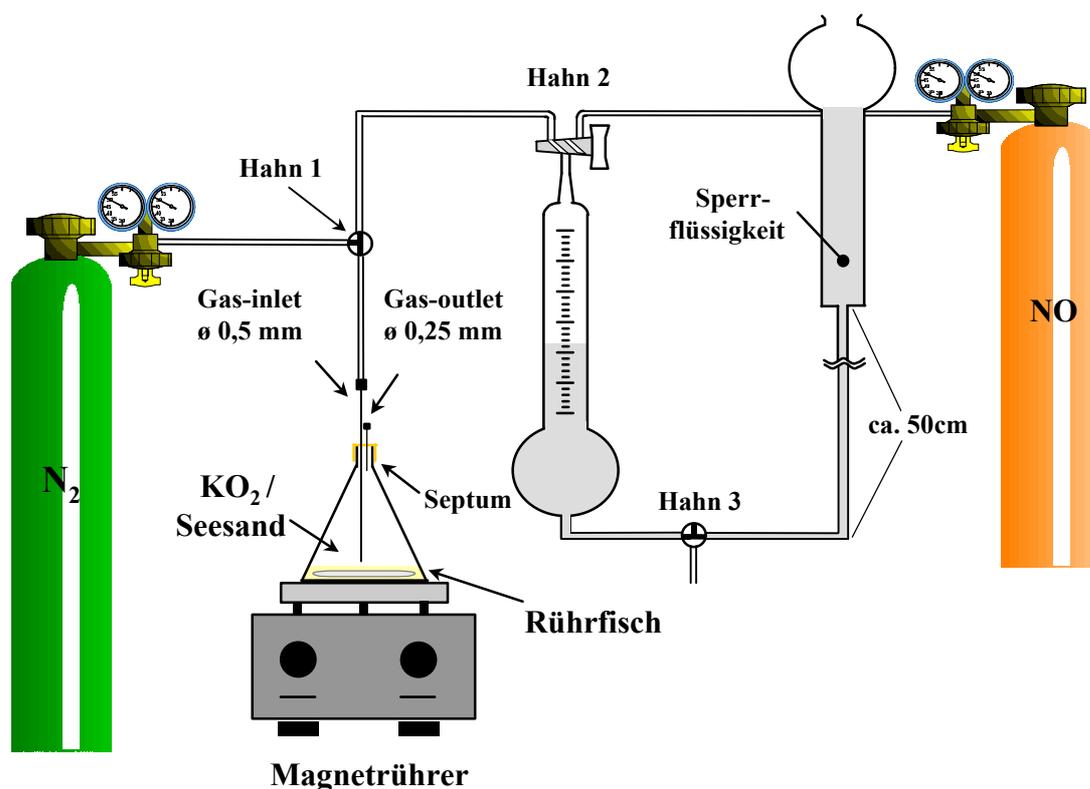
Das verwendete NO<sup>•</sup> wurde einer Druckgasflasche entnommen und in eine Gasbürette überführt, in welcher sich eine gesättigte Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung als Sperrflüssigkeit befand. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde hinzugegeben, um die Löslichkeit von NO in Wasser zu senken.

Die Gasbürette wurde aus einer handelsüblichen 50 mL Bürette vom Glasbläser umgearbeitet (siehe Abbildung 2.3). Bei der Konzeption wurde darauf geachtet, alle Schlauchverbindungen möglichst kurz zu halten, um das Totvolumen innerhalb der Apparatur zu minimieren. Zur Verbindung aller Bestandteile wurde ein Siliconschlauch Ø 4mm verwendet. Die Gasdichtheit sollte durch die ausschließliche Verwendung von Luer-Lock-Hähnen und entsprechenden Luer-Lock-Schlauchadaptern<sup>1</sup> gewährleistet werden.

---

<sup>1</sup> Luer-Lock wird in der Medizintechnik verwendet.

Abbildung 2.3



Im folgenden Abschnitt soll die genaue Durchführung der Herstellung von Kaliumperoxynitrit erläutert werden.

Wie oben bereits erwähnt, ist die Abwesenheit von Sauerstoff innerhalb der Apparatur von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Synthese von Kaliumperoxynitrit. Aus diesem Grund wurde als erstes die gesamte Anlage ca. 10 min mit einem schwachen Stickstoffstrom gespült. Dazu wurde Hahn 1 zunächst in Richtung des Reaktionsgefäßes<sup>1</sup> und anschließend zur Gasbürette hin geöffnet. Mit der Stellung der Hähne 2 und 3 wurde bestimmt, ob der Weg zur NO-Druckgasflasche oder die Gasbürette von Sauerstoff befreit wurde. Der Stickstoff wurde einige Minuten durch die in der Gasbürette befindliche Sperrflüssigkeit geleitet. Wurde der Teil der Apparatur, welcher zur NO-Druckgasflasche führt gespült, mußte das Manometer voll geöffnet und durfte nicht fest angeschlossen sein<sup>2</sup>, um ein Durchströmen zu gewährleisten.

<sup>1</sup> Reaktionsgefäß ist mit KO<sub>2</sub>/Seesandmischung gefüllt.

<sup>2</sup> Das Manometer wurde während eines **leichten** Stickstoffdurchstroms nach einigen Minuten wieder angeschraubt.

Nach diesen Vorarbeiten wurde NO-Gas in die Gasbürette geleitet (Umlegen von Hahn 2) und das gesamte Volumen der Gasbürette, inklusive der ca. 50 ml Gas fassenden Glaskugel unterhalb des graduierten Bereichs, mit Stickstoffmonoxid befüllt, so daß das NO-Gas durch die Sperrflüssigkeit hindurch perlte. Dadurch wurde der gesamte Stickstoff aus diesem Bereich entfernt. Durch Braunfärbung des Gasraumes über der Sperrflüssigkeit (Stickstoffmonoxid beginnt zu entweichen und reagiert zu NO<sub>2</sub>) war der Zeitpunkt, zu dem sich kein Stickstoff mehr in der Gasbürette befand, gut zu erkennen.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Umlegen der Hähne 1 und 2 in Richtung des Erlenmeyerkolbens<sup>1</sup> und Öffnen von Hahn 3. Dadurch floß die Sperrflüssigkeit in die Gasbürette ein und verdrängte so das NO-Gas<sup>2</sup>. Die Gaseinleitungskanüle wurde erst dann durch das Septum gestochen und bis kurz über die Reaktionsmischung eingeführt, als das Totvolumen nur noch aus NO-Gas bestand (dazu Gaseinleitkanüle z.B. in ein Reagenzglas halten und Braunfärbung abwarten) und die Sperrflüssigkeit gerade den graduierten Bereich erreicht hatte. Im Anschluß wurde sofort die zweite dünnere Kanüle (Gasauslaß) als Druckausgleich ebenfalls durch das Septum gestochen.

Jetzt wurden genau 50 mL NO-Gas<sup>3</sup> in den Erlenmeyerkolben eingeleitet. Der Reaktionsbeginn war deutlich an der Gelbfärbung des KO<sub>2</sub>/Seesandgemisches zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt konnte die zweite dünnere Kanüle (Gasauslaß) wieder entfernt werden. Zuviel NO kann zu spontanem Zerfall des Reaktionsansatzes führen und war unbedingt zu vermeiden (siehe auch Seite 33).

Während der gesamten Gaseinleitung wurde die Reaktionsmischung kräftig gerührt, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Der verwendete Rührkern mußte deshalb über den gesamten Durchmesser des Erlenmeyerkolbens reichen.

War alles NO umgesetzt, wurden die Apparatur und der Erlenmeyerkolben erneut mit Stickstoff gespült und so von restlichem NO-Gas befreit. Der Reaktionsansatz wurde zur Stabilisierung mit kalter etwa 0,01 M KOH versetzt. Hierbei war zu beachten, daß die Konzentration der Kalium-

---

<sup>1</sup> Der Rührkern dient in Verbindung mit dem Seesand als „Sandmühle“ für das Kalium-Superoxid.

<sup>2</sup> Die NO Einleitgeschwindigkeit (2 mL/min) wird durch die Stellung von Hahn 3 reguliert (Einströmgeschwindigkeit der Sperrflüssigkeit!).

<sup>3</sup> Die Einwaage betrug etwa 0,3g KO<sub>2</sub>.

peroxynitrit-Lösung vom zugegebenen Volumen an KOH abhängig ist. Je weniger KOH hinzugefügt wird, desto höher ist die Konzentration der Peroxynitritlösung. Dies war wichtig, da bei den späteren Umsetzungen Verdünnungseffekte minimiert werden sollten.

Nicht umgesetztes  $\text{KO}_2$  disproportioniert, wie in Gleichung 13 auf Seite 119 beschrieben, zu Sauerstoff und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nach Entfernung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{MnO}_2$  (siehe hierzu auch Kapitel 6.2.1) wurde anschließend durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 302 \text{ nm}$  mit  $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  die Peroxynitrit-Konzentration bestimmt<sup>46)</sup>.

Der Vorteil dieser Darstellungsmethode ist die hohe Reinheit des gewonnenen Peroxynitrits, der allerdings durch einen hohen Zeitaufwand bei nur kleinen Ansätzen geschmälert wird. Trotzdem wurde Peroxynitrit in der Mehrzahl der Fälle nach dieser Methode hergestellt.

Nach Fertigstellung aller Umsetzungen der Purin- und Pyrimidinbasen konnten jedoch keinerlei Unterschiede bei den Reaktionsprodukten festgestellt werden.

Es zeigte sich jedoch, daß bei den Umsetzungen in Kapitel 2.4 die Methode der Peroxynitritherstellung keinen Einfluß auf die Produktbildung hat.

## 2.4 Umsetzung der Kernbasen mit den reaktiven Spezies

Bevor die Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid bzw. Stickstoffdioxid durchgeführt werden konnten, mußte ein geeignetes Lösungsmittel für die verwendeten Purin- oder Pyrimidinbasen gefunden werden, welches folgende Kriterien erfüllen mußte:

- inertes Verhalten gegenüber den Edukten
- aprotisch, um Nebenreaktionen mit  $\text{NO}/\text{NO}_2$ <sup>1</sup> zu verhindern,
- polar, um die verwendeten schwerlöslichen Purin- oder Pyrimidinbasen lösen zu können.

Das einzige Lösungsmittel, das alle diese Anforderungen erfüllte, war DMSO, das trotz der unten genannten Nachteile verwendet werden mußte.

---

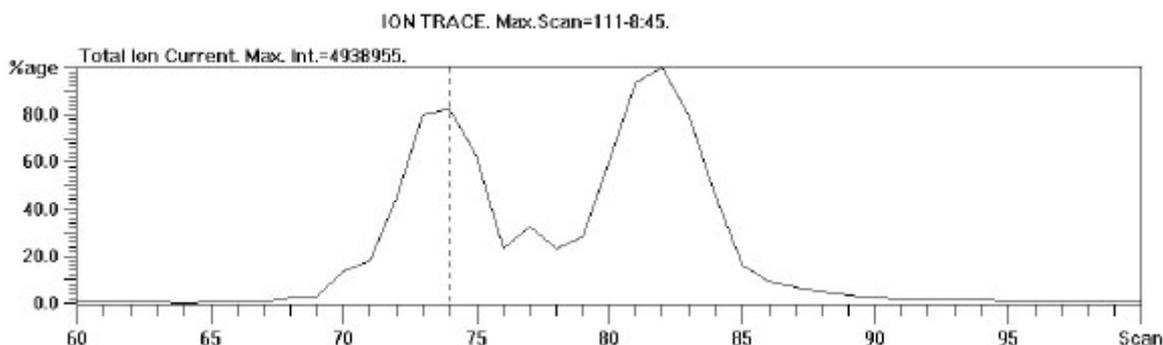
<sup>1</sup> Es entstehen stickstoffhaltige Säuren, welche selbst mit den Purin- oder Pyrimidinbasen reagieren können.

Lediglich Guanin konnte in keinem Lösungsmittel gelöst werden und mußte daher als Suspension eingesetzt werden.

Als großer Nachteil bei der Verwendung von DMSO stellte sich die Abtrennung des Lösungsmittels vom Produkt heraus. Der hohe Siedepunkt von 189°C und die hohe Viskosität machten es unmöglich DMSO -selbst im Ölpumpenvakuum- abzudestillieren<sup>1</sup>. Auch bei der späteren Separierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC war DMSO von Nachteil. Es belastete durch seine Viskosität die HPLC-Pumpe (Druckanstieg nach der Injektion) und die HPLC-Säule. Dies machte häufiges Spülen der Säule notwendig. Des weiteren waren im Massenspektrum der Reaktionsprodukte, die erst nach rund 7 min von der HPLC-Säule eluierten, noch Reste von DMSO sichtbar, obwohl dieses mit der Fließmittelfront lief.

Zur Verdeutlichung sind in den folgenden beiden Abbildungen das TIC (Total Ion Chromatogramm in Abbildung 2.4) des isolierten Produktes der Reaktion von Cytosin mit NO<sub>2</sub>, sowie das Massenspektrum des ausgewählten Signals (Nr. 74 in Abbildung 2.5) exemplarisch für diese Problematik abgebildet. Der erste Peak im TIC ist das der Substanz noch anhaftende DMSO. Dies läßt sich durch das zu Signal 74 gehörende Massenspektrum belegen, welches mit dem von DMSO identisch ist (siehe dazu *Hesse, Meier, Zeeh*<sup>75</sup> ). Der zweite Peak im TIC gehört zum Reaktionsprodukt<sup>2</sup>.

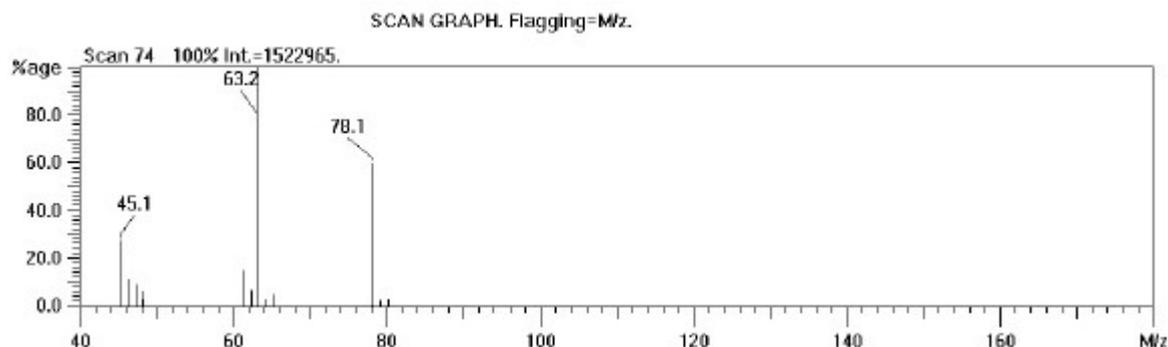
## Abbildung 2.4



<sup>1</sup> Um eventuelle Zersetzungen der Produkte zu vermeiden wurden keine Temperaturen über 50°C verwendet.

<sup>2</sup> Mit fortschreitender Signalnummer wurde ein steigender Temperaturgradient gefahren (MS Quelle wurde immer weiter beheizt), die Substanz wurde also nach dem DMSO verdampft.

Abbildung 2.5



Es sind deutlich

- der Molekülpeak von  $m/z = 78$  und
- der Basispeak  $m/z (M-CH_3) = 63$  zu sehen.

Bei den durchgeführten HPLC-MS Untersuchungen erwies es sich ebenfalls als schwierig, das DMSO von den Substanzen abzutrennen. So mußten Eluenten gefunden werden, bei denen die Retentionszeit von DMSO genügend weit von der zu untersuchenden Substanz entfernt war<sup>1</sup>.

#### 2.4.1 Zur Umsetzung mit Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>)

Um die Purin- und Pyrimidinbasen mit NO<sub>2</sub> umzusetzen, wurden sie in DMSO gelöst und NO<sub>2</sub> in diese Lösung eingeleitet.

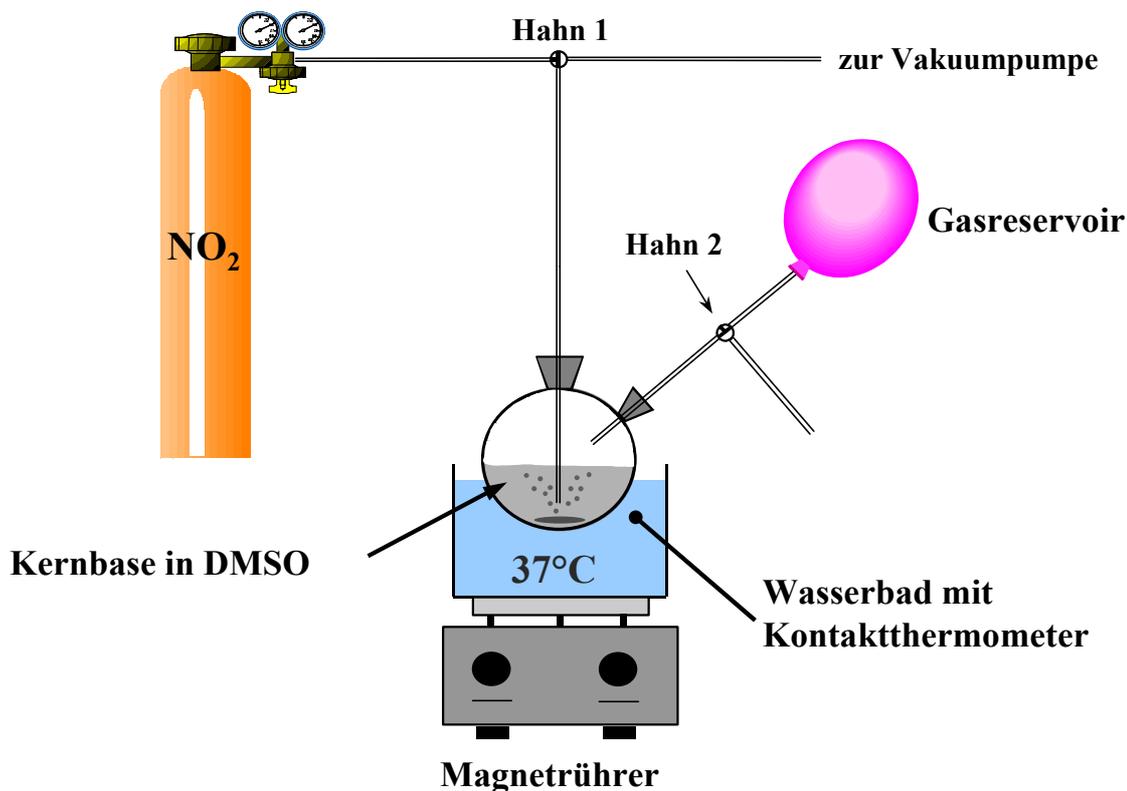
Der verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Es wurde ein Latexballon als Gasreservoir verwendet, um den Verbrauch an NO<sub>2</sub> zu vermindern (Reaktionszeit 1h !).

Zunächst wurde NO<sub>2</sub> langsam und kontinuierlich durch die Lösung geleitet, wobei Hahn 2 noch in Richtung Gasreservoir geschlossen war. Das Ende des Einleitungsrohres war mit einer lösungsmittelbeständigen Fritte versehen, so daß das einströmende Gas in sehr feinen Bläschen durch die Lösung perlen konnte.

---

<sup>1</sup> Es wurden ausschließlich Eluenten mit hohem Wassergehalt verwendet, in denen DMSO sehr gut löslich ist.

Abbildung 2.6



Nachdem der Gasraum über der Lösung vollständig mit  $\text{NO}_2$ -Gas gefüllt war, wurde Hahn 2 in Richtung des Gasreservoirs geöffnet und der Ballon befüllt. Anschließend wurde Hahn 1 geschlossen und der Reaktionsansatz 1h bei  $37^\circ\text{C}$  gerührt. Die Lösung verfärbte sich bei allen Kernbasen nach wenigen Minuten tannengrün. Versuche ohne Kernbase führten zu dem Schluß, daß die Färbung nicht durch die Kernbasen zustande kam, sondern es sich um in DMSO gelöstes  $\text{NO}_2$  handeln mußte. Die Verfärbung nahm bei den Versuchen mit steigender  $\text{NO}_2$  Konzentration zu. Die Lösungen waren letztlich schwarz gefärbt und nicht mehr durchsichtig. Dieser Zustand wurde jedoch nur erreicht, wenn permanent weiter  $\text{NO}_2$  durch das DMSO geleitet wurde.

Nach Beendigung der Reaktion wurde Hahn 2 verschlossen und Hahn 1 in Richtung Vakuum umgelegt ( $100\text{ mbar}$ )<sup>1</sup>. Durch mindestens  $1\frac{1}{2}$  stündiges Rühren wurde noch in der Lösung befindliches  $\text{NO}_2$  wieder größtenteils vertrieben. Um die letzten Reste zu entfernen, wurde anschließend Stickstoff

<sup>1</sup> Das Gaseinleitungsrohr wurde vorher über den Flüssigkeitsstand gebracht.

durch die Lösung gespült. Die Lösung war bei allen Versuchen schwach bis stärker orange gefärbt.

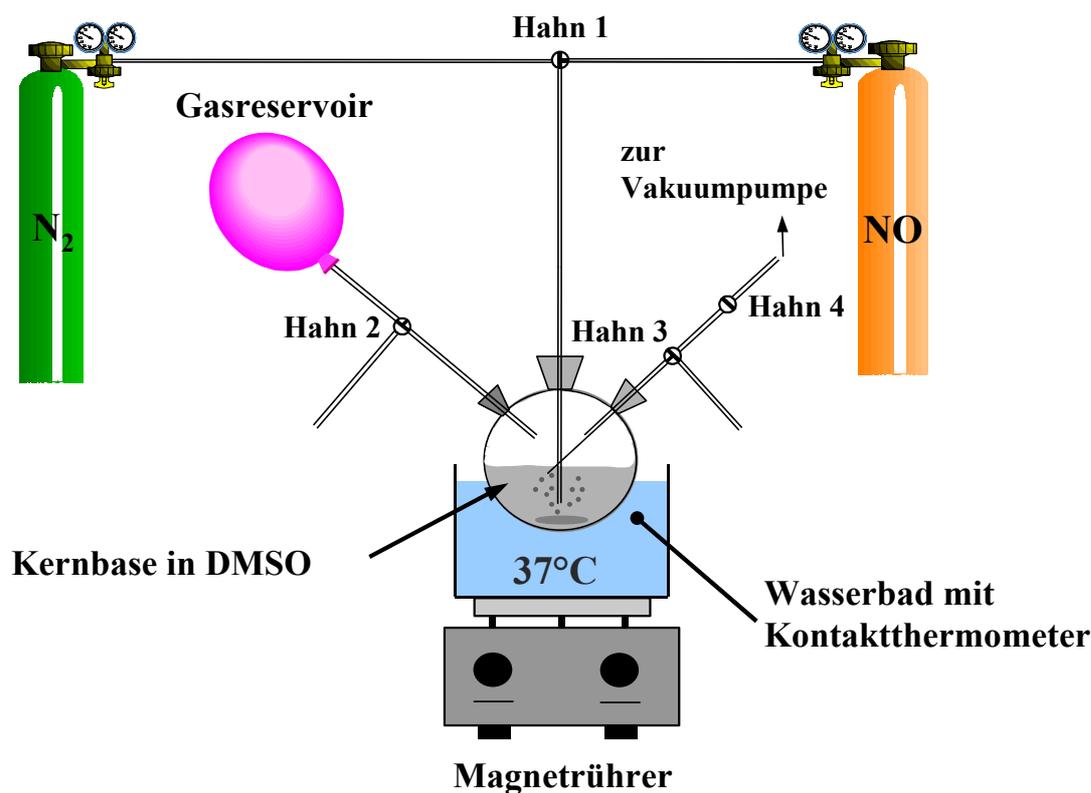
Die so entstanden Reaktionslösungen wurden nun zur weiteren Analytik eingesetzt.

### 2.4.2 Zur Umsetzung mit Stickstoffmonoxid (NO)

Für die Reaktion der Kernbasen mit NO war es, wie bereits in Abschnitt 2.3 erläutert, absolut notwendig, daß das NO-Gas nicht mit Sauerstoff in Berührung kam<sup>1</sup>.

Daher war es nötig, die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Apparatur etwas abzuändern. In Abbildung 2.7 ist der verwendete Versuchsaufbau für die Umsetzungen schematisch dargestellt.

**Abbildung 2.7**



<sup>1</sup> Vermeidung der Reaktion von NO mit Sauerstoff zu NO<sub>2</sub>.

Mit dieser Anordnung war gewährleistet, daß das gesamte System vor der Reaktion mit Stickstoff gespült werden konnte.

Außerdem mußte die Apparatur weder vor der Einleitung des NO noch zu dessen Entfernung nach der Reaktion geöffnet werden.

Die Abwesenheit von Sauerstoff ließ sich leicht überprüfen. Blieb der Gasraum über dem Reaktionsgemisch farblos, hatte sich kein NO<sub>2</sub> gebildet, d.h. es war kein Sauerstoff vorhanden. Diese Kontrolle ist wichtig, da eine richtige und sinnvolle Interpretation der Ergebnisse nur sichergestellt werden konnte, wenn entstandene Reaktionsprodukte auch nur auf die jeweils verwendeten Reaktanden zurückzuführen waren.

All diese Anforderungen erfüllt die in Abbildung 2.7 skizzierte Apparatur.

Im folgenden werde ich die prinzipielle Durchführung der Umsetzungen kurz beschreiben. Zunächst wurde die gesamte Apparatur mit Stickstoff gespült. Dazu mußten die folgenden Schritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt werden:

1. Hahn 4 zur Vakuumpumpe ist geschlossen.
2. Hahn 1 nur in Richtung NO Manometer schalten und ca. 2 min schwach N<sub>2</sub> durchströmen lassen, während das NO-Manometer abgeschraubt und vollgeöffnet ist.
3. NO Manometer anschließend, noch während der Stickstoffspülung, an die Druckgasflasche anschließen und fest anziehen.
4. Hahn 1 in Richtung Dreihalskolben umlegen und vorher Hahn 2 und 3 ins „Freie“ schalten (N<sub>2</sub> perlt durch den Ansatz).
5. Hahn 3 in Richtung Vakuumpumpe schalten (Hahn 4 geschlossen!!).
6. Jetzt wird das Gasreservoir mehrmals mit N<sub>2</sub> befüllt und durch Umlegen von Hahn 2 wieder entleert (ist danach sauerstofffrei).
7. Hahn 1 nun in Richtung Dreihalskolben schalten (N<sub>2</sub> Weg geschlossen) und NO-Gasflasche öffnen, Hahn 2 ist zum Reservoir gedreht.
8. NO perlt nun durch den Reaktionsansatz und füllt Gasreservoir, Hahn 1 nach dem Befüllen nun so stellen, daß keinerlei Gaseinleitung möglich ist (NO und N<sub>2</sub>-Wege sind gesperrt).
9. Nach Ablauf der Reaktionszeit (1h bei 37°C) N<sub>2</sub>-Zufuhr wieder starten (Hahn 1 in Richtung N<sub>2</sub> aber Hahn 2 vorher völlig schließen).
10. Hahn 3 nun wieder ins „Freie“ schalten (ca. 15min N<sub>2</sub> durchperlen lassen).

11. Hahn 1 und 2 völlig schließen und Vakuum anstellen.
12. Hahn 3 Richtung Vakuum und Hahn 4 öffnen (kräftig rühren).
13. Nach 30min den Dreihalskolben abnehmen (Gasraum darf sich nicht braun färben !!!), Reaktion ist beendet.

Die Reaktionsansätze wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Die weitere Untersuchung der Lösung erfolgte anschließend mittels HPLC.

### 2.4.3 Die Umsetzungen mit Peroxynitrit

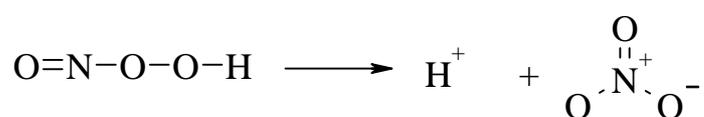
Um die angewandten Versuchsbedingungen zu bestimmen, war es wichtig, die chemischen Eigenschaften von Peroxynitrit zu kennen. Deshalb soll hier ein Überblick über die wesentlichen in der Literatur bekannten Eigenschaften gegeben werden.

Das Peroxynitrit-Anion ( $\text{ONOO}^-$ ) und seine korrespondierende Säure, die Peroxysalpetrige Säure ( $\text{ONOOH}$ ), waren und sind Grund für eine Vielzahl von Untersuchungen mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen.

Das Peroxynitrit-Anion und seine korrespondierende Säure sind in der Lage, eine Vielzahl von chemischen Reaktionen durchzuführen, wobei die ablaufenden Reaktionen mechanistisch nur in geringem Umfang bekannt sind.

Das Peroxynitrit-Anion selbst ist relativ unreaktiv. Erst durch Protonierung<sup>67)</sup> oder durch Addition anderer Lewis-Säuren wie z.B.  $\text{CO}_2$ <sup>76, 77, 78)</sup> oder nach Komplexbildung durch bestimmte Metallionen<sup>79, 80)</sup> (Mangan, Eisen) entstehen sehr reaktive Spezies. Diese sind in der Lage, Substanzen zu hydroxylieren, zu nitrieren oder zu oxidieren (es wurden ein- und zwei-Elektronen Reaktionen beobachtet<sup>81)</sup>). Eine weitere Möglichkeit ist die spontane Isomerisierung zu Nitrat. Ein quantitativer Reaktionsverlauf wurde bei saurem pH ( $\text{pH} \leq 4$ ) erreicht und so von *Coddington*<sup>82)</sup> beschrieben.

#### **Gleichung 11**



In schwach saurer oder alkalischer Lösung (bis pH = 8,5) bildet sich dagegen, neben kleineren Mengen an Nitrat, durch intramolekulare Disproportionierung vorrangig Sauerstoff und Nitrit im Verhältnis 1:2<sup>82)</sup> (Gleichung 12).

### Gleichung 12



Allen von *Coddington et. al.* erzielten Ergebnissen (pH 4 bis pH 10) war gemein, daß die Summe an gebildetem Nitrat und Nitrit gleich der Menge an eingesetztem Peroxynitrit war. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von *Pfeiffer et. al*<sup>83)</sup>.

Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, daß die genannten Untersuchungen auf reinen Zerfallsstudien ohne Zusatz von Substraten beruhen.

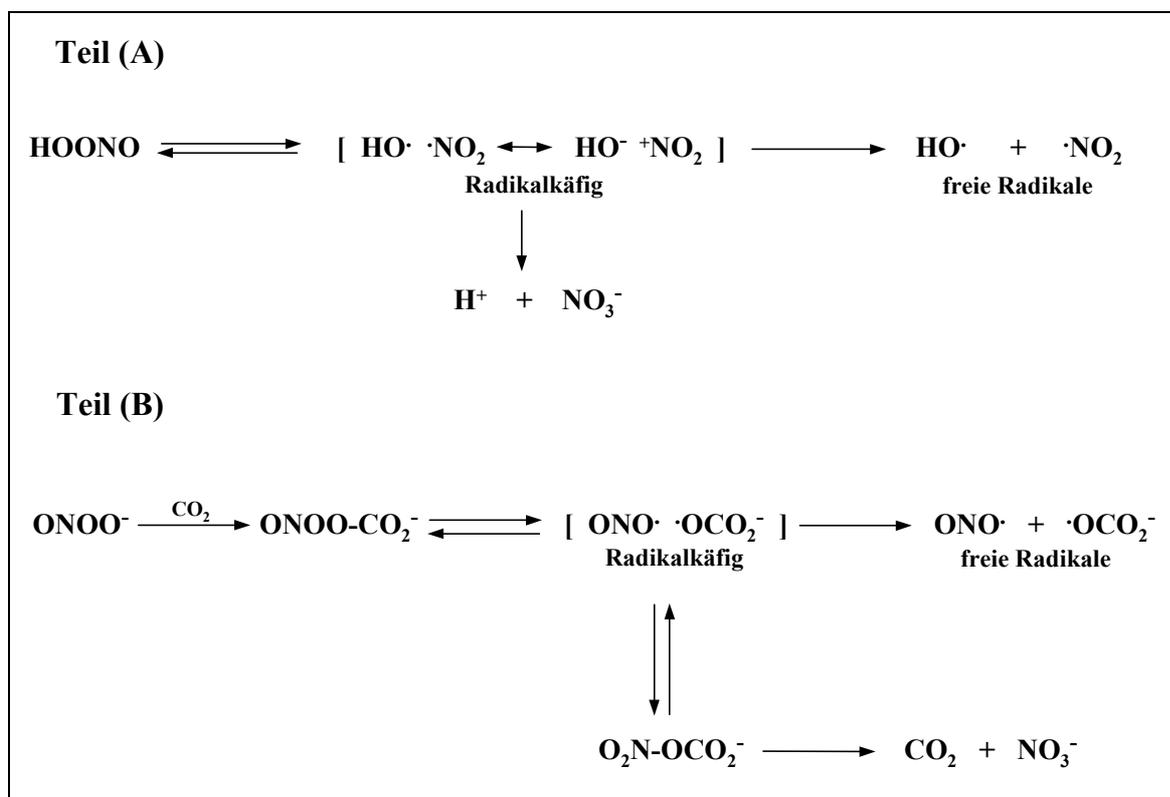
Von *Merényi*<sup>84)</sup> und *Beckman*<sup>85)</sup> wurde vorgeschlagen, daß eine homolytische Spaltung der Peroxysalpetrigen-Säure in NO<sub>2</sub><sup>·</sup> und Hydroxylradikale (OH<sup>·</sup>) erfolgt. Jedoch beschreibt *Koppenol* diesen Zerfall nach kinetischen und thermodynamischen Berechnungen als nicht wahrscheinlich<sup>86, 87)</sup>. Neueste Untersuchungen von *Squadrito* und *Pryor*<sup>88)</sup> lassen vermuten, daß NO<sub>2</sub>- und Hydroxylradikale einen Radikalkäfig bilden. Dieser ist jedoch nur in wäßrigen Lösungen<sup>1</sup> (siehe Abbildung 2.8 Teil A) und/oder in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> lange genug stabil (siehe Abbildung 2.8 Teil B), um mit organischen Substraten zu reagieren.

---

<sup>1</sup> Durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen.

## Abbildung 2.8

### Die mögliche Stabilisierung von Peroxynitrit über Radikalkäfige



Durch dieses unterschiedliche Reaktionsverhalten werfen die Umsetzungen mit Peroxynitrit Fragen auf und bis heute veröffentlichte Ergebnisse lassen noch keine eindeutigen Aussagen bezüglich der beobachteten Reaktionen zu. Ein weiterer Aspekt der Reaktivität von Peroxynitrit ergibt sich durch die Stereochemie. Nach den bisherigen Erkenntnissen liegt das Peroxynitrit-Anion in zwei Konformationen vor (siehe Abbildung 2.9).

## Abbildung 2.9

### Die beiden Konformationen von Peroxynitrit



Diese beiden Konformationen waren ebenfalls Anlaß zahlreicher Untersuchungen.

So geht Crow<sup>89)</sup> z.B. aufgrund von Differenzen bei den Ausgangs- und Endkonzentrationen an Peroxynitrit, bezüglich der Stöchiometrie der von ihm untersuchten Reaktionen<sup>1</sup>, von zwei Intermediaten während des Zerfalls aus. Nur eines davon bewirkt die Oxidationen, aber beide zerfallen zu Nitrat<sup>89)</sup>. Die einzelnen Zerfallsstudien von Peroxynitrit gehen von mehrfach hintereinander ablaufenden Radikalmechanismen aus.

Als sicher bei allen Untersuchungen gilt, daß während der Isomerisierung zum Nitrat reaktive Intermediate entstehen.

In Lösung liegt das Peroxynitrit-Anion in der *cis*-Form vor<sup>90)</sup>. Aus sterischen Gründen ist es nach *Tsai et. al.*<sup>54)</sup> und *Bartberger*<sup>91)</sup> jedoch nicht möglich, daß der terminale Peroxidsauerstoff der *cis*-Konformation den Stickstoff direkt angreifen kann, um zum Nitrat zu isomerisieren. Im Gegensatz dazu kann der terminale Peroxidsauerstoff des *trans*-Isomers den Stickstoff direkt angreifen und Nitrat bilden. Aus diesen Gründen kann die *cis*-Form nicht die reaktive Form sein, obwohl sie in Lösung die stabilere ist (ca. 13 kJ/mol).

Die Energiebarriere für die *cis/trans* Isomerisierung liegt bei 100 kJ/mol und ist damit viel zu hoch, als daß sie in signifikanter Geschwindigkeit unter physiologischen Bedingungen ablaufen könnte. Diese Energiebarriere sinkt jedoch auf Werte um 42 kJ/mol für die Peroxysalpetrige Säure, so daß eine Isomerisierung unter diesen Bedingungen möglich ist<sup>92)</sup>.

Wie können dann aber Hydroxylierungsreaktionen, Nitrierungen oder Oxidationen von Substraten ablaufen? *Koppenol*<sup>93)</sup> vermutet, da alle Hydroxylierungs-, Nitrierungs oder Oxidationsreaktionen von Substraten<sup>2</sup> mit gleicher Geschwindigkeitskonstante wie die Isomerisierung zu Nitrat ablaufen, daß die reaktive Spezies eine gekrümmte Form der *trans*-Peroxysalpetrigen-Säure ist. Hiermit kann jedoch nicht erklärt werden, warum bei hohen Substratkonzentrationen noch immer deutliche Mengen Peroxynitrit zu Nitrat isomerisieren. Von *Goldstein et. al.*<sup>94)</sup> wird vermutet, daß es einen anderen Reaktionsweg zum Nitrat gibt, welcher aber über das gleiche Intermediat verläuft. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Struktur des/der Intermediates/e und der Übergangszustand für den direkten

---

<sup>1</sup> Die Ausbeuten an Reaktionsprodukten im Verhältnis zu abreagiertem Peroxynitrit waren zu gering.

<sup>2</sup> 0. Ordnung bezüglich der Substratkonzentration.

Reaktionsweg unbekannt sind.

Ob allerdings die reaktiven Spezies nun über eine homolytische Spaltung der Peroxosalpetrigen-Säure oder über ein *trans*-Intermediat gebildet werden, ist für die Biologie von Peroxynitrit irrelevant. Hierbei ist letztlich nur die Bildung entscheidend.

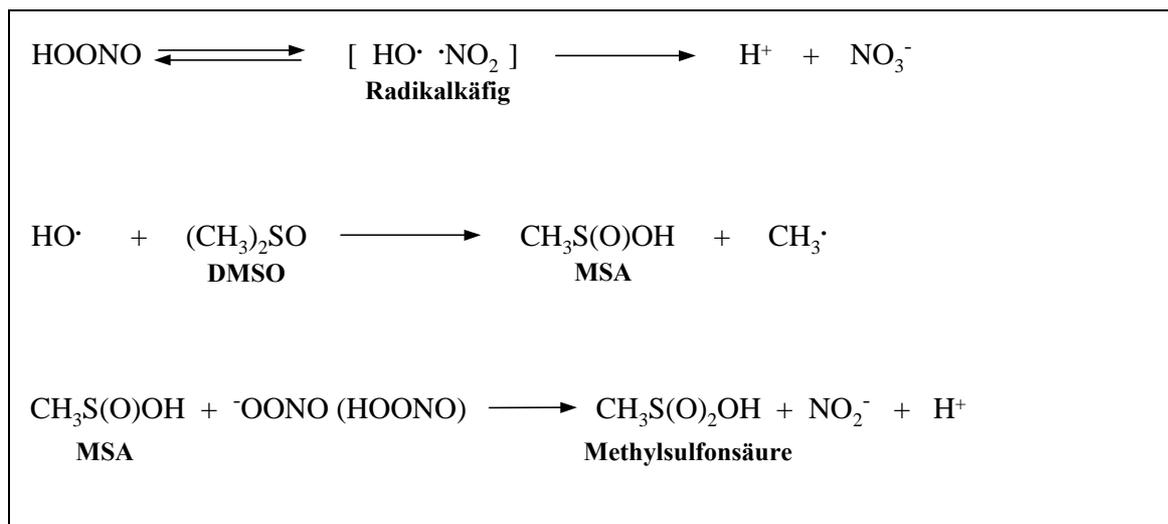
Für die Umsetzungen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Peroxynitrit war die Halbwertszeit und die Wahl des Lösungsmittels, weniger der Reaktionsmechanismus des Zerfalls, von großer Bedeutung.

Je länger die Halbwertszeit, desto langlebiger sind die reaktiven Intermediate beim Zerfall von Peroxynitrit. Mögliche Substrate haben so längere Zeit die Möglichkeit zu reagieren.

Bei 37°C und einem pH von 7,4 beträgt die Halbwertszeit<sup>1</sup> für Peroxynitrit ungefähr 1 s<sup>87)</sup>. Bei 0°C und einem pH von 7,4 ist liegt sie schon bei 7 s<sup>52)</sup>, also sieben mal so lang! Aus diesem Grund wurden alle Umsetzungen mit Peroxynitrit im Eisbad<sup>2</sup> zwischen 2 und 4°C durchgeführt. Auch mögliche Kreuzreaktionen mit dem Lösungsmittel sollten vermieden werden. So reagiert Peroxynitrit mit DMSO<sup>89)</sup> zu Methylradikalen und Methansulfinsäure (MSA), welche dann weiter zur entsprechenden Sulfonsäure oxidiert werden kann<sup>95)</sup> (siehe Abbildung 2.10).

### Abbildung 2.10

#### Reaktionen von DMSO mit Peroxynitrit



<sup>1</sup> Siehe auch 2.1.3: Methode 3: Reaktion von Wasserstoffperoxid mit salpetriger Säure.

<sup>2</sup> Im Gegensatz zu den Reaktionen mit NO<sub>2</sub> und NO, die bei 37°C durchgeführt wurden.

Aus diesem Grund konnte DMSO nicht wie bei den Umsetzungen mit NO und NO<sub>2</sub> als Lösungsmittel eingesetzt werden, sondern es wurde 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet.

Auf Grund der ungeklärten Reaktionskinetik für die durchgeführten Reaktionen war es interessant zu erfahren, ob beispielsweise ein x-facher molarer Überschuß an Peroxynitrit mit einem Mal hinzugegeben das gleiche Ergebnis liefert wie x mal eine äquimolare Zugabe.

Deshalb wurden alle Umsetzungen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Peroxynitrit mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt (siehe Seite 121 und 122.).

Die grundlegenden Unterschiede der beiden Methoden ergaben sich aus den bereits auf den vorigen Seiten beschriebenen chemischen Eigenschaften des Peroxynitrits.

So wurde bei Methode 1 die gesamte Peroxynitritmenge mit einem Mal hinzugegeben. Des weiteren war bereits eine bestimmte Menge Säure<sup>1</sup> der Reaktionslösung (siehe Seite 121) hinzugefügt worden, um die KOH oder NaOH in der Peroxynitrit-Lösung zu neutralisieren.

In Methode 2 wurde langsam 25%ige HCl dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Bei nahezu neutralem pH (7,5) wurde etwa eine halbe Minute gewartet, bis letztlich auf pH 6 gesenkt wurde. So konnten in der späteren HPLC Analytik die Ausbeuten der jeweiligen Reaktionsprodukte miteinander verglichen werden.

Ein weiterer Grund für die Anwendung zweier Methoden bestand darin, daß nach den bisherigen Erkenntnissen nicht sicher ist, ob Peroxynitrit bei sofortiger pH-Senkung (Methode 1) den gleichen Zerfallsweg beschreitet, als wenn der pH-Wert langsam und kontinuierlich gesenkt wurde (Methode 2).

Dies wurde mit der sich an die Umsetzungen anschließende Analytik geklärt.

---

<sup>1</sup> Als 25%ige HCl.

## 2.5 Das analytische Konzept

Zur Planung des analytischen Weges müssen mehrere Kriterien beachtet und entsprechend gewertet werden.

- Welche analytischen Verfahren stehen zur Verfügung?
- Wird das Ziel, die Strukturaufklärung, damit erreicht?
- Sind die anfallenden Produkte mit den verfügbaren Methoden detektierbar?
- Müssen bestimmte Vorarbeiten für spezielle Meßverfahren gemacht werden?
- Welche Mengen an Reaktionsprodukt sind zur Identifizierung erforderlich?

Hieraus leitete sich das folgende Analysenkonzept ab.

Da alle entstandenen Reaktionsprodukte nach erfolgter Umsetzung in Lösung vorlagen (Lösungsmittel entweder DMSO oder Phosphatpuffer), sowie noch mit Resten der Edukte verunreinigt waren, stellte die Isolierung der Verbindungen das erste Problem dar. Eine konventionelle Aufarbeitung schied aufgrund der geringen eingesetzten Mengen und wegen der großen chemischen Ähnlichkeit von Edukten und Produkten aus. Als Methode der Wahl für die Isolierung der Produkte bot sich eine chromatographische Trennung mittels semipräparativer HPLC an. Ziel war es, die Reaktionsprodukte als analysenreine Feststoffe zu erhalten. Diese wurden dann anschließend der strukturaufklärenden Analytik zugeführt.

Die HPLC ist eines der gebräuchlichsten Trennverfahren in der heutigen Analytik.

Die meisten HPLC-Anlagen detektieren die getrennten Stoffe mittels UV-Detektor bei einer ausgewählten Wellenlänge. Der Nachteil dieser Methode ist, daß Verbindungen, die bei dieser Wellenlänge nicht oder nur schwach absorbieren, nicht erfaßt werden. Außerdem ist eine Überlagerung zweier Substanzen meist schwer erkennbar.

Eine bessere Möglichkeit bietet daher ein Dioden Array Detektor (DAD). Hier kann über den gesamten Zeitraum der Chromatographie ein komplettes UV-Spektrum aufgezeichnet werden (je nach Gerät zwischen 200 nm bis

maximal 800 nm). Zusätzlich kann das komplette UV-Spektrum eines Peaks schon Hinweise auf die Identität der Verbindung geben.

Da UV-Spektren nicht sehr spezifisch sind, und chemisch ähnliche Substanzen oft auch ein ähnliches Absorptionsspektrum besitzen, sind die so gewonnenen Aussagen jedoch nicht sehr bedeutungsvoll. Die Information über die Peakreinheit ist jedoch von hohem Wert, da Überlagerungen klar erkannt werden können. Dank der Fa. Merck, die unserem Arbeitskreis für einige Zeit einen DAD leihweise überließ, konnte ein großer Teil der Proben damit vermessen werden.

Vor der Separierung muß jedoch erst eine HPLC-Methode entwickelt werden. Diese Methode sollte die bestmögliche Trennung der Produkte bei möglichst kurzen Analysenzeiten gewährleisten<sup>1</sup>

Im Hinblick auf die große Anzahl der notwendigen HPLC-Läufe<sup>2</sup> war es unerlässlich, eine zuverlässige Methode zur Separierung des gewünschten Peaks zu entwickeln. Auch hierbei war der DAD von großem Nutzen. Deshalb soll kurz die Funktionsweise eines Fraktionssammlers erläutert werden.

Dieser kann über den Detektor oder über die Software gesteuert werden.

Wird die Fraktionierung über den Detektor geregelt, erhält der Fraktionssammler den Impuls zum Sammeln nach der Überschreitung eines vorher definierten Schwellenwertes. Dieser Schwellenwert ist ein bestimmter Prozentsatz der Basisextinktion  $E_0$ , die wiederum maßgeblich von der verwendeten Wellenlänge abhängt. Sind also die gesamten UV/VIS Daten des Chromatogramms bekannt, kann die optimale Wellenlänge zur Fraktionierung bestimmt werden. So können Verunreinigungen bei geschickter Wahl der Wellenlänge dem Detektor „verborgen“ bleiben und nur die zu sammelnde Substanz ist im Chromatogramm sichtbar. Damit erreicht man eine hohe Sicherheit in der Fraktionierung<sup>3</sup> (siehe Abbildung 2.11)<sup>4</sup>, da nur der gewünschte Peak erfaßt wird und der Fraktionensammler startet.

---

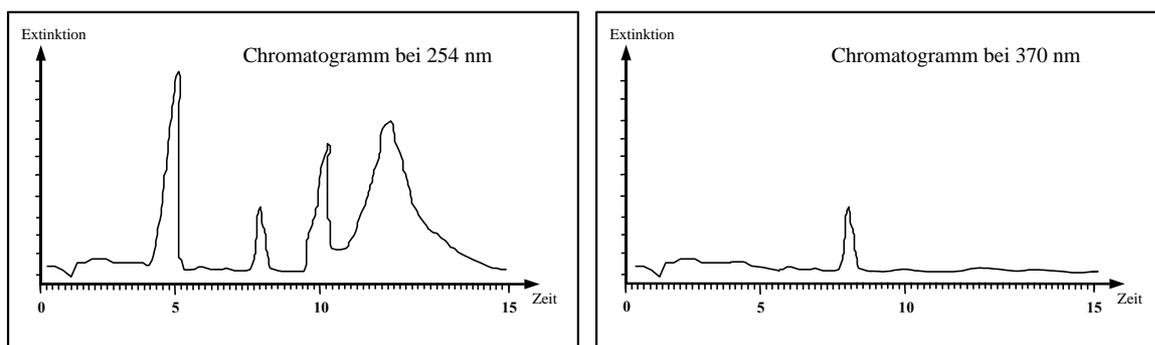
<sup>1</sup> Dies ist im Hinblick auf die Vielzahl der HPLC-Läufe für die Fraktionierung bedeutsam.

<sup>2</sup> 100 ml Reaktionslösung mit 25 mMol; maximal 300 µl pro Lauf.

<sup>3</sup> Es wird nur die gewünschte Substanz aus dem chromatographischen Lauf abgetrennt.

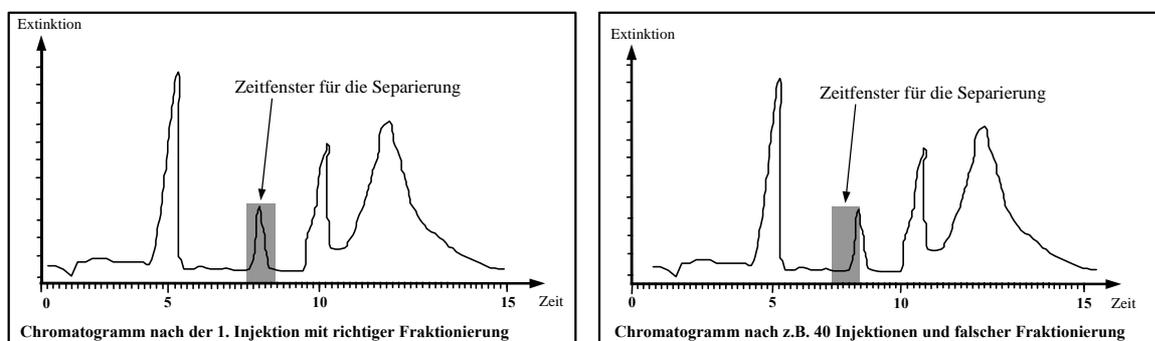
<sup>4</sup> Die Chromatogramme in Abbildung 2.11 und Abbildung 2.12 sind nur zur Veranschaulichung erstellt und sind so nicht bei meinen Untersuchungen aufgetreten.

**Abbildung 2.11**



Wird andererseits über die Software lediglich ein Zeitfenster zur Fraktionierung definiert (z.B. Fraktionierung zwischen 10,5 und 10,9 min), können Verschiebungen der Retentionszeit der Substanz, wie sie bei häufiger Injektionsfolge auftreten, zu Fehlern führen. Die Substanz wird unter Umständen nur noch teilweise vom Rest des HPLC-Laufs abgetrennt. Dieses Problem verstärkt sich, je kürzer der Zeitraum ist bei der die Substanz von der Säule eluiert wird (siehe Abbildung 2.12). Im Extremfall wird die Verbindung gar nicht mehr erfaßt.

**Abbildung 2.12**



Weiter muß die Tatsache beachtet werden, daß bei der Verwendung hauptsächlich wäßriger Eluenten in der HPLC (wie sie zur Lösung der Problemstellung erforderlich sind) das sogenannte Kollabieren der RP-18 Phase ein ernst zu nehmendes Risiko darstellt. Die C-18 Ketten des Säulenmaterials zeigen dieses Verhalten, um den hydrophilen Wechselwirkungen auszuweichen. Dies kann zu einer Verkürzung der Retention bis zum Verlust der gesamten Trennleistung führen.

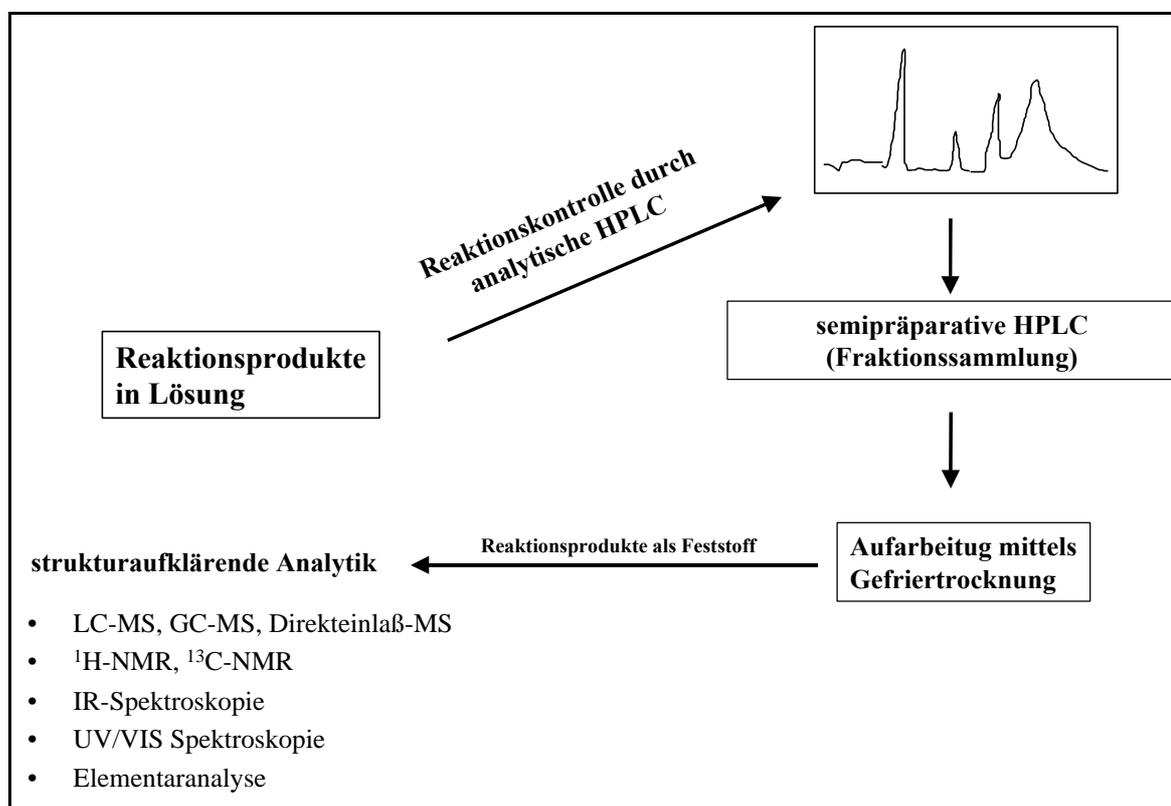
Da die Separierung der Peaks eine oft tage- bis wochenlange Injektionsfolge erforderlich machte, war eine reproduzierbare Trennleistung unbedingt

erforderlich und es mußten Spülprogramme zur Regeneration der Säule mit bedacht werden und eingebaut werden. Die oben veranschaulichten Probleme besaßen für die Problemstellung besondere Bedeutung.

Auf Grund dieser Erkenntnisse erfolgte die Steuerung des Fraktions-sammlers über den UV-Detektor nach Wahl einer passenden Wellenlänge.

Nach der Abtrennung der Produkte von dem ursprünglichen Reaktionsmedium lagen diese gelöst in einer großen Menge Eluat (bis zu 2 L) vor. Da es sich hierbei um wässrige Pufferlösungen<sup>1</sup> handelte, stellte die Gefriertrocknung die beste Möglichkeit zur Entfernung des Lösungsmittels dar. Nun mußte noch die im Verhältnis zur Substanz große Menge Puffersalz entfernt werden.

**Abbildung 2.13**



Ein einfaches Lösen des Rückstandes in destilliertem Wasser war nicht zu empfehlen, da die Kernbasen erstens in wässrigen Puffersystemen lediglich löslich sind und zweitens unbekannt war, ob sich bestimmte Reaktionsprodukte in Wasser lösen und somit verloren gehen würden. Dies

<sup>1</sup> Aus Vorversuchen war bekannt, daß ein gutes Laufverhalten der Purin- bzw. Pyrimidinbasen auf RP 18 Phasen (**R**eversed **P**hase **C18** als unpolare Phase) nur mit Puffersystemen als Eluent erreichbar ist.

macht eine weitere HPLC Trennung notwendig. Als Eluent wurde jetzt vollkommen auf Puffersysteme verzichtet und lediglich Methanol/Wasser Gemische verwendet. Anschließend wurde wiederum eine Gefriertrocknung durchgeführt.

Wenn auf diesem Wege genügend Substanz erhalten werden konnte, wurden die weiteren in Abbildung 2.13 aufgeführten strukturklärenden Analysen durchgeführt.

Eine wichtige Analysenmethode in der organischen Chemie ist die Massenspektrometrie (MS). Mit kleinen Substanzmengen können die relative Molekülmasse und darüber hinaus durch den Zerfall des Untersuchungsmaterials wichtige Aussagen über die chemische Struktur getroffen werden. Hierfür sind jedoch möglichst reine Substanzen nötig. Da nach einem HPLC-Lauf die Substanzen schon getrennt, also in reiner Form vorliegen, kann ein modernes analytisches Verfahren verwendet werden - die HPLC-MS Kopplung. Bei der direkten Kopplung bestehen jedoch besondere Schwierigkeiten, da die Geräte unter völlig anderen Bedingungen arbeiten. Die Trennung durch die HPLC erfolgt unter hohem Druck in einer flüssigen Phase und hauptsächlich bei Raumtemperatur. Das MS dagegen funktioniert nur im Hochvakuum und bei höheren Temperaturen. Für eine massenspektrometrische Analyse in Kopplung an eine HPLC sind daher die Lösungsmittelmoleküle selektiv abzutrennen, denn nur die im Vergleich zum Lösungsmittel geringe Substanzmenge ist von Interesse. Die Trennung erfolgt über die Verdampfung des Eluenten. Die hierbei auftretenden großen Verdampfungsvolumina stellten lange Zeit ein unlösbares Problem dar. So konnten mit den Geräten der ersten Generation nur Elutionsströme von wenigen  $\mu\text{L}$  verarbeitet werden<sup>1</sup>. Um hierbei brauchbare Trennungen in akzeptablen Zeiten zu erhalten, müssen Mikrosäulen mit einem Durchmesser von max. 1 mm eingesetzt werden. Dabei ergibt sich weiteres Problem. Oft müssen andere Puffersysteme für die HPLC-Trennung verwendet werden und eine neue Methodenentwicklung ist erforderlich. Es dürfen z.B. keine Phosphatpuffer verwendet werden, da diese nicht verdampfbar sind und an der Schnittstelle zwischen HPLC und MS auskristallisieren würden<sup>96, 97</sup>. Um die Substanzen zu ionisieren, müssen die verwendeten Puffer aber in der Lage sein, Ladungen auf diese abzugeben.

---

<sup>1</sup> max. 30  $\mu\text{L}/\text{min}$

Hierin sind die Gründe zu finden, weshalb diese Methode noch bis vor wenigen Jahren keine Verbreitung fand. Erst mit Geräten der letzten Generation ist es gelungen, diese Probleme zu bewältigen<sup>1</sup>.

Da mir für die meisten Untersuchungen ein Gerät älterer Bauart zur Verfügung stand, waren all diese Überlegungen im Vorfeld wichtig und ohne diese wäre eine Bewältigung der Probleme nicht möglich gewesen.

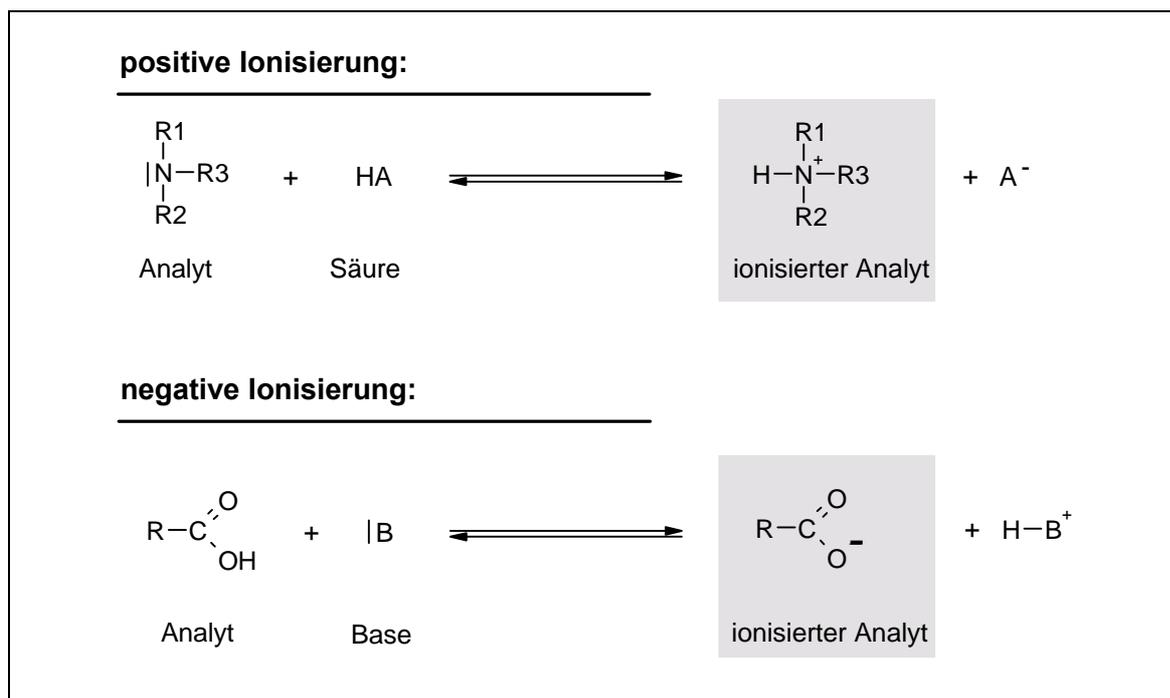
Erst im letzten halben Jahr ist es dank einer Kooperation mit dem AK von Prof. Dr. Steinhardt möglich geworden, auf einem Gerät der letzten Generation Messungen durchzuführen. Hier konnten direkt analytische HPLC-Methoden, welche im Vorfeld entwickelt wurden, eingesetzt und verwendet werden. Die quantitative Erfassung der Substanzen war für die hier beschriebene Problemstellung jedoch nebensächlich.

Die beiden Geräte (siehe experimenteller Teil) unterscheiden sich hauptsächlich darin, daß bei dem Gerät der Firma Hewlett-Packard neben der Elektrospray Ionisation (API-ES) auch eine chemische Ionisation (API-CI) möglich ist. API steht für **A**tmospheric-**P**ressure-**I**onisation. Das heißt, die Ionisation findet unter Atmosphärendruck statt, und es können sowohl positive wie negative Ionen erzeugt werden. Dies wird durch den verwendeten Puffer bestimmt. Wenn negativ ionisiert werden soll, muß der Puffer demzufolge alkalisch sein und umgekehrt. Die prinzipiellen Unterschiede der beiden Ionisierungsmethoden soll in den beiden folgenden Abbildungen verdeutlicht werden.

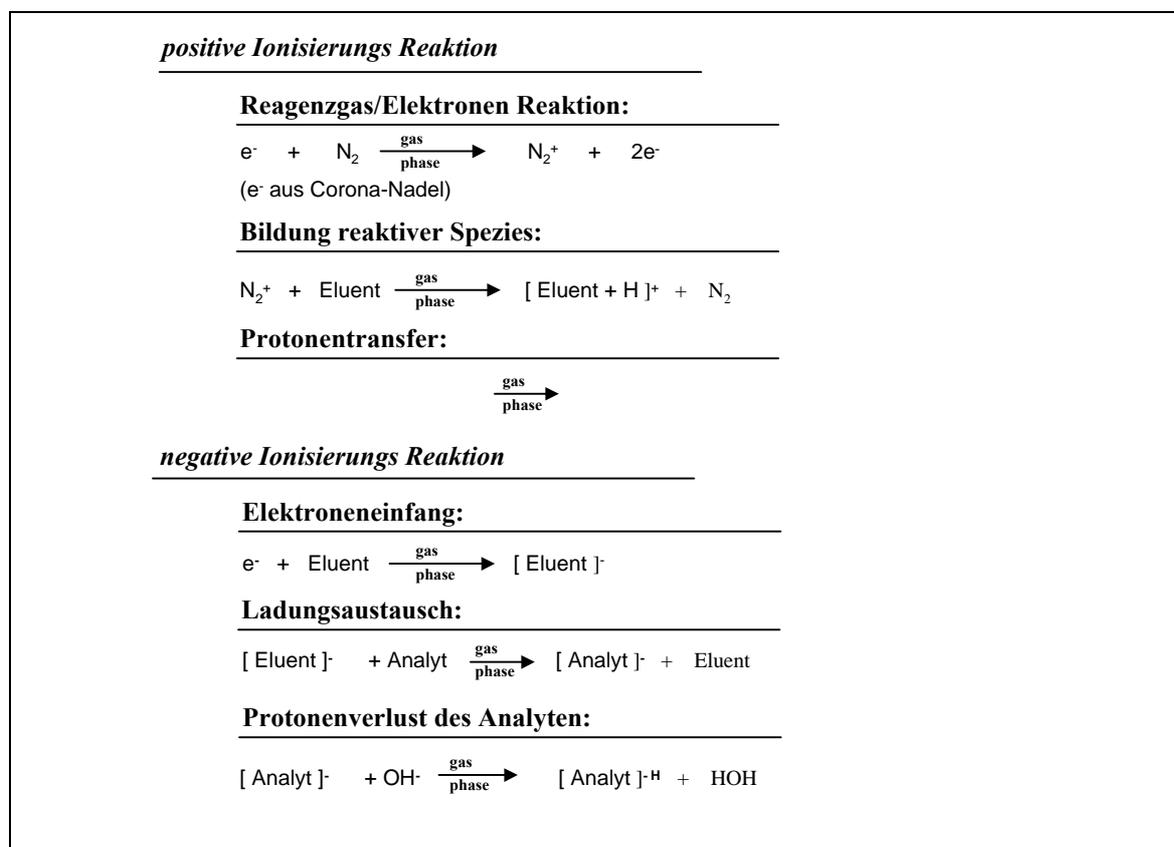
---

<sup>1</sup> Es sind jetzt sind Elutionsvolumen von 1 mL/min realisierbar.

**Abbildung 2.14 ES-Ionisierung**



**Abbildung 2.15 Chemische-Ionisierung (CI)**

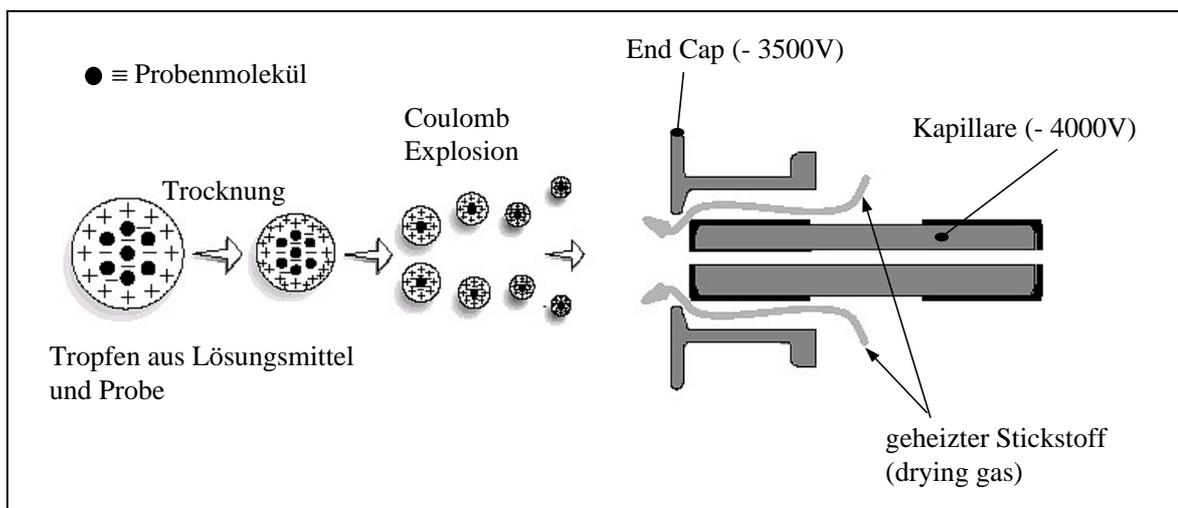


Vorhersagen, welches die bessere Ionisierungsmethode bezüglich eines unbekanntes Moleküls ist (API-ES oder API-CI), sind nicht möglich. Diese Information kann nur auf empirischem Wege gewonnen werden.

Je nach Ionisierungsart werden somit die entsprechenden  $M^{+1}$  (Protonenaddukt) oder die  $M^{-1}$  (Protonentfernung) Massen gefunden (bzw. Addukte aus dem Puffer z.B. Ammonium). Auch sind die  $2M^{+1/-1}$  Massen (Clusterbildung) für ein LC-MS Chromatogramm mit ES-Ionisierung nicht ungewöhnlich ( $M$  ist die Molmasse des Analyten).

Die Ionenquelle einer LC-MS Kopplung hat zwei wichtige Aufgaben zu erfüllen. Zum einen muß die Substanz von der flüssigen in die gasförmige Phase überführt und ionisiert werden. Zum anderen müssen die Lösungsmittel der mobilen Phase von der Probe entfernt werden. In den folgenden beiden Abbildungen ist der prinzipielle Aufbau der beiden Ionenquellen schematisch dargestellt.

**Abbildung 2.16**      **Elektrospray Ionisation ( $ES^{+}$ )**



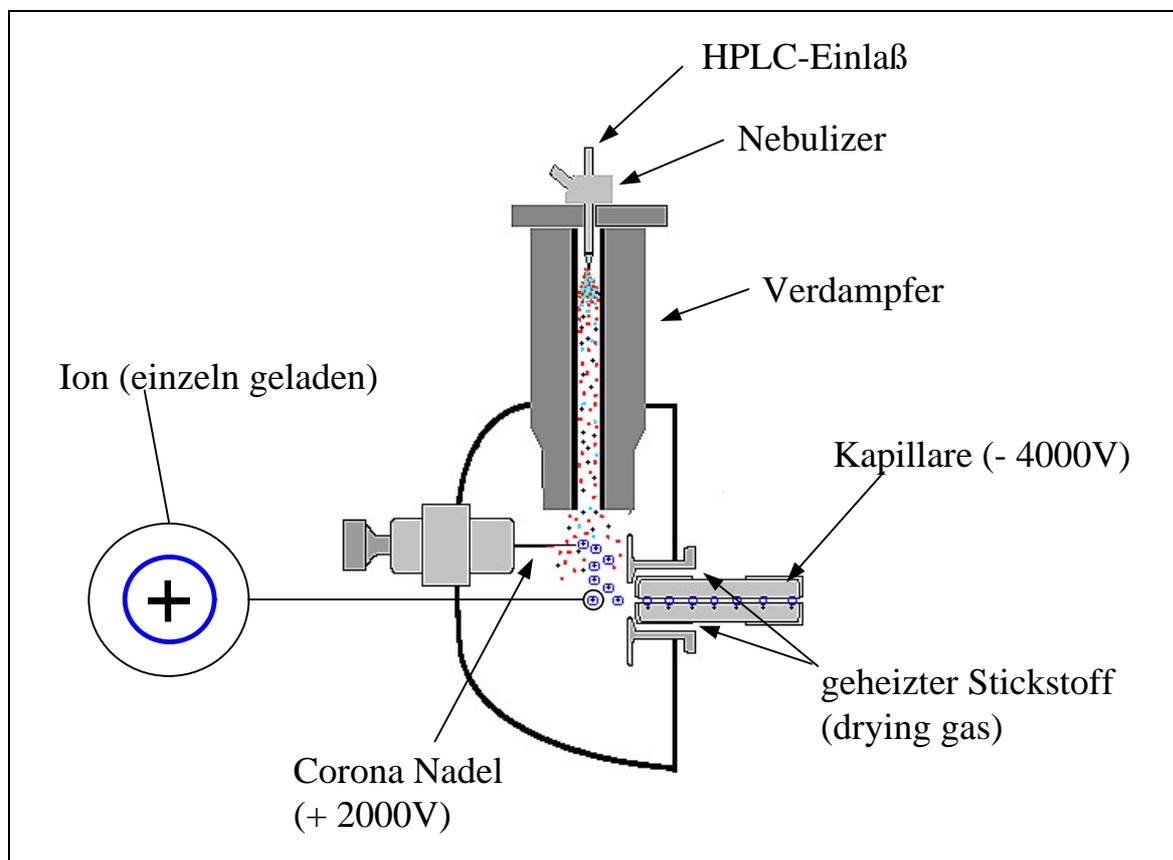
Hierbei durchlaufen die feinen Tropfen aus dem Einlaßsystem einen geheizten Stickstoffstrom (bis 13 L/min und 350°C) innerhalb eines elektrischen Feldes. Durch die fortwährende Verdampfung des Lösungsmittels (häufig Wasser, Alkohole) steigt die Ladungsdichte immer weiter an. Zu einem bestimmten Zeitpunkt, wenn nämlich die Ladungsdichte der Oberfläche größer als die Oberflächenspannung ist, zerplatzen die Tropfen in viele weitere Tropfen. Dieser Vorgang, der auch als Coulomb

Explosion bezeichnet wird, wiederholt sich so lange bis nur noch einzelne Moleküle vorhanden sind.

Durch die Potentialdifferenz von Probenmolekülen und Kapillare werden die Moleküle in diese jetzt regelrecht eingesaugt und treffen am Ende auf den massenselektiven Detektor. Wenn die Probenmoleküle sich mit der ES-Technik nicht ionisieren lassen (weder positiv noch negativ), dann besteht noch die Möglichkeit der chemischen Ionisation. Mit dieser Ionisierungstechnik kann dann oft eine Ionisierung erzwungen werden.

Dieses Ionisierungstechnik wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

**Abbildung 2.17 Chemische Ionisation ( $CI^+$ )**



Bei der AP-CI wird der Eluent bei einer Temperatur von ca. 400-500°C verdampft. In dem erzeugten Dampf wird zwischen der Corona Nadel und einer Gegenelektrode ein Plasma erzeugt, wodurch die Eluentmoleküle ionisiert werden. Dann wird in einer Gasphasenreaktion der Analyt ionisiert<sup>98)</sup>. Die AP-CI verkraftet Flußraten bis 1,5 mL/min.

Bei beiden Ionisierungstechniken müssen jedoch geladene Teilchen erzeugt werden, da nur geladene Teilchen vom massenselektiven Detektor erfasst werden können.

Die LC-MS stellt eine schonende Möglichkeit zur Erzeugung von Quasi-Molekülionen dar. Quasi-Molekülion bedeutet, daß hauptsächlich protonierte bzw. deprotonierte Molekülionen gefunden werden. Dies hat den Vorteil, daß sich thermolabile, polare und sogar ionische Verbindungen (beide nicht GC flüchtig!) messen lassen. Der Nachteil besteht darin, daß außer den Quasi-Molekülionen im allgemeinen wenig Zerfallsprodukte entstehen, die zur Strukturaufklärung beitragen.

Mit Hilfe der LC-MS kann es gelingen, erste wichtige Hinweise auf die Struktur der zu bestimmenden Substanz zu erhalten.

Da die Ausgangsstoffe bei den durchgeführten Reaktionen bekannt waren und auf Grund der geplanten Versuchsdurchführung auch nur diese miteinander reagieren konnten, sind wichtige Voraussetzungen zur Deutung der mit dieser Technik gewonnenen Ergebnisse gegeben.

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der einzelnen Umsetzungen beschrieben werden.

## 3 Reaktionen mit den Kernbasen

### 3.1 Reaktion der Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies

Die Pyrimidinbasen Cytosin, Uracil und Thymin wurden nach den in Abschnitt 2.4 beschriebenen Methoden mit Stickstoffmonoxid (NO), Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) und Peroxynitrit umgesetzt.

Anschließend wurden die Reaktionslösungen mittels analytischer HPLC (Parameter 1) kontrolliert und die entstandenen Produkte wie in Abschnitt 2.5 beschrieben separiert.

Alle HPLC-Parameter auf den folgenden Seiten sind unter „HPLC-Parameter 1“ auf Seite 112 detailliert aufgeführt.

#### 3.1.1 Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid

Den Chromatogrammen konnte deutlich entnommen werden, daß sowohl Uracil als auch Thymin keine Reaktion mit NO eingegangen waren. Es waren nur die Peaks der Ausgangssubstanzen bei 10,55 min für Thymin und 4,45 min für Uracil zu erkennen. Diese ersten Befunde wurden durch HPLC-MS Messungen<sup>1</sup> bestätigt. Im Vergleich mit Standardlösungen wurden die entsprechenden Molekülonen im MS (negative Elektrosprayionisation, Direkteinlaß) von  $m/z = 111,1$  (M minus 1) für Uracil und  $m/z = 125,1$  (M minus 1) für Thymin gefunden. Die weitere Analyse der separierten Peaks mittels IR und NMR bewiesen diese Befunde.

Cytosin hatte sich hingegen teilweise umgesetzt. Die Absorption bei 3,3 min für Cytosin hatte sich zu Gunsten eines neuen Peaks bei 4,45 min verringert, wobei beide Peaks etwa die gleiche Intensität hatten.

---

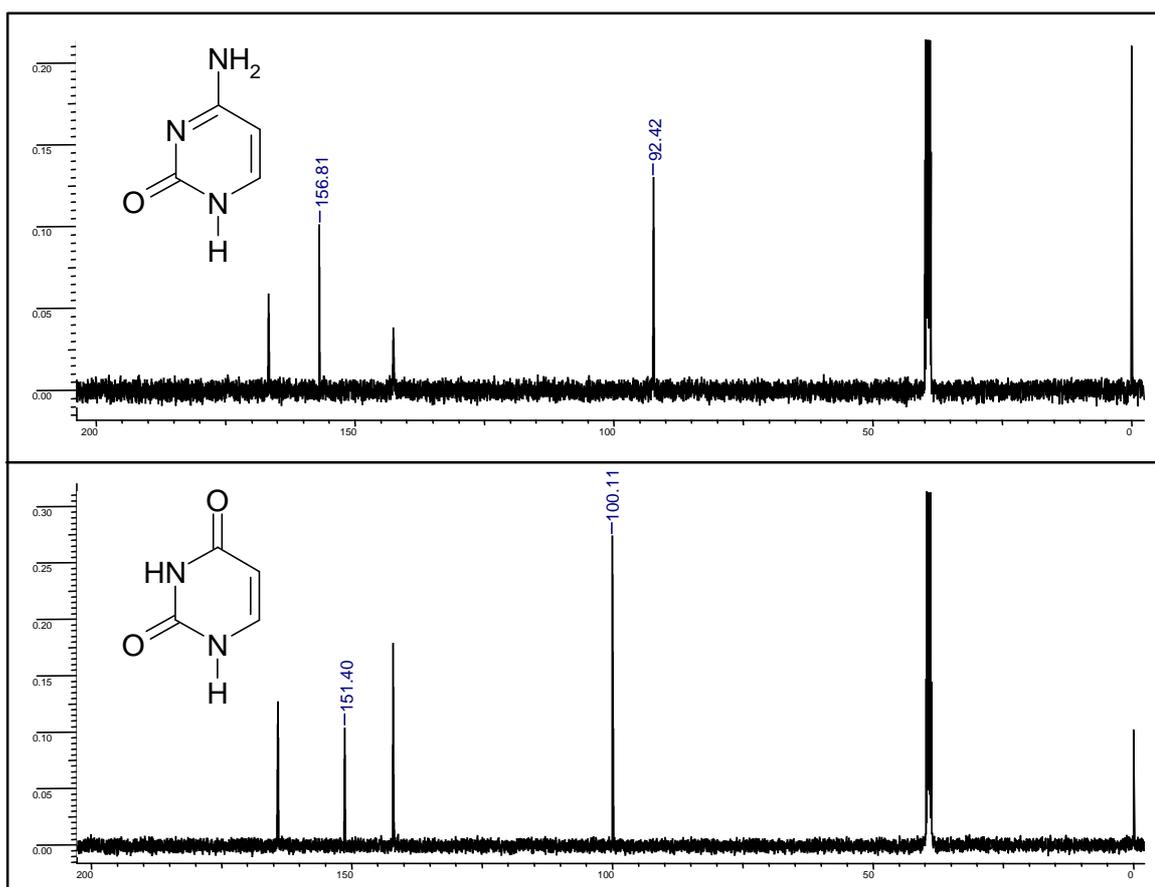
<sup>1</sup> Die Messungen wurden am LC-MS System 1 (siehe S.114) mit einer Nucleosil 250/2 100-5 RP 18 Säule, Laufmittel Wasser<sub>bidest</sub>/ Methanol: 90/10 + 1ml Ameisensäure<sub>konz.</sub> pro Liter und einem Flow von 0,02 ml/min durchgeführt.

Wegen der Übereinstimmung der Retentionszeit des Produkts mit der von Uracil wurde vermutet, daß sich Uracil gebildet hatte. Mittels semipräparativer HPLC (Parameter 2) und nachfolgender Gefriertrocknung der aufgefangenen Fraktion wurde das Reaktionsprodukt isoliert.

Das IR-Spektrum zeigte die für Uracil charakteristischen Carbonylbanden bei  $1735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1716\text{ cm}^{-1}$  und  $1644\text{ cm}^{-1}$ . Außerdem war die  $\text{NH}_2$ -Schwingung bei  $3381\text{ cm}^{-1}$  des Cytosins verschwunden.

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum des Reaktionsproduktes war der Peak des quartären Kohlenstoffs, der die Aminogruppe trägt, leicht von  $157\text{ ppm}$  zu  $151\text{ ppm}$  verschoben, während die chemische Verschiebung des benachbarten tertiären Kohlenstoffs von  $92\text{ ppm}$  zu  $100\text{ ppm}$  ins tiefere Feld gewandert war (siehe Abbildung 3.1). Das Spektrum stimmte daher ebenfalls mit dem von Uracil überein.

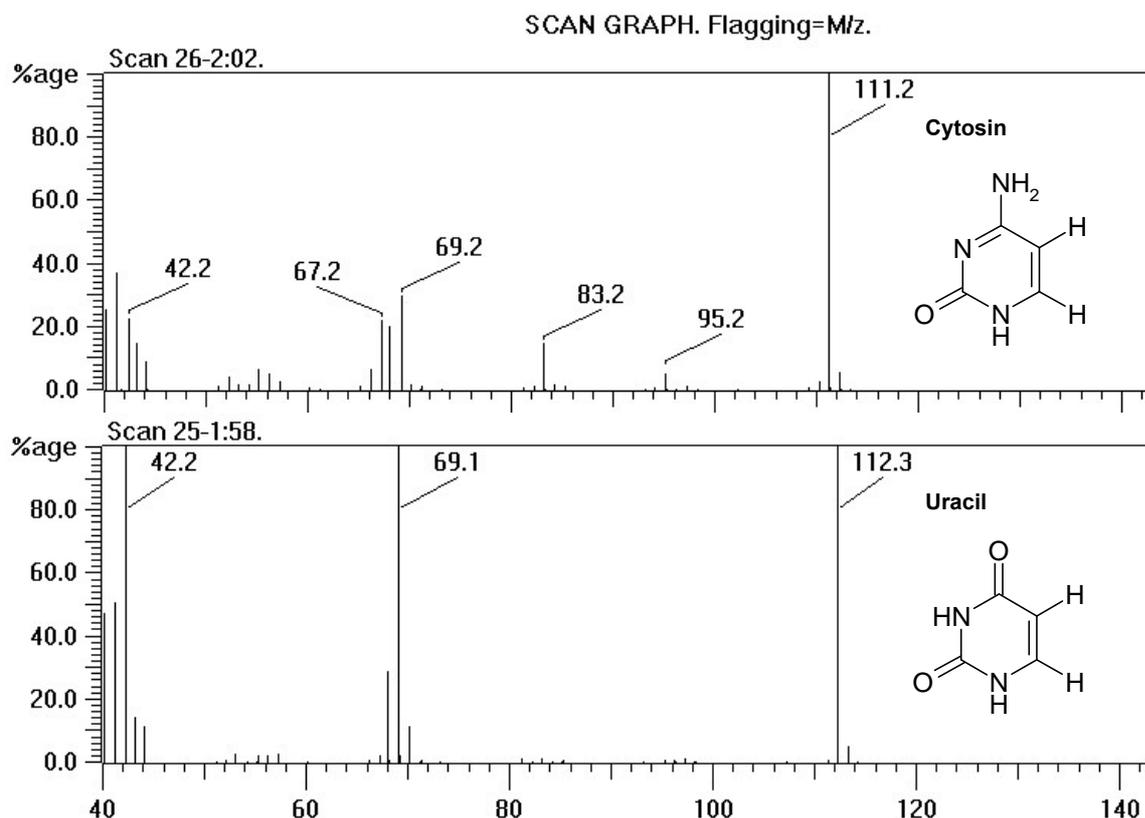
**Abbildung 3.1**  $^{13}\text{C}$  Spektren von Cytosin und Uracil



Einen weiteren Beweis für die Annahme es habe sich Uracil gebildet, stellte das Direkteinlaß-Massenspektrum (Elektronenstoßionisation) dar. Sowohl Uracil als auch das Reaktionsprodukt zeigten als Molekülpeak  $m/z = 112,3$

sowie die typischen Fragment-Ionen  $m/z = 69,1$  ( $C_3H_3NO$ ) und  $m/z = 42,2$  (CNO), während die für Cytosin typischen Massen  $m/z = 111,2$  (Molekülpeak) und die Fragment-Ionen  $m/z = 83,2$  ( $M - CNH_2$ ) und  $m/z = 95,2$  ( $M - NH_2$ ) fehlten.

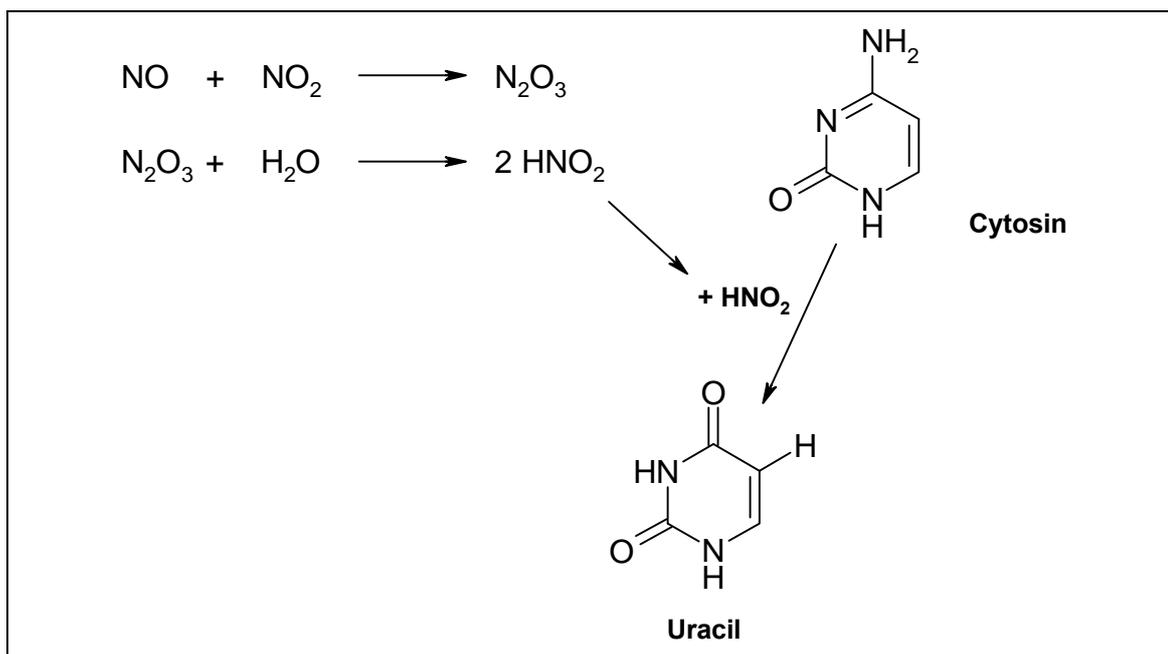
**Abbildung 3.2**



Anhand der Intensitäten der Peaks im HPLC-Chromatogramm konnte im Vergleich mit entsprechenden Standards eine Umsetzungsrate von Cytosin zu Uracil mit rund 50% bestimmt werden.

Daß sich aus Cytosin und NO Uracil gebildet hatte, war zunächst ein erstaunlicher Befund. Bedenkt man allerdings, daß NO-Gas stets Spuren von  $NO_2$  enthält, wird dieses Ergebnis verständlich. NO und  $NO_2$  können zu  $N_2O_3$  synproportionieren, dem Anhydrid der salpetrigen Säure. Das Reaktionsmedium DMSO enthält bis zu 0,2% Wasser, so daß sich aus dem Anhydrid die Säure bilden kann. Durch eine einfache Diazotierungs-Reaktion mit anschließender Hydrolyse wird nun die Aminogruppe des Cytosins in eine Carbonylfunktion überführt. Diese Reaktion ist bereits aus der Literatur bekannt<sup>99)</sup>.

### Schema 3-1



Zur Überprüfung dieser These wiederholte ich die Reaktion in DMSO SeccoSolv<sup>®</sup> (hier ist der Wassergehalt <0,05%). Wie erwartet, entstand in diesem Fall deutlich weniger Uracil ( nur etwa 10%).

Abschließend ist als Ergebnis festzuhalten, daß aus der Umsetzung von Cytosin und NO kein Uracil entsteht, sondern diese Reaktion auf die oben beschriebene Nebenreaktion zurückzuführen ist.

Hier wird deutlich, wie wichtig es für die Deutung der Reaktionen ist, daß ausschließlich eine reaktive Spezies und diese in der höchstmöglichen Reinheit mit den Kernbasen reagiert.

### 3.1.2 Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffdioxid

Nach den oben beschriebenen Befunden war es nicht verwunderlich, daß in den analytischen HPLC-Chromatogrammen (Parameter 3) der Umsetzungen von Uracil und Cytosin neben Spuren der Ausgangsverbindungen (Cytosin 4,49 min, Uracil 6,29 min) jeweils ein weiterer Peak bei 7,11 min zu sehen war.

Nach der Isolierung dieser Verbindung durch eine semipräparative HPLC (Parameter 4) und anschließende Gefriertrocknung wurde die übliche Analytik durchgeführt.

Es zeigte sich, daß alle analytischen Daten identisch waren, also tatsächlich das gleiche Produkt entstanden war.

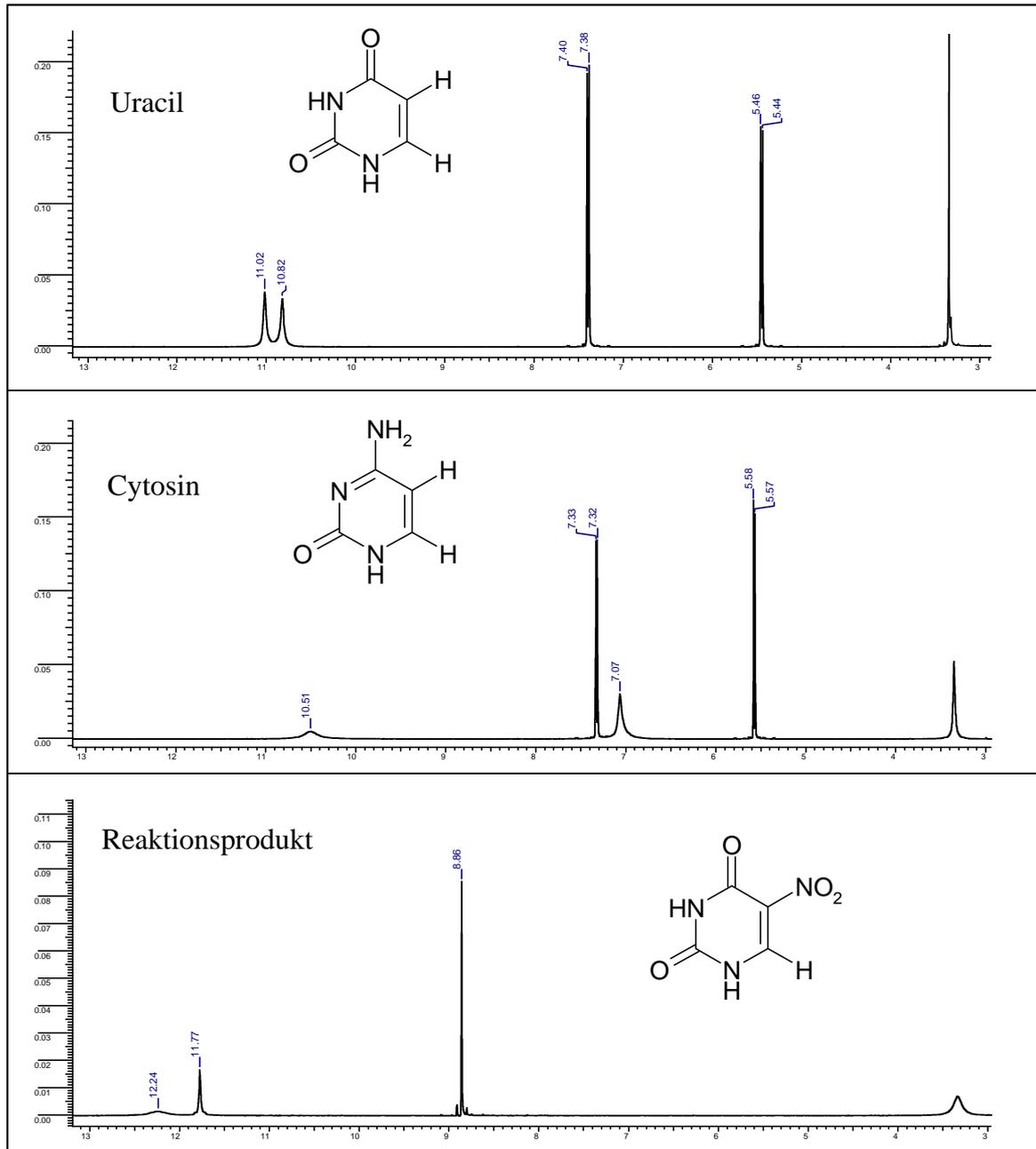
Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Uracil waren die Methin-Protonen als Dubletts bei 7,39 ppm und 5,45 ppm ( $J = 7\text{Hz}$ ) zu erkennen. Die chemische Verschiebung der vicinalen Wasserstoffe des Cytosins betragen 7,33 ppm und 5,58 ppm ( $J = 7\text{Hz}$ ). Das H in Position 5 ist in Cytosin gegenüber dem in Uracil leicht ins tiefe Feld verschoben, da die benachbarte Aminogruppe eine stärkere Entschirmung bewirkt als die Carbonylgruppe.

Die NH-Signale lagen im Spektrum von Uracil bei 11,02 ppm und 10,82 ppm, während die NH-Protonen von Cytosin zu 10,51 ppm (NH) und 7,07 ppm ( $\text{NH}_2$ ) verschoben waren.

Im Spektrum des isolierten Reaktionsproduktes waren nur noch drei Singulett mit identischen Integralen bei 12,24 ppm, 11,77 ppm und 8,86 ppm zu erkennen. Die Signale bei 12,24 ppm und 11,77 ppm konnten durch  $\text{D}_2\text{O}$ -Zugabe gelöscht werden, so daß es sich um OH- bzw. NH-Gruppen handeln mußte.

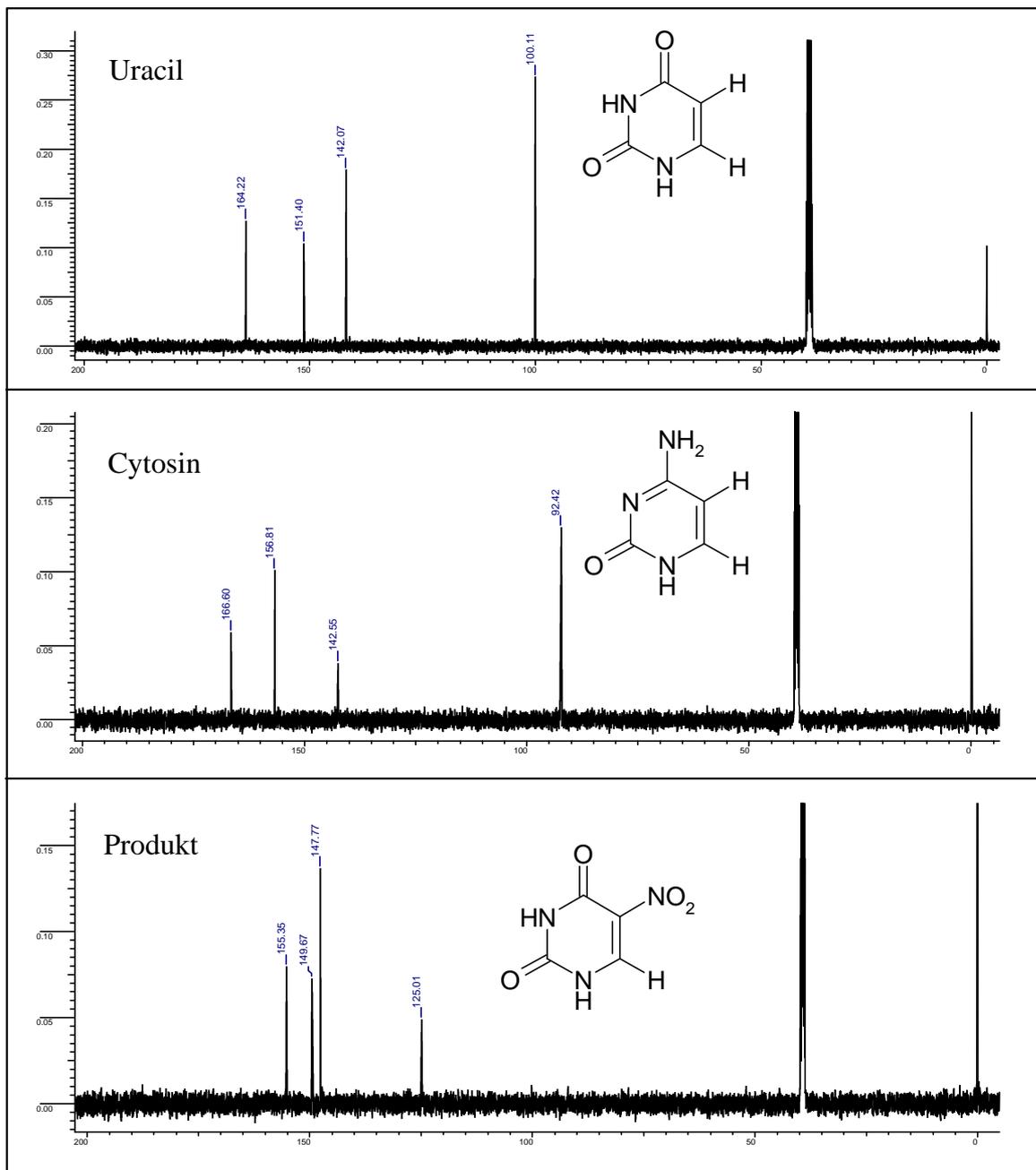
Diese Befunde deuteten auf eine Substitution am Ring hin.

Abbildung 3.3  $^1\text{H}$  Spektren von Uracil, Cytosin und des Reaktionsproduktes



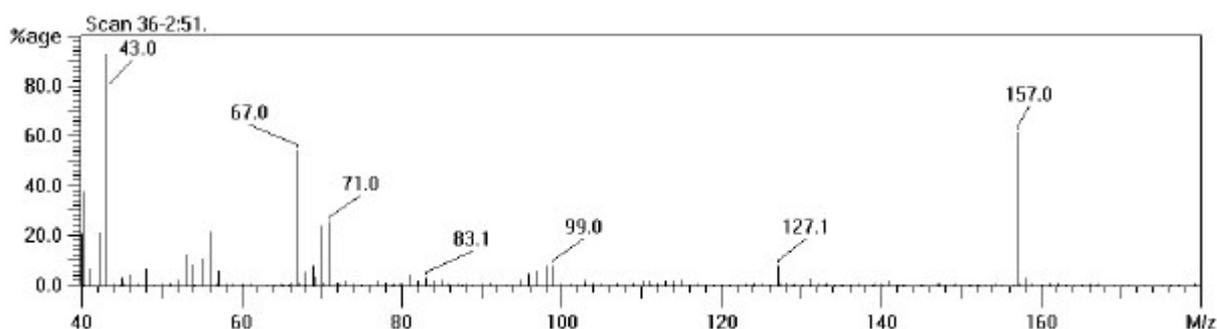
Der Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bestätigte diese Annahme. Während die Spektren von Cytosin und Uracil je zwei quartäre Kohlenstoffatome mit einer chemischen Verschiebung von etwa 167 ppm und 157 ppm bzw. 164 ppm und 151 ppm und zwei tertiäre Kohlenstoffe bei Werten um 143 ppm und 92 ppm bzw. 142 ppm und 100 ppm zeigten, waren im Spektrum des Produkts drei quartäre Kohlenstoffe bei etwa 155 ppm, 150 ppm und 125 ppm sowie ein tertiärer Kohlenstoff bei 148 ppm zu erkennen.

**Abbildung 3.4**  $^{13}\text{C}$  Spektren von Cytosin, Uracil + Reaktionsprodukt



Mit Hilfe eines MS konnte nun die Art der Substitution aufgeklärt werden. Die Molekülmasse des Produktes im MS betrug  $m/z = 157,1$ . Die beiden Hauptfragmente dieser Substanz waren  $m/z = 67$  ( $C_3HNO$  –typisches Ringfragment bei Pyrimidinbasen) und  $m/z = 43$  ( $CHNO$  –typisches Ringfragment bei Pyrimidinbasen). Hieraus wurde deutlich, daß der Pyrimidinring erhalten geblieben war. Als ein charakteristisches Fragment dieser Substanz wurde  $m/z = 127$  detektiert. Diese Masse entspricht genau der Molekülmasse minus 30 und ist typisch für Nitroverbindungen (NO als Abgangsgruppe). Dies korreliert damit, daß ein nitrosubstituiertes Uracil die Molmasse 157 g/mol besitzt. Es konnte sich also nur um ein nitrosubstituiertes Uracil handeln.

**Abbildung 3.5** MS des Produktes



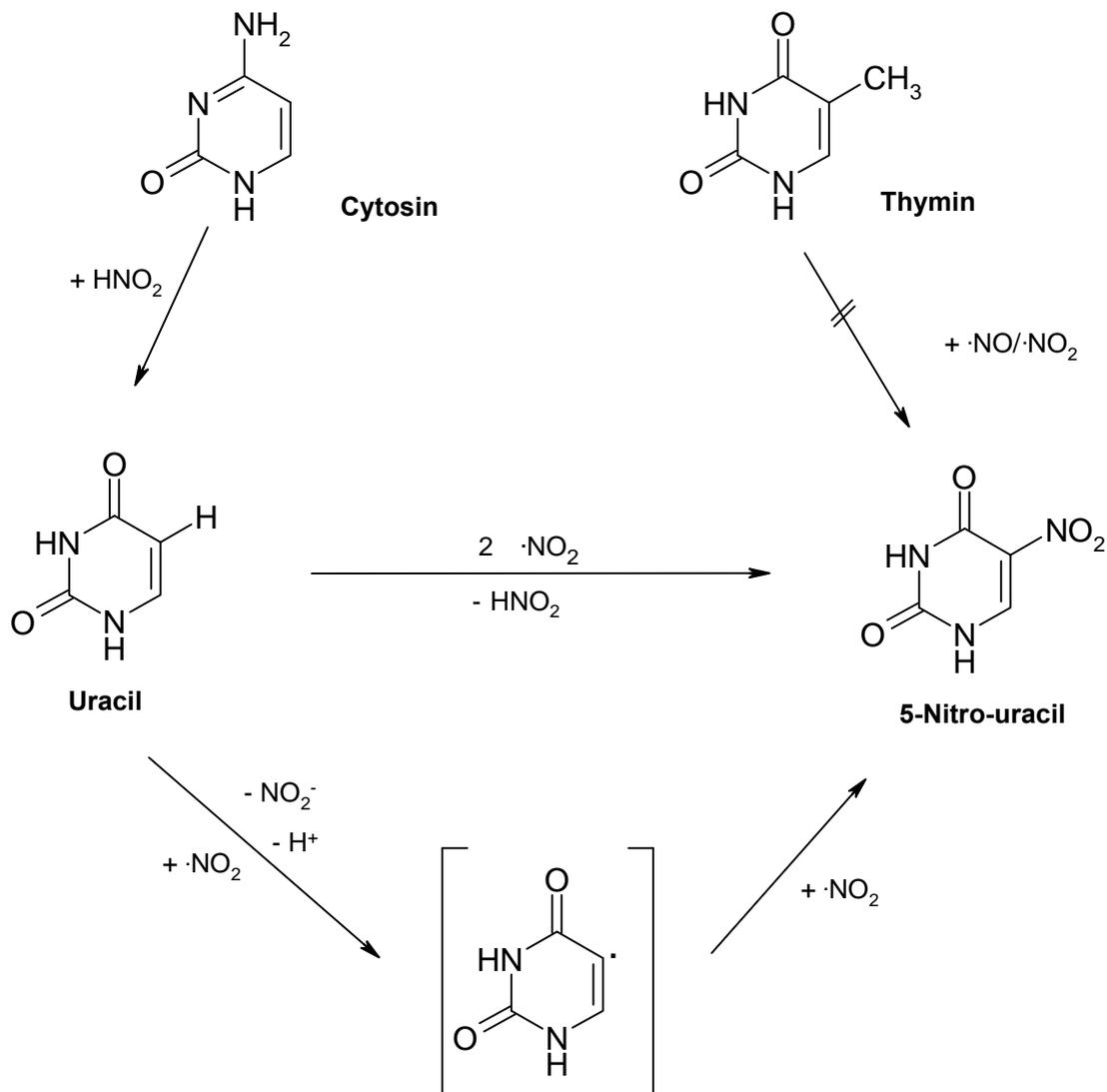
Die Position der Nitrogruppe konnte mit Hilfe der  $^1H$ -NMR aufgeklärt werden.

Der Wasserstoff in Position 6 ist wegen des geminalen Ringstickstoffs stärker entschirmt als der in Position 5. Daher ist er um ca. 2 ppm weiter ins tiefe Feld verschoben (7,3 ppm gegenüber 5,4 ppm). Eine zusätzliche Nachbarschaft zu einer Nitrogruppe verstärkt diese Entschirmung zwar, jedoch würde dies keine Verschiebung um 3,5 ppm (von ca. 5,4 ppm zu 8,86 ppm) bewirken. Daher hat die Substitution in Position 5 stattgefunden, so daß die chemische Verschiebung des Wasserstoffs in Position 6 um ca. 1,5 ppm (von ca. 7,2 ppm zu 8,86 ppm) weiter ins tiefe Feld gewandert ist.

Ein Vergleich der analytischen Daten mit denen von authentischem 5-Nitrouracil bestätigte die These, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt um 5-Nitrouracil handelt.

Im Schema 3-2 ist der Reaktionsweg, welcher zum 5-Nitrouracil führt dargestellt. Ein radikalisches Zwischenprodukt scheint plausibel zu sein. So ist auch nur folgerichtig, daß die Pyrimidinbase Thymin (5-Methyluracil) nicht mit  $\text{NO}_2$  reagiert, da deren 5 Position durch eine Methylgruppe blockiert ist.

**Schema 3-2**



### 3.1.3 Ergebnisse der Umsetzungen mit Peroxynitrit

Alle drei Pyrimidinbasen wurden mit der in Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Methode zur Reaktion gebracht.

Nach den Umsetzungen mit Peroxynitrit wurde festgestellt, daß keine der drei verwendeten Pyrimidinbasen mit Peroxynitrit reagiert hatte.

Dieses Ergebnis zeigte die anschließend durchgeführte Analytik. So hatten sich die Retentionszeiten von Ausgangsstoffen und „Reaktionsprodukten“<sup>1</sup> im HPLC-Chromatogramm (Parameter 5) nicht verändert. Auch waren keine weiteren Peaks hinzu gekommen. Da diese Untersuchungen mit einem DAD gemacht wurden, konnten zusätzlich die UV-Spektren zur Auswertung herangezogen werden. So konnte festgestellt werden, daß auch die UV-Spektren von Edukt und Produkt identisch waren.

Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurden alle Reaktionsansätze mit der LC-MS (**System 2**) vermessen. Für alle erhaltenen Peaks konnte zweifelsfrei die Molmasse der jeweils verwendeten Edukte wieder detektiert werden. Daher kann mit Sicherheit gesagt werden, daß Peroxynitrit keine Reaktionen mit den Pyrimidinbasen eingegangen ist.

Dies ist ein überraschender Befund, da Peroxynitrit bei pH-Werten unter 7,5 (wie bereits beschrieben) als äußerst reaktives Molekül gilt. Besonders überraschend war, daß die Aminogruppe vom Cystein erhalten blieb.

Alle Pyrimidinbasen wurden zusätzlich mit den möglichen Zerfallsprodukten von Peroxynitrit zur Reaktion gebracht. Weder mit entsprechenden Lösungen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Nitrit und Nitrat konnten Reaktionen beobachtet werden (pH-Werte wie in den Methoden zur Umsetzung mit Peroxynitrit beschrieben).

---

<sup>1</sup> Cytosin 3,96 min  
Uracil 4,72 min  
Thymin 9,32 min

## 3.2 Reaktionen der Purinbasen mit den reaktiven Spezies

Die Purinbasen Guanin und Adenin wurden gemäß den in Abschnitt 2.4. beschriebenen Verfahren mit NO, NO<sub>2</sub> und Peroxynitrit umgesetzt.

Die Aufarbeitung und Identifizierung der Produkte bereitete erheblich größere Schwierigkeiten als bei den Pyrimidinbasen. Dies lag zum einen an den geringen Umsetzungsraten, zum anderen daran, daß sich teilweise eine Vielzahl von Produkten gebildet hatte.

Aus diesen Gründen standen nach der Aufarbeitung mittels semipräparativer HPLC oft nur sehr geringe Substanzmengen zur Strukturaufklärung zur Verfügung.

### 3.2.1 Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid

Guanin ist äußerst schwer löslich in allen organischen Lösungsmitteln und in Wasser. Daher mußte in diesem Fall die Suspension in DMSO zur Reaktion gebracht werden. Während der NO-Einleitung war optisch keine Veränderung des Reaktionsansatzes zu erkennen. Nach der Beendigung des Versuchs wurde der Rückstand abgetrennt und untersucht. Anhand des IR- und des Massenspektrums konnte dieser zweifelsfrei als nicht umgesetztes Guanin identifiziert werden.

Der verbliebene Überstand wurde mittels analytischer HPLC (Parameter 6) untersucht. Zur Bestimmung wurde ein DAD eingesetzt. Im entstandenen Chromatogramm war lediglich ein Peak bei 5,03 min und das UV Spektrum von Guanin zu sehen ( $\epsilon_1 = 245 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_2 = 273 \text{ nm}$ ) so daß keine Reaktion stattgefunden haben konnte.

Beim Adenin war dies anders, da Adenin vollkommen in DMSO löslich war und dadurch nicht als Suspension eingesetzt zu werden brauchte. Die chromatographische Untersuchung der Reaktionslösung von Adenin mit NO (Parameter 7) ergab, daß sich Adenin zu einem geringen Teil umgesetzt hatte. Neben dem Adeninpeak bei 10,7 min war ein weiterer kleiner Peak bei 9,35 min zu erkennen. Da aus der Umsetzung von Cytosin mit NO bekannt war, daß die Möglichkeit der Substitution der Aminogruppe durch eine Carbonylfunktion besteht (siehe Schema 3-1), war eine Reaktion zu

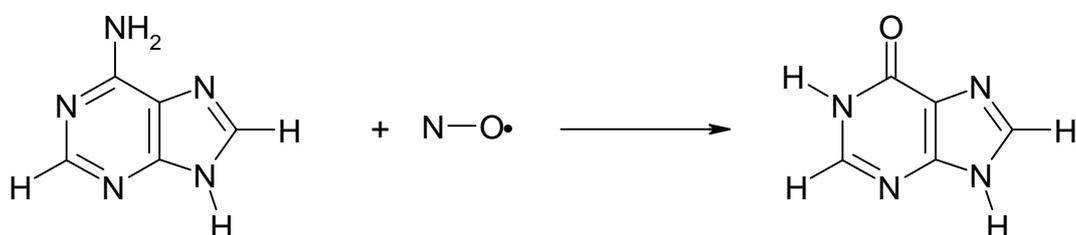
Hypoxanthin wahrscheinlich. Diese Möglichkeit sollte durch die sich anschließende Analytik geklärt werden.

Beim Vergleich der Retentionszeiten aus der HPLC Trennung der Produkte mit den Standardsubstanzen Adenin und Hypoxanthin konnte eine Übereinstimmung festgestellt werden. Dies war das erste Ergebnis, welches die Möglichkeit der Hypoxanthinbildung bestätigte.

Um diesen Befund abzusichern, wurden nun LC-MS Messungen durchgeführt. Dabei ergab sich für den Produktpeak eine Masse von  $m/z = 137,1^1$ . Die Molmasse des Produktes konnte also mit 136,1 g/mol bestimmt werden. Bei höherer Fragmentierungsspannung traten auch die für das Hypoxanthin unter diesen Bedingungen typischen Fragment-Ionen auf ( $m/z = 120,0$  ;  $m/z = 110,1$  ;  $m/z = 93,0$ ).

Unter gleichen Meßbedingungen wurde der Hauptpeak vermessen. Dabei wurde ein Molekülpeak von  $m/z = 136,1$ , welcher einer Molmasse von 135,1 g/mol entspricht, gefunden. Auch hier konnten die typischen Fragment-Ionen ( $m/z = 119,0$  ;  $m/z = 109,1$  ;  $m/z = 92,1$ ) vom Adenin bei höherer Fragmentierungsspannung detektiert werden.

### Schema 3-3



Durch den Vergleich der Peakflächen von Standards mit den Produkten konnte eine Umsetzungsrate zu Hypoxanthin von etwa 2% bestimmt werden. Auf Grund der analytischen Ergebnisse und wegen der geringen Umsetzungsrate wurde auf eine Isolierung und weitere Untersuchung des Produktes verzichtet.

Zur Überprüfung, ob auch hier das Wasser des verwendeten DMSO an der Reaktion beteiligt war, wurde wie in Abschnitt 3.1.1 die Reaktion in DMSO SeccoSolv<sup>®</sup> wiederholt. Wie erwartet, entstand in diesem fast kein Hypoxanthin mehr.

<sup>1</sup> Im API-ES-positiv (100V Fragmentierungsspannung). Die Molekülmasse plus 1 wird detektiert.

### 3.2.2 Ergebnisse der Umsetzungen mit Stickstoffdioxid

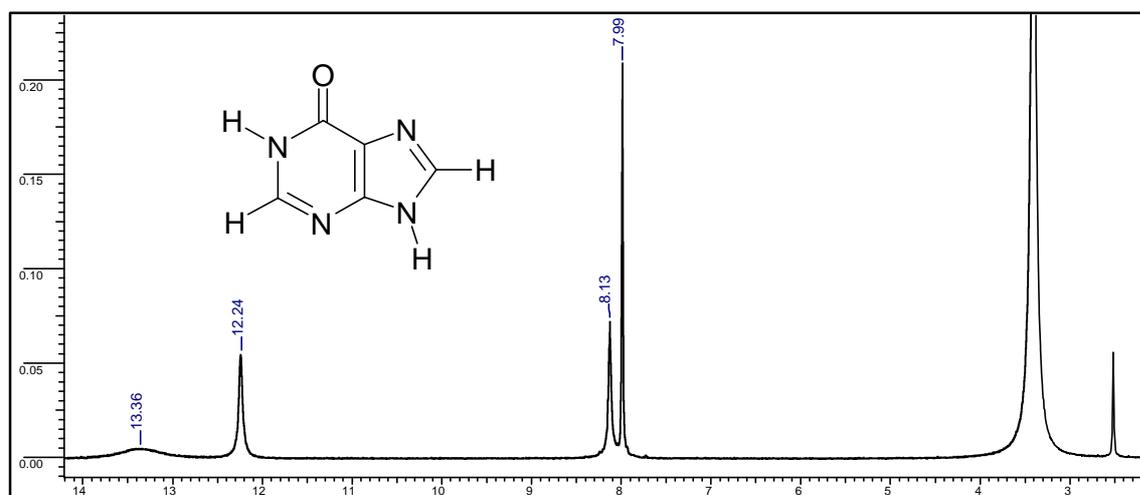
Nach der in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Umsetzung wurde Adenin mit Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) zur Reaktion gebracht.

Im Anschluß daran wurde eine HPLC Untersuchung durchgeführt (Parameter 8). In diesem Chromatogramm war zu sehen, daß der Adeninpeak bei 19,74 min zu Gunsten eines neuen Peaks bei 9,13 min fast vollständig verschwunden war. Im Anbetracht der Retentionszeit des Produktpeaks lag die Vermutung nahe, es habe sich auch diesmal Hypoxanthin gebildet.

Das Produkt wurde nun wie in Abschnitt 2.5 beschrieben isoliert.

Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum mit Peaks bei 8,13 ppm und 7,99 ppm für die CH-Protonen stimmten mit dem des Hypoxanthin-Standards überein. Auch die Signale für die NH-Protonen bei 12,24 ppm in Position 9 und 13,36 ppm in Position 1 konnten in beiden Spektren festgestellt werden.

**Abbildung 3.6**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Reaktionsprodukt



Ein Vergleich der Massen- und der IR-Spektren von Produkt und Hypoxanthin-Standard bestätigte nochmals diesen Befund.

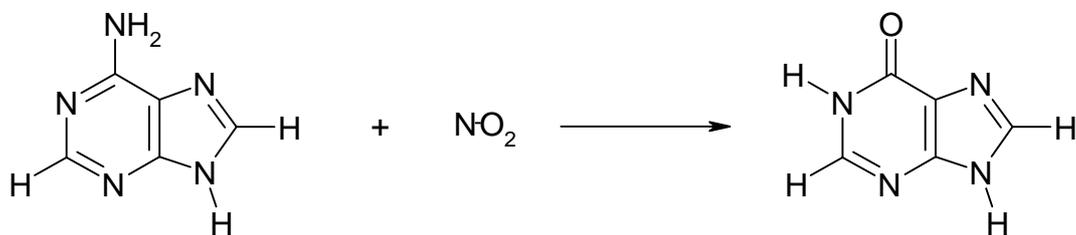
Für das Produkt konnten im MS<sup>1</sup> ein Molpeak bei  $m/z = 136,1$  und die charakteristischen Fragmente bei

- $m/z = 108,0$  (M minus CO)
- $m/z = 81,0$  (108 minus CHN, weiterer Abbau des 6-Ringes) und
- $m/z = 54,0$  (81 minus CHN)

deutlich erkannt werden.

Im IR-Spektrum ist ein Carbonylpeak bei  $1674\text{ cm}^{-1}$  hinzugekommen und es fehlten die Signale für die Aminogruppe aus dem Adenin.

### Schema 3-4



---

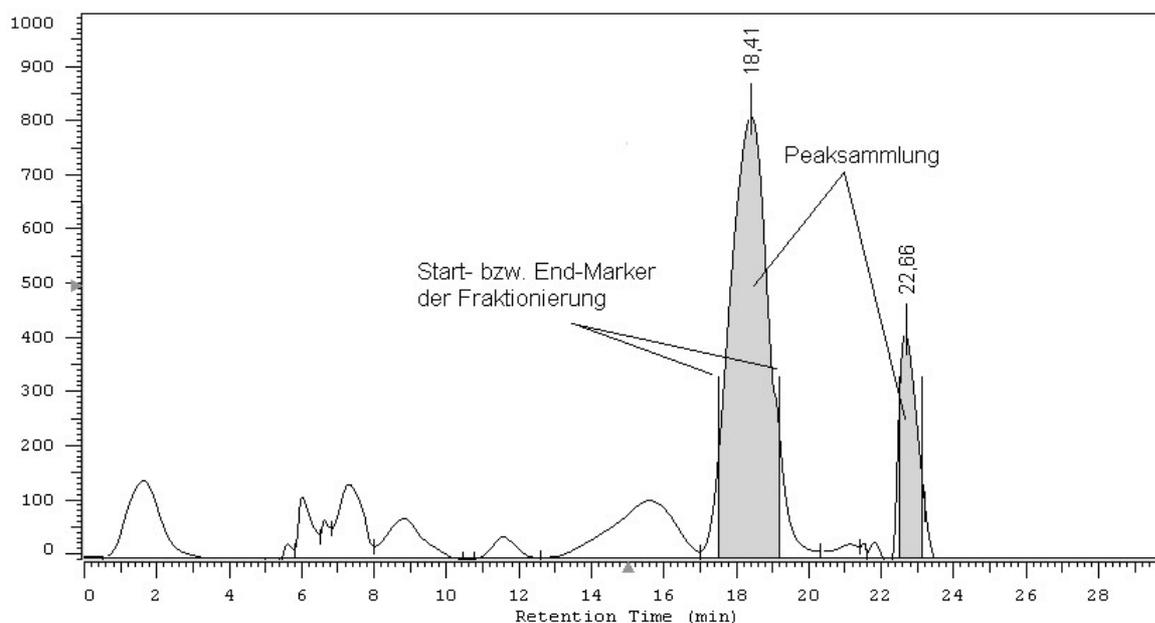
<sup>1</sup> Direkteinlaß MS mit Elektronenstoßionisation (MS-System 2).

Die Aufklärung der Reaktion von Guanin und NO<sub>2</sub> gestaltete sich erheblich schwieriger. Guanin mußte wiederum als Suspension eingesetzt werden.

Schon zu Beginn der NO<sub>2</sub>-Einleitung begann der Niederschlag in Lösung zu gehen und nach etwa 10 min lag eine klare tannengrüne Lösung vor. Nach Entfernung des restlichen Stickstoffdioxids blieb eine klare, schwach orange gefärbte Reaktionslösung zurück.

Die sich anschließende chromatographische HPLC-Untersuchung (Parameter 9) der Reaktionslösung zeigte eine Vielzahl von Signalen, unter denen sich zwei Hauptprodukte mit Retentionszeiten von 18,41 min und 22,66 min befanden.

**Abbildung 3.7**                      **Chromatogramm aus Guanin + NO<sub>2</sub>**



Diese beiden Hauptprodukte wurden nun mit der LC-MS untersucht (CI positiv, Parameter 10). Dadurch konnte den Hauptsignalen im Chromatogramm (im Folgenden nur noch Peak 1 und Peak 2 nach ihrer Elutionsfolge genannt) eine Molmasse von 152,1 g/mol für Peak 1 und 197,1 g/mol für Peak 2 zugeordnet werden. Detektiert wurden im LC-MS die M plus 1 Signale, also  $m/z = 153,1$  und  $m/z = 198,1$ .

Durch eine Diazotierung mit anschließender Hydrolyse (siehe Schema 3-1 auf Seite 71) würde Guanin zu Xanthin umgesetzt werden, welches eine

Molmasse von 152,1 g/mol besitzt. Eine eventuelle Nitrierung von Xanthin würde zu einem Nitroxanthin mit einer Molmasse von 197,1 g/mol führen. Um die Identität der beiden Hauptprodukte zu klären, wurden die beiden Hauptprodukte gesammelt (Parameter 9, siehe Abbildung 3.7) und wie unter 2.5 beschrieben aufgearbeitet. Dabei wurden geringe Mengen einer weißen (Peak 1) und einer gelben Verbindung (Peak 2) erhalten. Da die Ausbeute jeweils weniger als 4 mg betrug, wurde von den Verbindungen ein hochauflösendes EI-MS angefertigt. Für die Verbindung Peak 1 konnte eine Molmasse von 152,033410 g/mol ermittelt werden. Dies entspricht einer Zusammensetzung von  $C_5H_4N_4O_2]^+$  (Basispeak: rel. Int. 100%).

Als charakteristische Fragment-Ionen konnten

lf. Nr.	rel. Int.	gefundene Masse	Summenformel	Zuordnung
1	49,0%	109,02764	$C_4H_3N_3O]^+$	M - CO/NH
2	5,06%	81,032716	$C_3H_3N_3]^+$	M - CO/NH/O <sup>1</sup>
3	32,8%	54,021553	$C_2H_2N_2]^+$	M - CO/NH/O/CNH <sup>1</sup>

detektiert werden.

Weiterhin sind FAB<sup>-</sup>-Experimente mit der Verbindung 1 gemacht worden. Ein Molpeak bei  $m/z = 151,1$  g/mol wurde detektiert. Hierbei können zwar weniger strukturelle Informationen gewonnen werden, jedoch ist die Molmasse der Verbindung abgesichert (152,1 g/mol). Diese beiden Ergebnisse korrelieren vollkommen mit dem des vermessenen Xanthin-Standards. Alle weiteren analytischen Daten entsprachen ebenfalls denen von Xanthin.

Für Peak 2 wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt. Auch hier sind die ersten Informationen zur Molmasse mittels LC-MS erhalten worden. Im CI-minus-Spektrum (Parameter 10) konnte deutlich ein Molekülsignal von  $m/z = 196,1$  detektiert werden (Molmasse = 197,1 g/mol). Als Fragment-

---

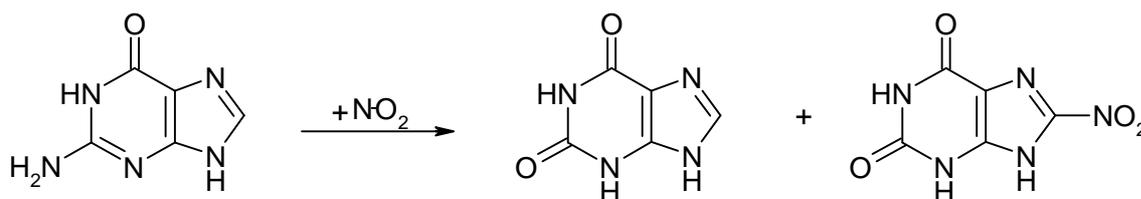
<sup>1</sup> Weiterer Zerfall des 6-Ringes.

Ionen konnten  $m/z = 180,1$  (M-O) und  $m/z = 157,1$  (M-NO) detektiert werden.

Bei der hochauflösenden MS bereitete diese zweite Verbindung jedoch unerwartete Schwierigkeiten. Die unter Elektronenstoß herrschenden drastischen Bedingungen ließen es nicht zu, ein hochauflösendes MS anzufertigen. Der zu erwartende Molpeak bei  $m/z = 196,1$  konnte nicht in der entsprechenden Intensität detektiert werden. Verunreinigungen führten zu thermischen Umlagerungen und dadurch zu diesem Massenspektrum. Auch das noch angefertigte FAB<sup>+</sup>-Spektrum ließ keine eindeutige Klärung zu. Dieses Ergebnis überraschte jedoch nicht, da für die bei FAB<sup>+</sup>-Experimenten herrschenden milden Bedingungen leicht zu protonierende Gruppen (wie z.B. -NH<sub>2</sub>) im Molekül enthalten sein müssen. Damit wurde die Vermutung, es handle sich um ein nitriertes Xanthin, erhärtet.

Im Gegensatz dazu ergab das FAB<sup>-</sup>-Spektrum einen deutlichen Peak bei  $m/z = 196$ . Nach Auswertung wurde eine Summenformel von C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> bestimmt. Auch die für eine Nitroverbindung charakteristischen Fragmente von  $m/z = 166$  (M-NO),  $m/z = 151$  (M-NO<sub>2</sub>) und  $m/z = 180$  (M-O) konnten nachgewiesen werden. Im Xanthin ist die wahrscheinlichste Stelle für eine Nitrierung die 8-Position. 8-Nitroxanthin ist literaturbekannt und erstmals 1993 von *Pfleiderer*<sup>100)</sup> beschrieben worden.

### Schema 3-5



Von Prof. Pfeleiderer konnte eine geringe Menge Referenzsubstanz erhalten werden.

Nach Vergleich der damit erhaltenen analytischen Daten war es nun sicher möglich, auch ohne das fehlende EI-MS die von mir separierte Verbindung 2 (Peak 2) als 8-Nitroxanthin zu bestimmen.

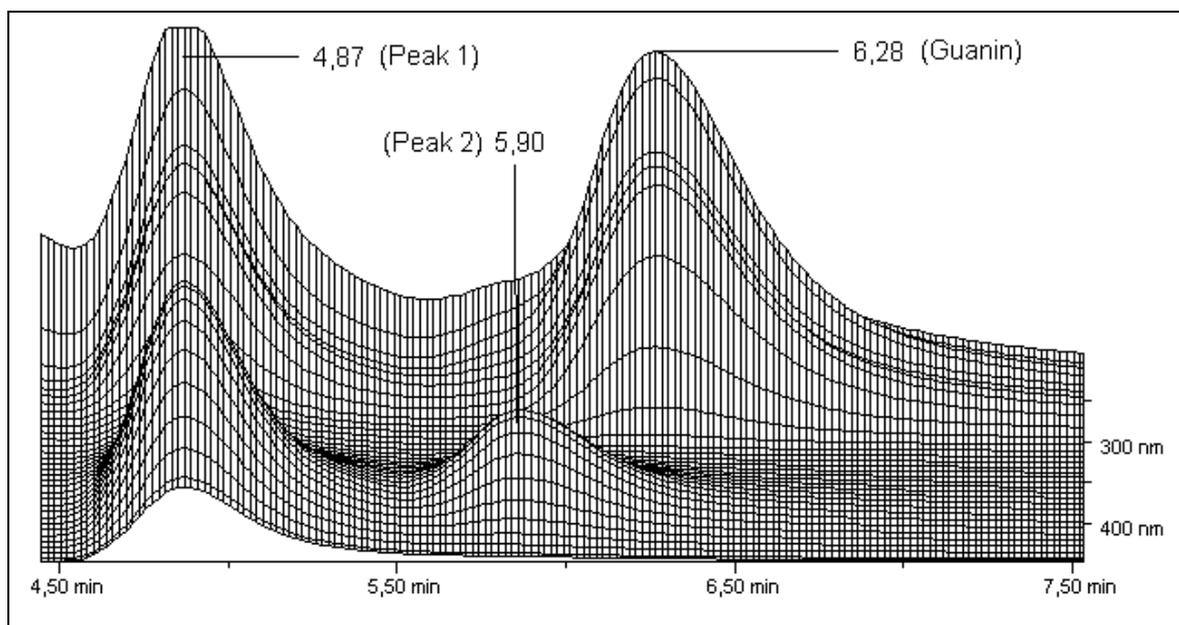
### 3.2.3 Ergebnisse der Umsetzung mit Peroxynitrit

Die Reaktion von Guanin mit Peroxynitrit wurde bereits von *Yermilov et. al.* beschrieben<sup>101)</sup>. Sie versetzten Guanin mit einem 10-fachen Überschuß an Peroxynitrit und erhielten 8-Nitro-guanin in ca. 7%iger Ausbeute<sup>1</sup>. Dass hier Guanin in Lösung eingesetzt wurde, ist nach den beschriebenen Ergebnissen wenig wahrscheinlich. Bei allen Untersuchungen mußte Guanin wegen der geringen Löslichkeit in jeglichen Lösungsmitteln als Suspension mit Peroxynitrit zur Reaktion gebracht werden.

Während der Reaktion (Methode 1, Seite 121) färbte sich der Ansatz braun und der Niederschlag blieb bestehen. Nach Filtration des äußerst feinen Niederschlags<sup>2</sup> wurde dieser als Guanin identifiziert. Der Hauptanteil des Edukts hatte sich nicht umgesetzt. Der verbliebene Überstand wurde mittels analytischer HPLC untersucht (Parameter 11), wobei der DAD sich als sehr hilfreich erwies.

Bei einer Wellenlänge von 265 nm war ein Hauptpeak bei 3,15 min zu sehen, welcher in Retentionszeit und UV-Spektrum mit Guanin übereinstimmt. Bei einer Wellenlänge von 400 nm waren zwei weitere Hauptpeaks mit Retentionszeiten von 5,33 min und 7,24 min zu erkennen.

**Abbildung 3.8**



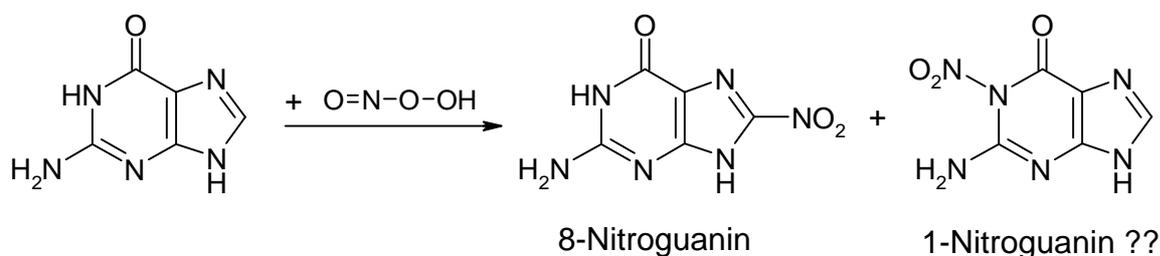
<sup>1</sup> bezogen auf die Ausgangskonzentration

<sup>2</sup> Es wurde durch einen Millipore-Membranfilter filtriert.

Der Überstand wurde jetzt noch mit der LC-MS vermessen (Parameter 10, Ionisierung APCI positiv). Für beide Peaks (400 nm) konnten  $m/z = 197$  sicher detektiert werden (ergibt eine Molmasse von 196,1 g/mol). Auch konnten jeweils Peaks bei  $m/z = 167,1$  (M-NO) nachgewiesen werden.

Die Molmasse von 196,1 g/mol entspricht der eines nitrierten Guanins. Alle von mir erhaltenen Daten des ersten Peaks stimmen mit den Ergebnissen von *Yermilov* überein, so daß es sich beim ersten Peak um 8-Nitroguanin handeln dürfte. Da aber auch der zweite Peak eine Molmasse von 196,1 g/mol besitzt, könnte es sich um ein Isomer handeln. So ist es vorstellbar, daß es sich bei Peak 2 eventuell um eine N-Nitroverbindung<sup>1</sup> oder sogar eine Oxo-Nitroso-Verbindung, also einen Salpetrigsäureester, handeln könnte<sup>39</sup>).

### Schema 3-6



Dadurch wurde der Befund von *Yermilov et. al.* bezüglich des ersten Peaks betätigt. Der zweite Peak war in seiner Intensität geringer. In der oben erwähnten Veröffentlichung ist jedoch nur der erste Peak beschrieben und ausgewertet worden.

Die Umsetzung mit Methode 2 aus Abschnitt 6.2.5 erbrachte keine anderen Ergebnisse. Die eingesetzte Suspension färbte sich allerdings nicht braun. Der Guaninpeak nahm mit zunehmender Peroxynitritzugabe kontinuierlich ab.

Wie beschrieben, mußte Guanin schon als Suspension zur Umsetzung eingesetzt werden. Da die Reaktionsprodukte nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden konnten, war mit den zur Verfügung stehenden analytischen Methoden eine weitere Aufarbeitung der Umsetzungen zeitlich nicht vertretbar, zumal die unbekannte Substanz 2 (Peak 2) noch in

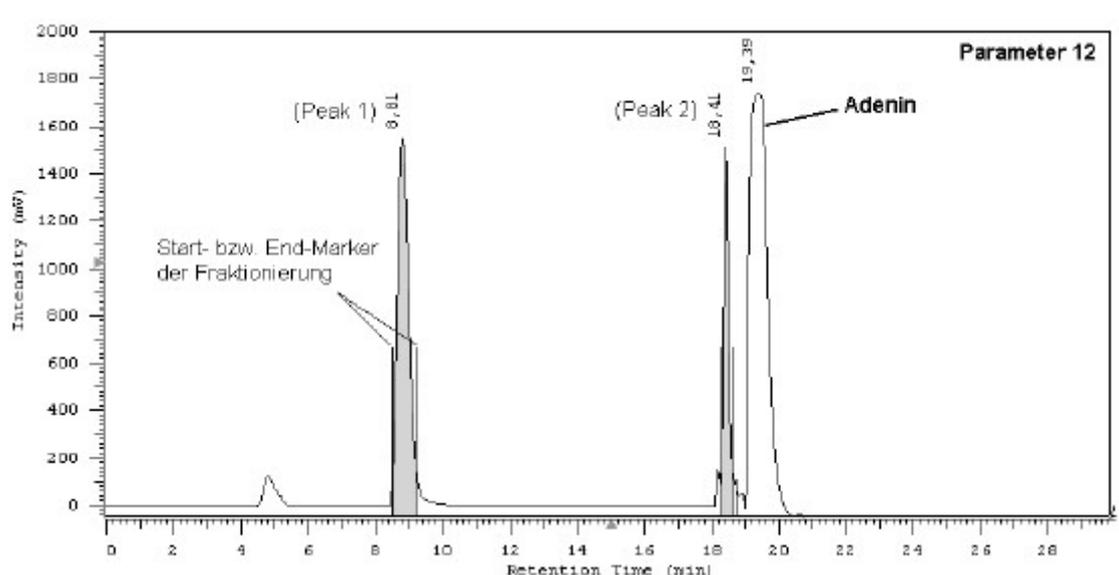
<sup>1</sup> *Ariza et.al.* <sup>102</sup>

deutlich geringerer Konzentration als Substanz 1 (Peak 1) vorlag (siehe Abbildung 3.8).

Auch die Umsetzung von Adenin mit Peroxynitrit wurde nach beiden in Abschnitt 6.2.5 beschriebenen Methoden durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß bei einmaliger Zugabe der Peroxynitritmenge (Methode 1) eine geringere Umsetzung zu den Reaktionsprodukten stattfand als nach wiederholter Zugabe äquimolarer Mengen Peroxynitrit (Methode 2). Allerdings hatte sich Adenin auch hier nur zu etwa 6% umgesetzt.

Die Produkte wurden mittels semipräparativer HPLC (s. Abbildung 3.9; Parameter 12) aus dem Reaktionsansatz nach Methode 1 isoliert. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem in Abschnitt 2.5 beschriebenen Verfahren.

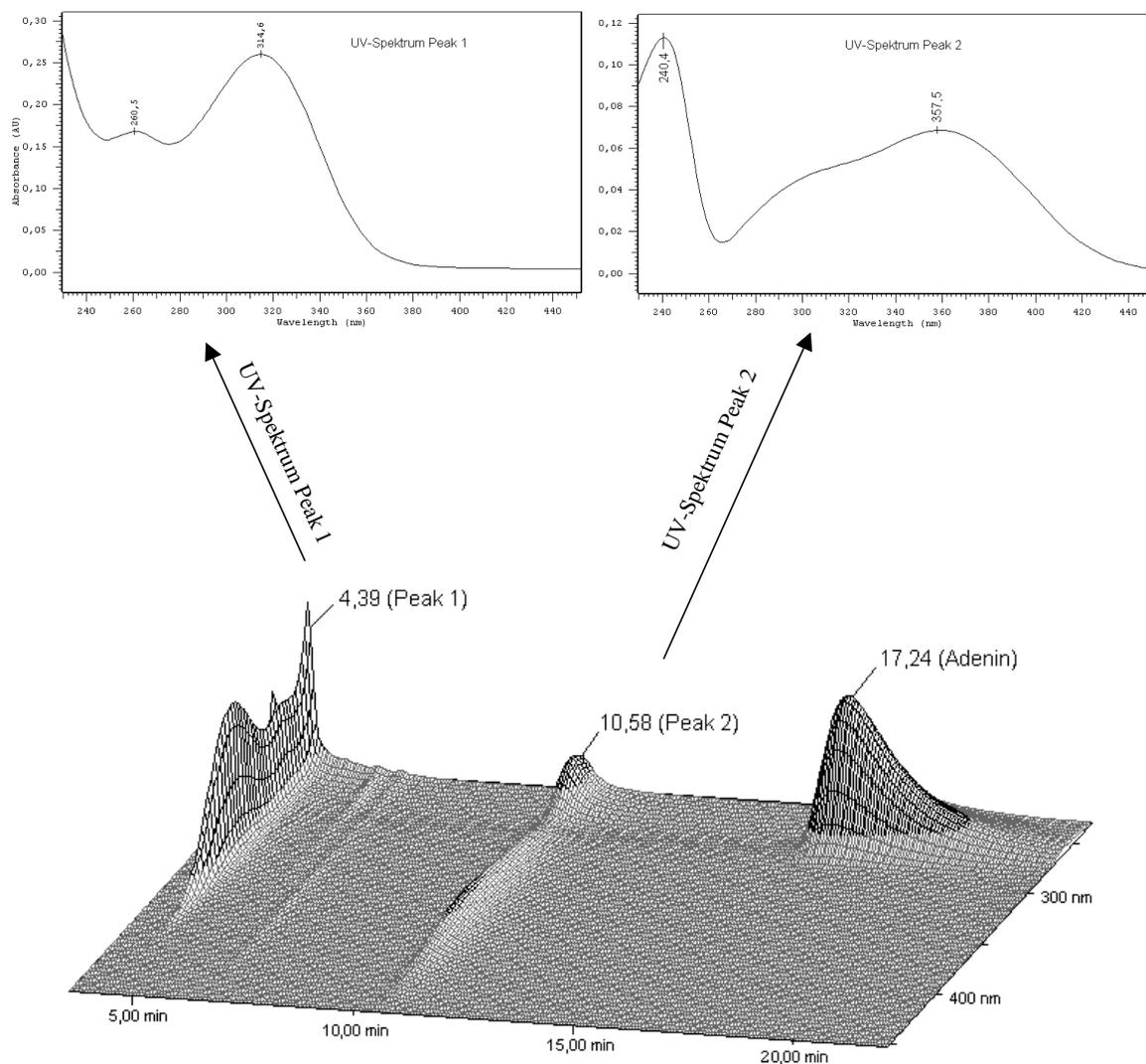
**Abbildung 3.9 semipräparative HPLC von Adenin + Peroxynitrit**



Nach Auswertung der analytischen HPLC (s. Abbildung 3.10; Parameter 13) mit dem DAD konnten neben dem verbliebenen Adenin bei 17,24 min zwei weitere Produkte bei 4,39 min (Peak 1) und 10,58 min (Peak 2) detektiert werden. Für die erfolgreiche Trennung der Peaks war hier die spektrale Information aus dem DAD von großer Bedeutung. So wurde die Wellenlänge von 330 nm nach 19 min auf 254 nm geändert, da sonst Adenin nicht detektierbar gewesen wäre und die Kontrolle der Trennung von Peak 2 und Adenin nicht gelungen wäre.

Abbildung 3.10

### HPLC Chromatogramm aus Adenin + Peroxynitrit nach 15-fachem Peroxynitritüberschuß



Die beiden Peaks konnten erst nach 5-fachem molarem Überschuss an Peroxynitrit sicher mit dem DAD bestimmt werden. Ein stetiger Anstieg beider Peaks, mit gleichzeitig abnehmendem Adeninsignal, konnte bis zum Ende der Umsetzung beobachtet werden.

Der in Abbildung 3.10 nicht dargestellte Bereich von 0 min bis ca. 4,5 min enthält Zeretzungsprodukte des Peroxynitrits. Der Nachweis darüber wurde über die Injektion von zersetztem Peroxynitrit geführt. Hierzu wurde Peroxynitrit ohne Substrat mit Salzsäure auf pH 6 gebracht und mittels HPLC getrennt.

Durch Kontrolle der Reaktionslösung mittels LC-MS<sup>1</sup> wurde für beide Produktpeaks im Chromatogramm ein Molpeak von  $m/z = 181,0$  ermittelt (APCI positiv). Beide Produkte besitzen nach der LC-MS Messung eine Molmasse von 180,0 g/mol.

Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Mengen Substanz beliefen sich für beide Substanzen auf unter 1 mg. Mittels hochauflösender MS wurde nun von beiden die Summenformel bestimmt. Dabei konnte zweifelsfrei festgestellt werden, daß beide Verbindungen eine Molmasse von 180,0 g/mol besitzen.

### Peak 1:

- Molekülpeak:  $m/z = 180,039520 = \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_2\text{]}^+$  (gefunden)
- Molekülpeak:  $m/z = 180,039580 = \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_2\text{]}^+$  (berechnet)

Als charakteristische Fragment-Ionen konnten

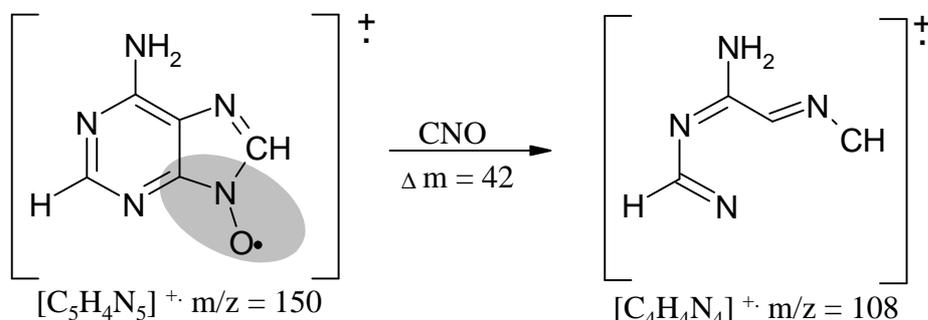
lf. Nr.	rel. Int	Gefundene Masse	Summenformel	Zuordnung
1	1,7%	150,041590	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5\text{O]}^+$	- NO
2	69,3%	134,04658	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_5\text{]}^+$	- NO <sub>2</sub>
3	21,2%	108,04351	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{]}^+$	lf. Nr. 2 -CN

Gefundene Masse als  $m/z$

detektiert werden.

<sup>1</sup> Es wurden beide Lösungen (erhalten aus Methode 1 und 2) mit der LC-MS vermessen.

Als Fragmentierungsmuster für das Ion  $m/z = 150$  ( $C_5H_4N_5]^+$  der Substanz 1 ist vor eventueller Abspaltung der Nitrosogruppe in Position 9 oder 7 (Tautomerie der Protonen) folgender weiterer Abbau möglich:



Dieser Abbau ist für Nitrogruppen im EI-MS nicht ungewöhnlich.

### Peak 2:

- Molekülpeak:  $m/z = 180,039620 = C_5H_4N_6O_2]^+$  (gefunden)
- Molekülpeak:  $m/z = 180,039580 = C_5H_4N_6O_2]^+$  (berechnet)

Als charakteristische Fragment-Ionen konnten für Peak 2

lf. Nr.	rel. Int	Gefundene Masse	Summenformel	Zuordnung
1	43,3%	150,041590	$C_5H_4N_5O]^+$	- NO
2	14,3%	123,03073	$C_4H_3N_4O]^+$	lf. Nr. 1 -HCN
3	13,4%	107,03587	$C_4H_3N_4]^+$	lf. Nr. 1 -CHNO

Gefundene Masse als  $m/z$

detektiert werden.

Auch der weitere Abbau aus  $m/z = 107$  durch HCN Abspaltung ( $m/z = 80$  und  $m/z = 53$ ) ist durch die gemessenen Daten möglich.

Aus den Informationen zur Summenformel konnte geschlußfolgert werden, daß die Aminogruppe des Adenin erhalten geblieben war. Des weiteren muß eine Nitrogruppe in das Adeninmolekül eingeführt worden sein. Dies beweisen die Fragmentierungen, die für Nitroverbindungen typisch sind. Auch das FAB<sup>+</sup>- und FAB<sup>-</sup>-Spektrum von beiden Substanzen stützt die Vermutung, daß es sich in beiden Fällen um stellungsisomere Nitroadenin-Verbindungen handeln muß. Die wahrscheinlichsten Positionen im Adenin sind die Ringatome 8, 2 und 7/9 (Tautomerie).

Eine Zuordnung der entsprechenden Position für die Nitrierung des Adenins konnte nur aus den jeweiligen Fragmentierungsmustern der Verbindungen und aus dem <sup>1</sup>H-NMR geschlußfolgert werden.

Die NH<sub>2</sub>- und die NH-Signale der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren beider Produkte konnten mit Hilfe eines D<sub>2</sub>O Austausches identifiziert werden.

Bei Peak 1 wurde das Signal bei 13,91 ppm, bei Peak 2 die Signale bei 6,69 und 8,36 ppm durch D<sub>2</sub>O Zugabe gelöscht (siehe Tabelle 3.1), so daß eine Zuordnung der Signale möglich war.

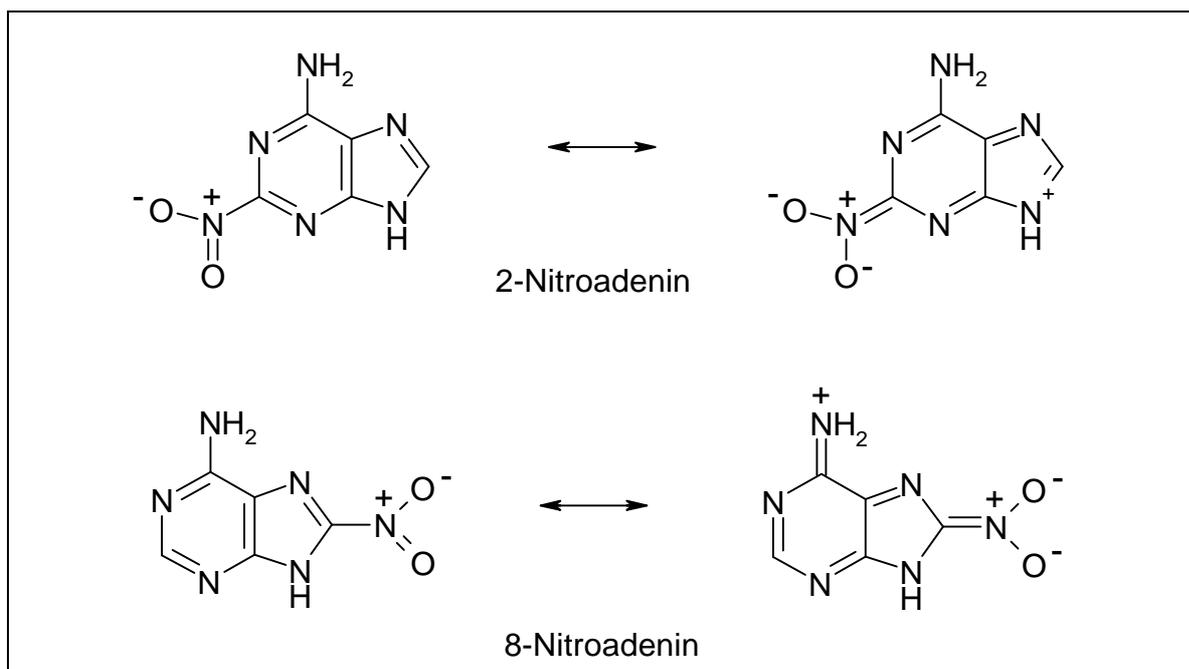
Aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Produkte ist zu erkennen, daß es sich bei Verbindung „Peak 1“ um das 7- bzw. 9-Nitroadenin handeln sollte, da das NH-Signal verschwunden ist, aber noch beide CH-Signale vorhanden sind.

**Tabelle 3.1 Chemische Verschiebungen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Angaben in ppm)**

	Adenin	Peak 1	Peak 2
NH <sub>2</sub>	7,09	13,91	6,69
NH	12,79	-	8,36
H2 bzw.H8	8,12/ 8,10	8,52/ 8,47	8,03

Bei der Verbindung in Peak 2 hingegen ist das NH-Signal bei 8,36 ppm noch vorhanden, aber es existiert nur noch ein CH-Signal. Daher muß entweder das 2- oder das 8-Nitroadenin vorliegen. Um herauszufinden welches der beiden Isomere entstanden war, wurden die mesomeren Grenzstrukturen der Verbindungen herangezogen.

### Schema 3-7 Mesomere Grenzstrukturen von 2- und 8-Nitroadenin



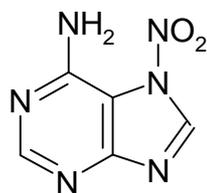
8-Nitroadenin ist ein Polymethin mit elf Kettengliedern, bei dem auch die Aminogruppe in die Mesomerie mit einbezogen ist. Bei 2-Nitroadenin liegt ebenfalls ein Polymethin vor, welches aber nur aus neun Kettengliedern besteht und bei dem die Aminogruppe nicht zum mesomeren System gehört. Vergleicht man das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung mit dem von Adenin, so stellt man fest, daß das  $\text{NH}_2$ -Signal schwach von 7,09 ppm nach 6,69 ppm hochfeldverschoben ist. Würde es sich bei der Verbindung um 8-Nitroadenin handeln, so wäre die  $\text{NH}_2$ -Gruppe durch die partielle positive Ladung stark entschirmt. Daher müßte das Signal weit ins tiefe Feld verschoben sein.

Aus diesen Überlegungen läßt sich ableiten, daß es sich bei der gesuchten Verbindung um 2-Nitroadenin handeln müßte.

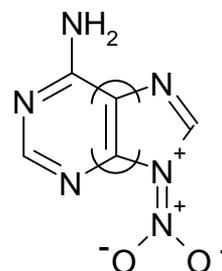
Bei einem 7- bzw. 9-Nitroadenin ist eine Mesomerie nur in viel geringerem Umfang möglich. Das mesomere System besteht jeweils aus nur drei

Kettengliedern<sup>1</sup>, und bei beiden Verbindungen nimmt die NH<sub>2</sub>-Gruppe nicht an der Mesomerie teil. Das NH<sub>2</sub>-Signal ist allerdings von 7,09 ppm im Adenin nach 13,91 ppm stark ins tiefe Feld verschoben, so daß die elektronische Umgebung durch die Einführung der Nitrogruppe erheblich verändert sein muß. Im 7-Nitroadenin liegen die beiden Gruppen räumlich sehr nah beieinander, was eine derart starke Verschiebung bewirken könnte. Allerdings ist die Aminogruppe im 9-Nitroadenin Teil eines vinylogenen Nitroguanins, so daß auch in diesem Fall eine derartige Tieffeldverschiebung zu erwarten wäre. Daher kann die Verbindung „Peak 1“ keiner der beiden möglichen Strukturen eindeutig zugeordnet werden.

### Schema 3-8



7-Nitroadenin



9-Nitroadenin

Um zu klären, ob tatsächlich das Peroxynitrit für die Reaktionen verantwortlich war, wurde der Versuch wiederholt, wobei dem Reaktionsansatz vorher verschiedene Peroxynitritscavenger hinzugegeben wurden. Als Scavenger wurden Methionin<sup>103)</sup> und Mangan(III)tetrakis(4-benzoesäure)porphyrin (MnTBAP)<sup>79, 104, 105, 106)</sup> verwendet.

Während Methionin nach jeder Peroxynitritzugabe in äquimolaren Mengen zugegeben wurde (Inhibition durch Reaktion zu Methioninsulfoxid und Ethylen), wurde MnTBAP mit einer Konzentration von 1%, bezogen auf die Konzentration von Adenin, als katalytisch wirkender Feststoff dem Reaktionsansatz hinzugefügt<sup>105)</sup>. Zur Regeneration des Katalysators wurde zusätzlich Ascorbat zugegeben<sup>73)</sup>.

Die Umsetzungen erfolgten nach Methode 2 (siehe Seite 122).

<sup>1</sup> Übereinstimmend mit den mesomeren Grenzstrukturen ist die weiße Farbe von Peak 1 und die gelbe von Peak 2 (siehe auch die UV-Spektren in Abbildung 3.10).

Anschließend wurde die Lösung dünn-schichtchromatographisch<sup>1</sup> untersucht, der eine HPLC Untersuchung folgte. Da Methioninsulfoxid mit einem UV Detektors nicht detektiert werden kann, wurde hier lediglich nach den Reaktionsprodukten, wie sie ohne Zusatz von Scavenger entstanden entstanden waren, gesucht. Entstandenes Methioninsulfoxid wurde nach erfolgter Dünnschichtchromatographie mittels Ninhydrinreaktion detektiert. Hierbei wurde nicht abreagiertes Methionin mit erfaßt. Weder auf der DC noch im HPLC-Chromatogramm waren Hinweise für entstandene Reaktionsprodukte zu finden.

Analoge Untersuchungen erfolgten für das MnTBAP. Weder die Dünnschichtchromatographie<sup>2</sup> noch die nachfolgende HPLC-Untersuchung ließen Reaktionsprodukte erkennen..

Beide Purinbasen wurden zusätzlich mit den möglichen Zerfallsprodukten von Peroxynitrit zur Reaktion gebracht. Weder mit entsprechenden Lösungen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , Nitrit und Nitrat konnten Reaktionsprodukte ermittelt werden (pH-Werte wie in den Methoden zur Umsetzung mit Peroxynitrit beschrieben).

---

<sup>1</sup> Laufmittel: n-Buthanol/Ammoniak 25% (3:1 v/v), Kieselgel + RP 18 Platten

<sup>2</sup> Methode 1: n-Buthanol/Ammoniak 25% (3:1 v/v), Cellulose + RP 18 Platten,

Methode 2: Laufmittel A: n-Buthanol/Aceton (1:1 v/v)

Laufmittel B: Eisessig/Wasser (1:2 v/v)

Laufmittel: 56 mL Laufmittel A + 24 ml Laufmittel B mit Cellulose + RP 18 Platten

## 4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Darstellung und die Reaktionen von aktiven Stickstoffspezies mit DNA/RNA-Teilstrukturen hinsichtlich der beobachteten mutagenen Schädigungen der Erbsubstanz durch endo- oder exogen gebildetem Stickstoffmonoxid und seiner reaktiven Folgeprodukte zu untersuchen.

Diese pathologischen Veränderungen sind das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, das im Wesentlichen durch aktivierte Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen verursacht wird. Pathologisch bedeutsam ist die Bildung von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) aus Stickstoffmonoxid-Radikal<sup>1</sup> (NO) und dem *in vivo* ubiquitär durch die NADPH-Oxidase gebildeten Superoxid-anion-Radikal ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ). Sowohl  $\text{O}_2^{\cdot -}$  als auch NO gehören zu den reaktiven, instabilen Radikalen. Somit ist es nicht verwunderlich, daß sie äußerst schnell zu Peroxynitrit als Hauptreaktionsprodukt reagieren. Diese Reaktion läuft etwa dreimal schneller ab als die Dismutierung von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  durch Superoxiddismutase. Dies bedeutet, daß durch vermehrte  $\text{O}_2^{\cdot -}$ -Bildung die physiologischen Funktionen von NO sehr ausgeprägt gehemmt werden können. Außerdem stellt Peroxynitrit ein starkes Oxidans dar, welches Zellmembranen durchdringen kann. Beim Zerfall des Peroxynitrit werden Nitrierungs- und Oxidationsreaktionen beobachtet. So stellt die Nitrierung von Tyrosin zum 3-Nitrotyrosin eine Markerreaktion für *in vivo* entstandenes Peroxynitrit dar.

Als allgemeine Überlegungen sind deshalb voranzustellen:

- Welche reaktiven Spezies werden für die durchzuführenden Reaktionen ausgewählt?
- Mit welchen DNA/RNA Teilstrukturen werden die Reaktionen durchgeführt?
- Entstehen eventuell mehrere Substanzen mit den reaktiven Spezies?
- Können Leitverbindungen für die durchgeführten Reaktionen gefunden werden?

---

<sup>1</sup> Stickstoffmonoxid ist im Grundzustand ein radikalisches Molekül (siehe Abbildung 1.2).

Bei der Auswahl der reaktiven Spezies muß vor allem das Stickstoffmonoxid als das biologisch aktive Molekül eingesetzt werden.

Eine weitere reaktive Spezies ist das Peroxynitrit, welches durch die hohe Geschwindigkeitskonstante bei der Bildung *in vivo* und seiner Reaktivität von großer Bedeutung bei Reaktionen mit DNA/RNA Teilstrukturen sein muß. Da für das Peroxynitrit auch Nitrierungsreaktionen beobachtet worden sind (siehe oben), ist der Vergleich der Reaktionsprodukte, wie sie aus der Reaktion von DNA/RNA Teilstrukturen mit Stickstoffdioxid oder Peroxynitrit entstehen, wichtig. Bilden sich sogar gleiche Reaktionsprodukte, sind zusätzlich Aussagen zu eventuell ablaufenden Zerfallsreaktionen des Peroxynitrit möglich. Außerdem wird bei der Reaktion von Peroxynitrit ein Zerfall unter Bildung von OH<sup>-</sup>- und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikalen diskutiert, die dann die eigentlichen Reaktionspartner für die biologischen Zielstrukturen darstellen. Aus diesen Gründen wird neben Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit auch Stickstoffdioxid als reaktive Spezies verwendet.

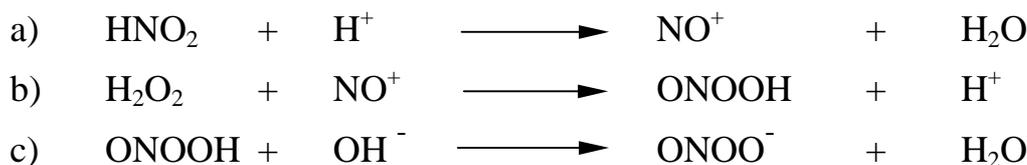
Als DNA/RNA Teilstrukturen bieten sich die entsprechenden Purin- und Pyrimidinbasen Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin an. So können im Einzelfall die Reaktionen der reaktiven Spezies mit den entsprechenden DNA/RNA-Bausteinen untersucht und anschließend miteinander verglichen werden.

Alle reaktiven Spezies (NO, NO<sub>2</sub> und ONOO<sup>-</sup>) wurden in höchst möglicher Reinheit zur Reaktion gebracht. Da Peroxynitrit im Gegensatz zu NO und NO<sub>2</sub> nicht käuflich erworben werden konnte, mußte es hergestellt werden. Aus der Vielzahl der in dieser Arbeit beschriebenen Möglichkeiten wurden die folgenden beiden Möglichkeiten im Labor etabliert. Aus der Reaktion 1 von Kaliumsuperoxid (KO<sub>2</sub>) mit NO-Gas entsteht das chemisch reinere Peroxynitrit. Nachteil ist der hohe apparative und zeitliche Aufwand. Über Reaktion 2 lassen sich mit Hilfe eines „Quenched Flow“-Reaktors größere Mengen Peroxynitrit relativ schnell herstellen, wobei hohe Salzverunreinigungen durch die verwendeten Edukte in Kauf genommen werden müssen.

Reaktion 1: KO<sub>2</sub> mit NO-Gas unter Sauerstoffausschluß

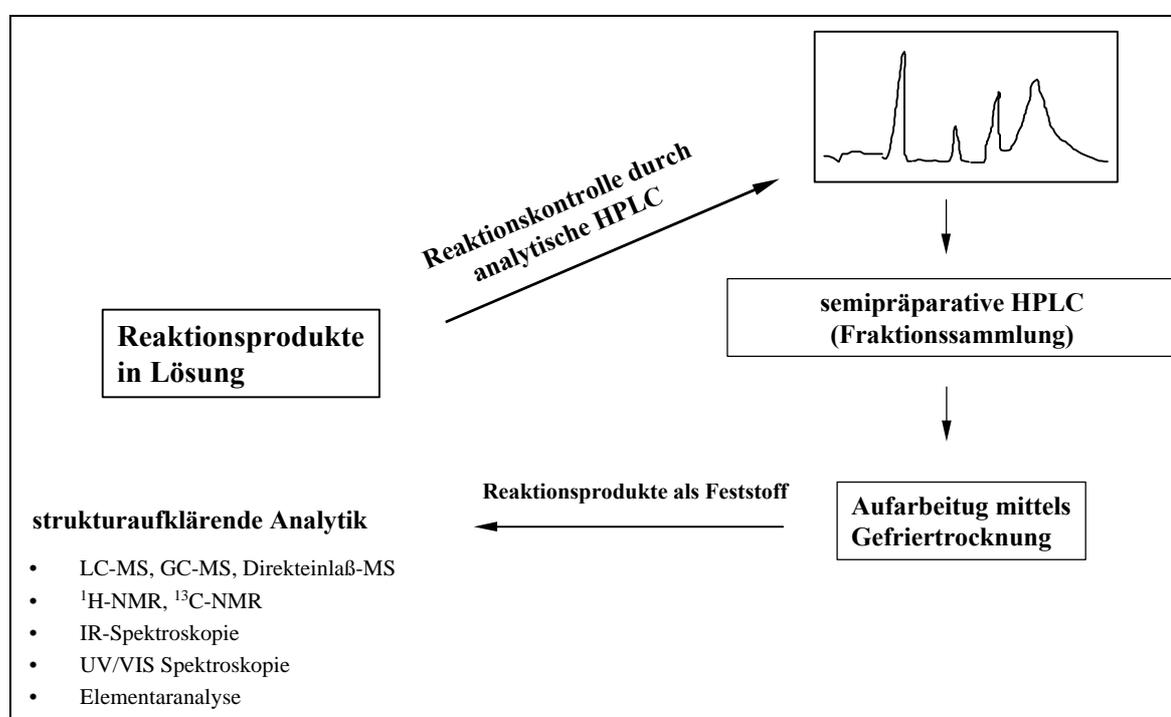


Reaktion 2: Wasserstoffperoxid mit salpetriger Säure im „Quenched Flow“-Reaktor



Nach Umsetzung der Purin- bzw. Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies konnte ein funktionsfähiges Modell zur Analytik der Reaktionsprodukte entwickelt werden. In der folgenden Abbildung ist der prinzipielle Ablauf schematisch dargestellt.

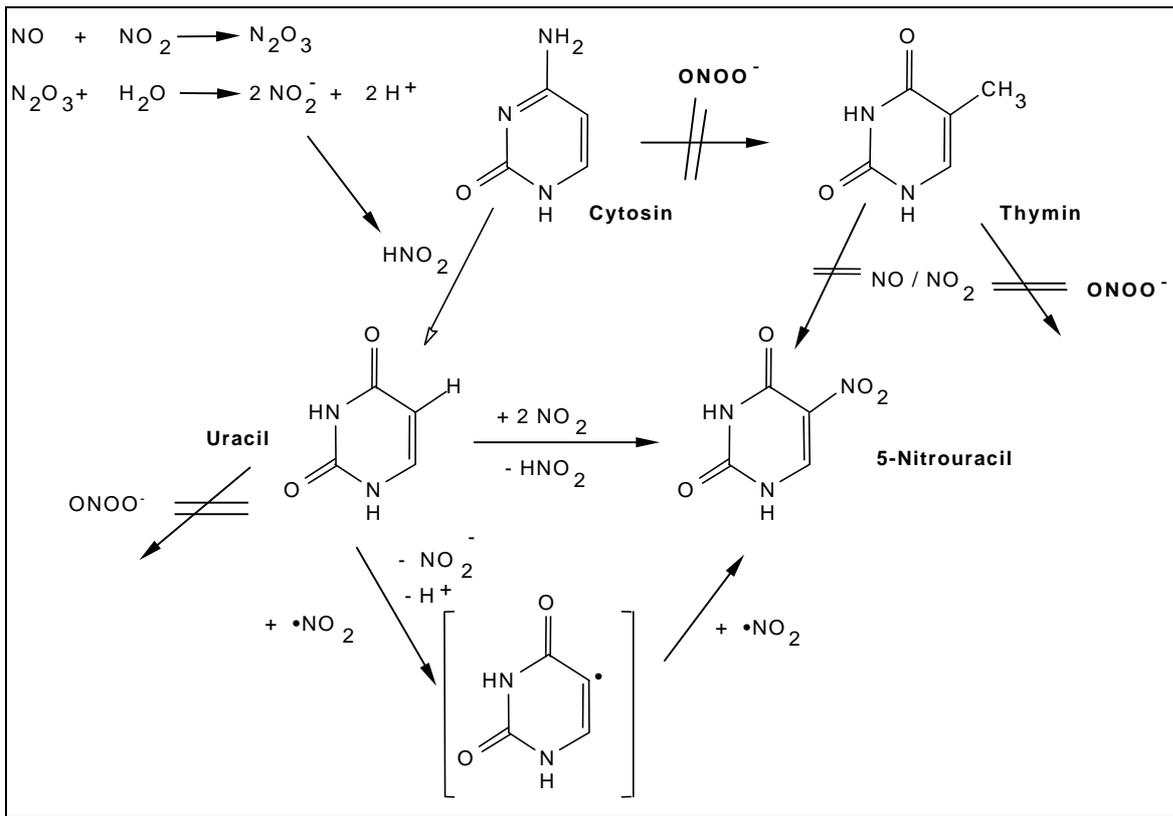
**Abbildung 4.1**



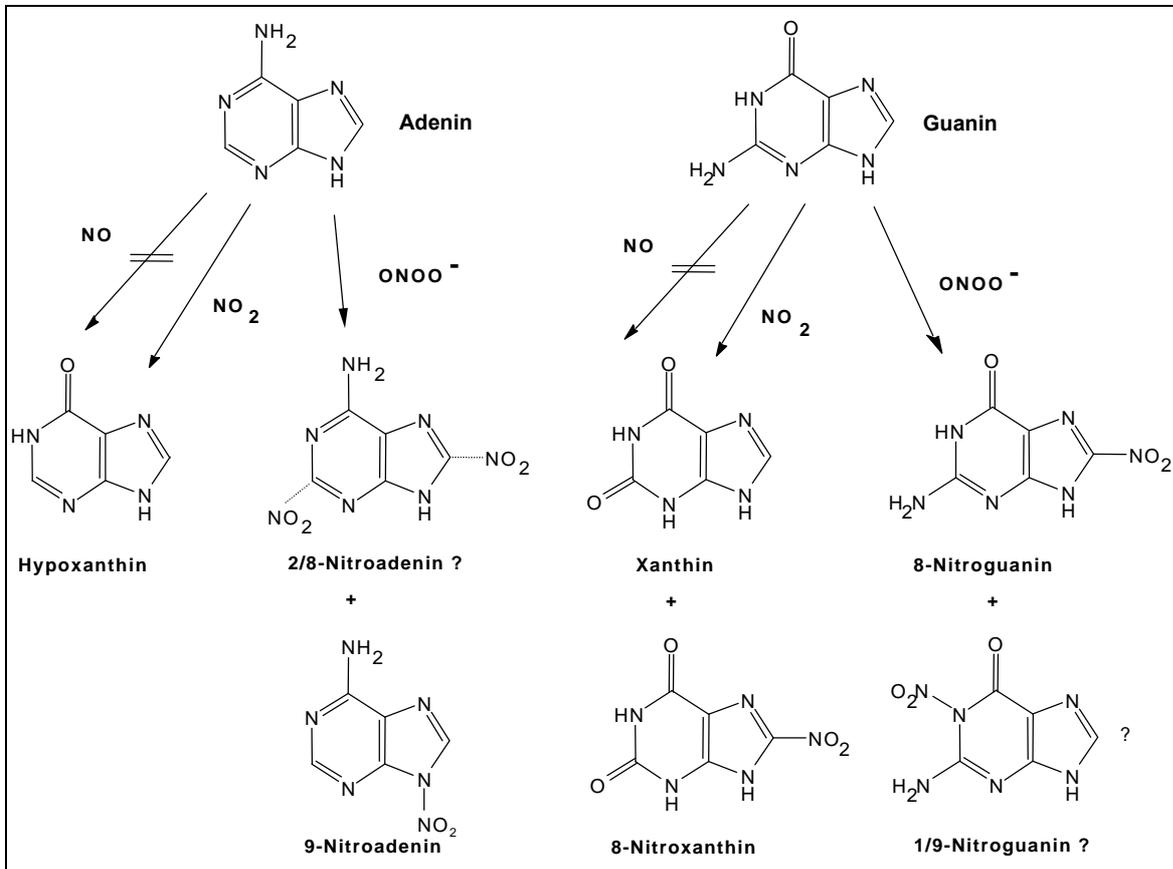
Die entstandenen Reaktionsprodukte sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt und könnten Endprodukte molekularer Mechanismen bei der Gentoxizität sein (Punktmutation). So ist erstmals das 8-Nitroguanin als Substanz und Marker zur DNA Schädigung durch Peroxynitrit überhaupt aufgeführt<sup>1</sup>. Dies läßt sich nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit unter anderem auch auf Nitroverbindungen des Adenins erweitern.

<sup>1</sup> Cayman-Chemical Katalog 2000, ist jedoch noch nicht käuflich zu erwerben.

**Abbildung 4.2 Reaktion der Pyrimidinbasen mit den reaktiven Spezies**



**Abbildung 4.3 Reaktion der Purinbasen mit den reaktiven Spezies**



## 5 Summary

The objective of this thesis was to investigate the preparation and reactions of active nitrogen species with partial DNA/RNA structures regarding observable mutagenic damages to genetic material by endogenically or exogenically generated nitrogen monoxide and its reactive intermediates and products. These pathologic changes are the result of a series of events caused mainly by active nitrogen and oxygen containing compounds. Pathologically important is the generation of peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) from nitrogen monoxide radicals<sup>1</sup> ( $\text{NO}$ ) reacting with superoxide radical anions ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), with the latter being ubiquitous generated *in vivo* by NADPH-oxidase.  $\text{O}_2^{\cdot -}$  as well as  $\text{NO}$  are known to be reactive and instable radicals. Therefore, a very fast reaction yielding peroxynitrite as the main product is not surprising. This reaction is about 3 times faster than the  $\text{O}_2^{\cdot -}$  dismutation by superoxide dismutase. Accordingly, an increased  $\text{O}_2^{\cdot -}$  formation is able to effectively prevent  $\text{NO}$ 's physiological functions. In addition, peroxynitrite is a strong oxidans with the ability to permeate cell membranes. During the decay of peroxynitrite, nitro-addition reactions and oxidations are observed. For instance, the nitro-addition to tyrosine yielding 3-nitrotyrosine is a marker reaction for *in vivo* generated peroxynitrite.

Therefore, the following questions can be raised:

- Which reactive species are chosen for the reactions under investigation?
- What partial DNA/RNA structures are likely targets for these reactions?
- Are there additional by-products and intermediates other than the reactive species?
- Is it possible to identify lead compounds for the reactions under investigation?

---

<sup>1</sup> Nitrogen monoxide in the ground state is a radical.

During selection of reactive species, nitrogen monoxide has to preferably be considered as the biologically active molecule.

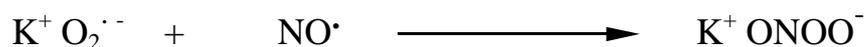
Peroxynitrite is a further reactive species of great importance, since it exhibits a high rate constant during its generation *in vivo* and because of its reactivity towards partial DNA/RNA structures. Since peroxynitrite also undergoes nitro-addition reactions (see above), a comparison of reaction products is important regarding reactions of nitrogen dioxide and peroxynitrite with partial DNA/RNA structures. In case of similar reaction products in both of these reactions, additional conclusions about possible decay reaction pathways can be drawn in order to clarify the still unknown fate of peroxynitrite during its decay. Furthermore, there exists the hypothesis of a peroxynitrite decay into OH<sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals, which will then in turn react with the biological targets.

Therefore, nitrogen dioxide is also chosen as a reactive species besides nitrogen monoxide and peroxynitrite.

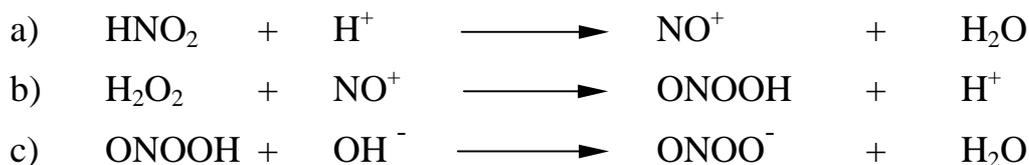
The purine and pyrimidine bases adenine, guanine, cytosine, uracil, and thymine are well suited as partial DNA/RNA structures. This way, the reactions of all reactive species with each DNA/RNA building block can be singled out, investigated and its results compared.

All reactive species (NO, NO<sub>2</sub>, and ONOO<sup>-</sup>) were of highest possible purity. Peroxynitrite had to be prepared since it is not commercially available like NO and NO<sub>2</sub>. From the multitude of possibilities to prepare peroxynitrite as described in this thesis, the following two synthetic routes were applied: The reaction of potassium superoxide (KO<sub>2</sub>) with gaseous NO yields peroxynitrite of higher purity (less impurities, see reaction 1). Reaction 2 enables the relatively fast preparation of higher quantities by employing a quenched-flow reactor with the trade-off of high salt impurities caused by the educts.

Reaction 1: KO<sub>2</sub> reaction with gaseous NO under exclusion of oxygen

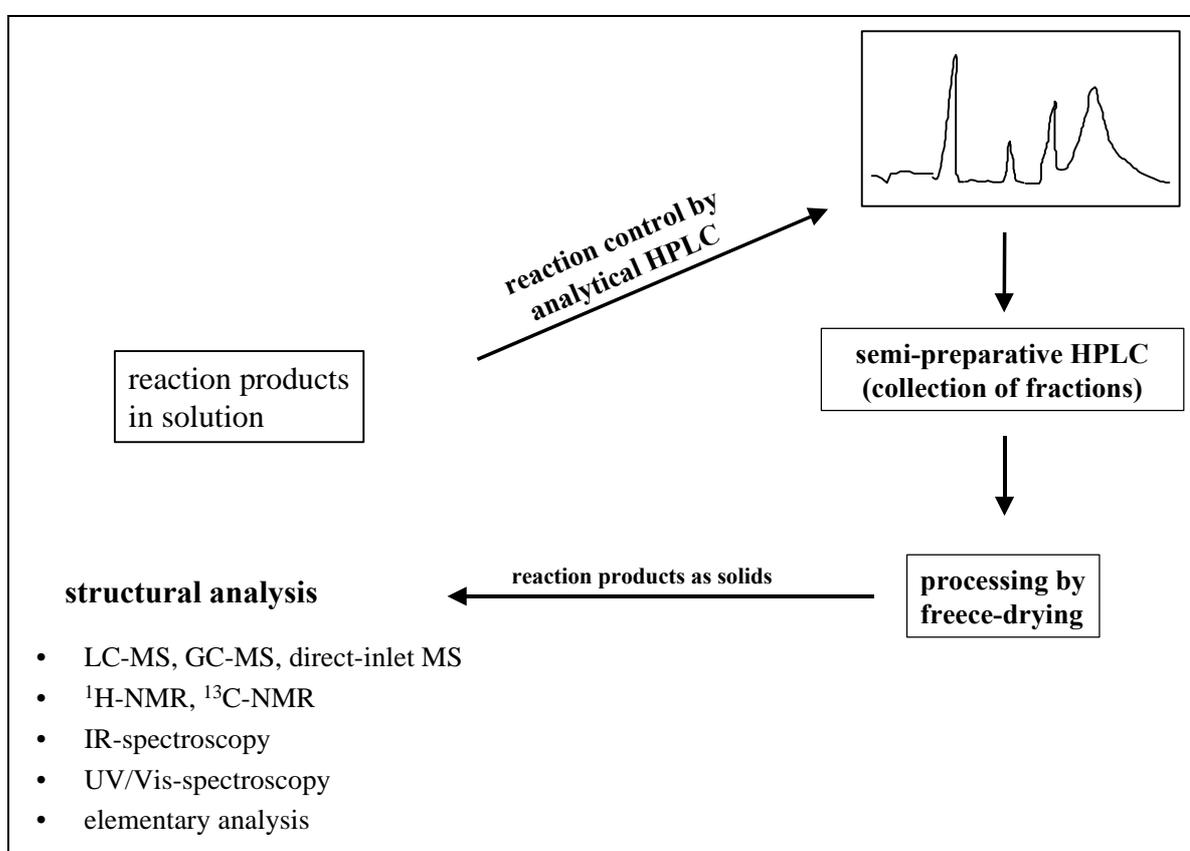


Reaction 2: Hydrogen peroxide reaction with nitrous acid in a quenched-flow reactor



A successful model was developed to analyse the reaction products of purine and pyrimidine bases with all reactive species. Figure 1 shows the schematics of this system.

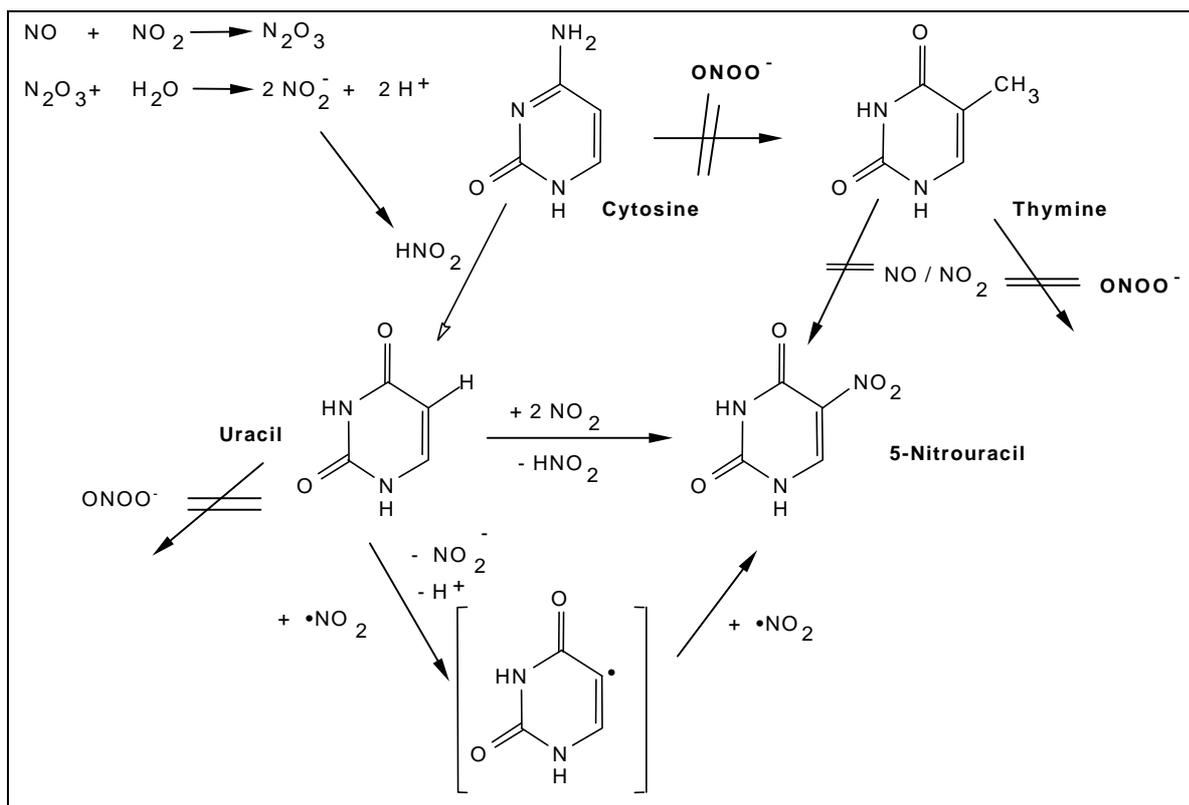
**Figure 1**



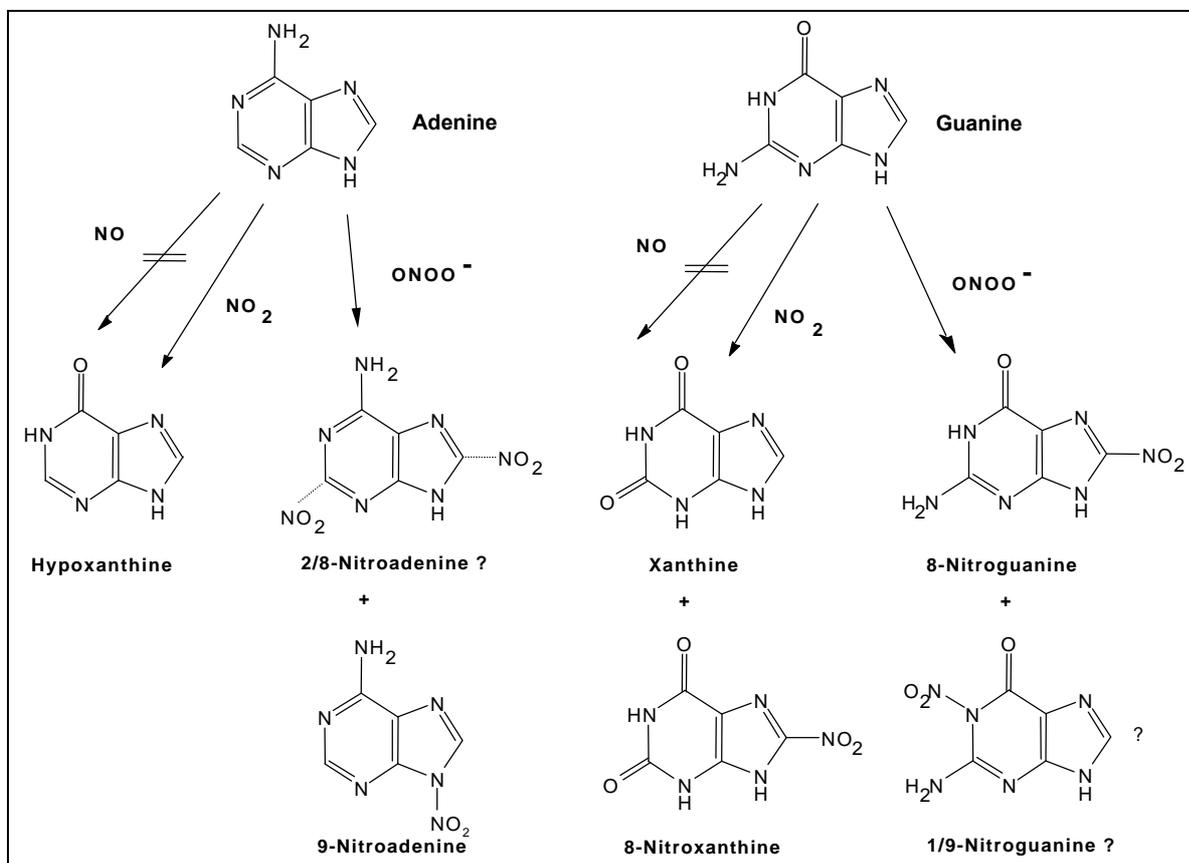
All analytically characterized reaction products are shown in the two figures below (figure 2 and figure 3) and could constitute possible end products of molecular mechanisms during gene toxicity (point mutation). 8-Nitroguanine could be identified as a product and marker of peroxyxynitrite DNA damage for the first time<sup>1</sup>. This conclusion can also be generalized for nitro compounds of adenine on the basis of the results of this work.

<sup>1</sup> Cayman-Chemical catalog 2000, not yet commercially available

**Figure 2 Reactions of pyrimidine bases with reactive species**



**Figure 3 Reactions of purine bases with reactive species**



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Verzeichnis der Geräte und Analysemethoden

#### Elementaranalysen :

**C, H, N :** Heraeus CHN-O-Rapid, Heraeus (Gießen); Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

#### Schmelztemperatur :

Schmelzpunktapparatur nach Linström (unkorrigiert);  
Mettler FP 62 (für klarschmelzende Verbindungen mit einem Schmelzpunkt <300 °C).

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

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Messungen mit diesem Gerät durchgeführt.

Angabe der chemischen Verschiebung in  $\delta$ -Werten (ppm), bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als inneren Standard;

Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration;

ein Nachweis der OH-/NH-Protonen erfolgte durch Austausch mit D<sub>2</sub>O

Abkürzung der durch Spin-Kopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:  
s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

## **<sup>13</sup>C-NMR Spektren :**

Bruker AMX 400 (100,62 MHz);

Bruker AMX 250 P (62,90 MHz);

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Messungen mit dem Bruker AMX 400 (100,62 MHz) aufgenommen.

Angabe der chemischen Verschiebung in  $\delta$ -Werten (ppm), bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als innerer Standard;

die Spektren wurden breitbandenkoppelt und zusätzlich als DEPT-Spektren aufgenommen.

## **IR-Spektren (KBr) :**

1. Perkin Elmer 1600 FTIR;

2. ATI Unicam Genesis Serie FTIR;

Software: WinFIRST Version 2.1.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde für alle IR-Messungen ein KBr Pressling verwendet mit dem ATI Unicam Genesis Serie FTIR gemessen.

## **UV-Spektren**

Philips PU 8730 UV/Vis-Spektralphotometer

Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit einer Dicke von 1 cm vorgenommen. Auf eine Temperierung wurde verzichtet.

## **Dünnschichtchromatographie (DC) :**

DC-Mikrokarten Polygram oder Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel (Düren), 40x80 mm, Schichtdicke 0,25 mm

DC-Alufolien RP-18 F<sub>254s</sub> Merck Art. 1.05560, 50x75 mm

DC-Alufolien Cellulose F254 Merck Art. 5574, 40x80 mm, Schichtdicke 0,1 mm

Alle Untersuchungen wurden über eine Laufstrecke von mindestens 5cm mit Kammersättigung durchgeführt.

## **Einstellung der Pufferlösungen**

Alle Pufferlösungen wurden mit einem Metrohm E 605 pH-Meter (Metrohm Herisau) und einer kombinierten Glaselektrode (Metrohm 6.0203.000) eingestellt. Die Kalibrierung der Glaselektrode erfolgte wöchentlich nach der im DAB 1997, Kapitel V. 6.3.1.<sup>107)</sup> beschriebenen Methode bei 20°C mit:

- Kaliumhydrogenphthalat-Lösung 0,05 M : pH 4,1
- Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung 0,0087 M und  
Natriummonohydrogenphosphat-Lösung 0,0303 M : pH 7,41
- Natriumcarbonat-Lösung 0,025 M und  
Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,025 M : pH 10,01

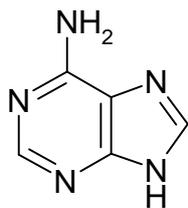
## **Relative Molmassen :**

Relative Atommassen wurden nach der Atomgewichtstabelle von 1964 – bezogen auf <sup>12</sup>C – berechnet.

## **Temperaturangaben :**

Alle Angaben beziehen sich auf °C.

## Adenin



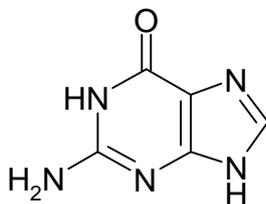
IR [cm<sup>-1</sup>]: 3295 (NH<sub>2</sub>); 3120 (NH<sub>2</sub>); 1670 (C=N); 1601 (C=N)

<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 12,79 (s, 1H, NH); 8,12 (s, 1H,);  
8,10 (s, 1H); 7,09 (s, 2H, NH.); 8,16 (s, 1H, NH)

C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>                      MG: 135,13 g/mol

MS (m/z):                      135,1 ; 108,0 ; 81,0 ; 54,0

## Guanin



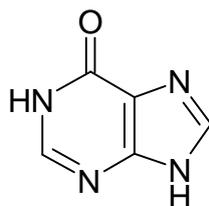
IR [cm<sup>-1</sup>]: 3326 (NH); 3115 (NH); 1701 (C=O), 1670 (C=N)

<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 12,31 (s, 1H, NH); 10,50 (s, 1H, NH);  
7,88 (s, 1H); 7,60 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)

C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O                      MG: 151,13 g/mol

MS (m/z):                      151,1 ; 110,1 ; 109,0 ; 69,0 54,0

## Hypoxanthin



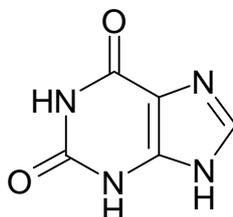
IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3265 (NH); 3134 (NH); 3051 (CH arom.); 1674 (C=O),  
1578 (C=N)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  (ppm) = 12,64 (s, 1H, NH); 8,12 (s, 1H);  
7,98 (s, 1H)

$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$                       MG: 136,11 g/mol

MS (m/z):                      136,1 ; 108,1 ; 81,0 ; 54,0

## Xanthin



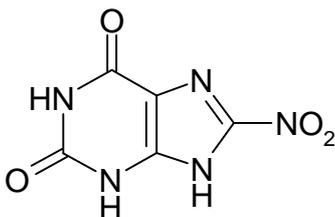
IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3138 (NH); 1701 (C=O); 1654 (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  (ppm) = 13,32 (s, 1H, NH); 11,52 (s, 1H, NH);  
10,83 (s, 1H, NH); 7,93 (s, 1H)

$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$                       MG: 152,11 g/mol

MS (m/z):                      152,1 ; 109,1 ; 97,0 ; 81,0 ; 54,0

## 8-Nitroxanthin



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3296 (NH); 3155 (NH); 1709 (C=O); 1689 (C=O); 1548 (NO<sub>2</sub>);  
1362 (NO<sub>2</sub>)

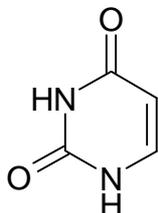
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 12,2 (s, 1H, NH); 10,4(s, 1H, NH);  
7,15(s, 1H, NH)

C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>                      MG: 197,11 g/mol

MS (m/z): 152,1 ; 109,1 ; 97,0 ; 81,0 ; 54,0

UV: λ<sub>max</sub> : 251 nm ; 372 nm (pH 6)

## Uracil



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3111 (NH); 1765 (C=O); 1734 (C=O)

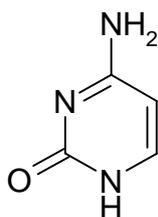
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 11,02 (s, 1H, NH); 10,82 (s, 1H, NH);  
7,39 (d, 1H, J= 7,5 Hz); 5,45 (d, 1H, J=7,5 Hz.)

<sup>13</sup>C-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 164,23 (q); 151,41 (q); 142,10 (CH);  
100,12 (CH)

C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                      MG: 112,1 g/mol

MS (m/z): 112,1 ; 69,1 ; 42,2

## Cytosin



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3387 (NH); 3167 (NH); 1704 (C=O); 1662 (C=N)

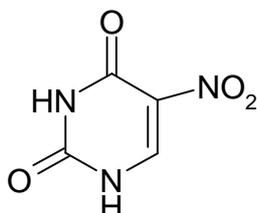
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 10,51 (s, 1H); 7,07 (s, 2H, NH);  
7,32 (d, H, J=7Hz); 5,58 (d, 1H, J=7Hz);

<sup>13</sup>C-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 166,60 (q); 156,81 (q); 142,56 (CH);  
92,43 (CH)

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O                      MG: 111,1 g/mol

MS (m/z):                      111,1 ;    83,2 ;    69,2

## 5-Nitrouracil



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3145 (NH); 1772 (C=O); 1734 (C=O); 1522 (NO<sub>2</sub>); 1323 (NO<sub>2</sub>)

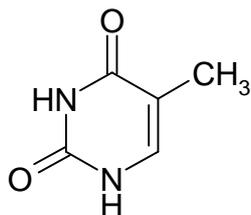
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 12,40 (s, 1H, NH); 11,77 (s, 1H, NH);  
8,86 (s, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 155,36 (q); 149,67 (q); 147,78 (CH);  
125,01(C-NO<sub>2</sub>)

C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>                      MG: 157,1 g/mol

MS (m/z):                      157,1 ;    127,1 ;    98,0 ;    67,0

## Thymin



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3203 (NH); 1734 (C=O); 1674 (C=O)

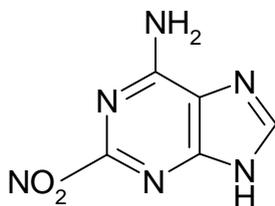
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 11,00 (s, 1H, NH); 10,58 (s, 1H, NH); 7,25 (s, 1H); 1,73 (d, 3H, J= 1Hz)

<sup>13</sup>C-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 164,81 (q); 151,37 (q); 137,60 (CH) 107,55 (q)

C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>                      MG: 126,1 g/mol

MS (m/z):                      126,1 ;    83,1 ;    55,1

## 2-Nitroadenin



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3403 (NH); 3211 (NH); 1630 (C=N), 1596 (C=N), 1566/1348 (NO<sub>2</sub>)

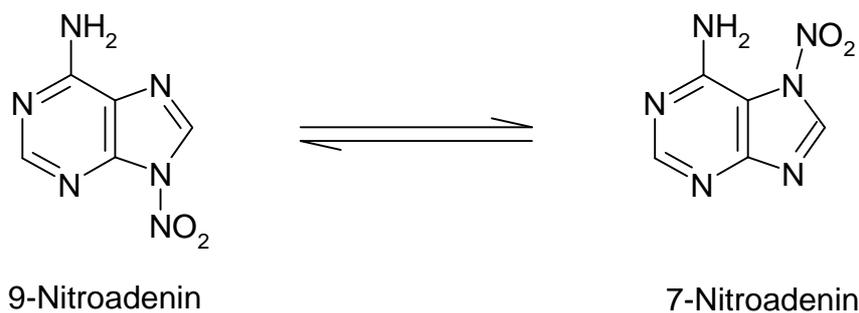
<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 8,36 (s, 1H, NH); 8,03 (s, 1H); 6,69 (s, 2H, NH)

UV:                                      λ<sub>max</sub> : 240 nm ; 357 nm (pH 6)

C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>                      MG: 180,039620 g/mol

MS (m/z):                      180,039520 ;    150,04 ;    123,03    107,03

## 7/9-Nitroadenin



IR [cm<sup>-1</sup>]: 3403 (NH); 2927 (CH); 1678 (C=N); 1536/1359 (NO<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR: (d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) = 13,91 (s, 2H); 8,52 (s, 1H);  
8,47 (s, 1H)

UV: λ<sub>max</sub> : 260 nm ; 315 nm (pH 6)

C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> MG: 180,039520 g/mol

MS (m/z): 180,039520 ; 150,04 ; 134,04 108,04

## HPLC-Parameter 1

Parameter Nr.	Säule Nr.	ë in nm	Flow ml/min	<u>Eluent A</u> Puffer Nr.	<u>Eluent B</u> Methanol
1	1	254 nm	1	97%, Puffer 1	3%
2	2	254 nm	3	Puffer 2 0-3,5 min 95% 4-12,5 min 80% 13-15min 95%	5% 20% 5%
3	3	254 nm	1	90%, Puffer 2	10%
4	2	254 nm	3	90%, Puffer 2	10%
5	3	220-600 nm <sup>1</sup>	0,9	90%, Puffer 3	10%
6	1	230-450 nm <sup>1</sup>	1	95%, Puffer 3	5%
7	3	254 nm	1	Puffer 1 0-3 min 97% 3,5-10,5 min 60% 12-20 min 97%	3% 40% 3%
8	2	254 nm	3	90%, Puffer 1	10%
9	2	0-20,9 min 264 nm 21-30 <sup>2</sup> min, 415nm	2,5	Puffer4 0-11 min 100% 12-28,5 min 95% 28,5-30 min 100%	0% 5% 0%
10	5	230-450 nm <sup>1</sup>	0,6	100% Puffer 5	0%
11	1	230-450 nm <sup>1</sup>	0,8	95%. Puffer 3	5%
12	2	0-18,9 min 330 nm 19-30 <sup>2</sup> min, 264 nm	3	Puffer 3 0-12 min 100% 13-23,6 min 90% 24-30 min 100%	0% 10% 0%
13	1	230-450 nm <sup>1</sup>	1	100%, Puffer 3	0%
14	5	230-450 nm <sup>1</sup>	1	95%	5%

<sup>1</sup> DAD

<sup>2</sup> mit Auto-Zero

Trennsäule Nr. 1 : MN<sup>1</sup> 250/4, Nucleogel 100-5, RP-18  
Trennsäule Nr. 2 : MN Varioprep VP 250/10, Nucleosil 100-7, RP-18  
Trennsäule Nr. 3 : Merck LiChroCART<sup>®</sup> 250-4, LiChrospher<sup>®</sup> 100-5, RP-18  
Trennsäule Nr. 4 : MN CC 250-1, Nucleosil 100-5, C-18  
Trennsäule Nr. 5 : 250-4, Multospher 100-5, C-18

Puffer Nr. 1: 0,01 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 4,5  
Puffer Nr. 2: Wasser Bideest pH3  
Puffer Nr. 3: 0,02 mol/L Ammoniumformiat Puffer, pH 6  
Puffer Nr. 4: 0,02 mol/L Ammoniumformiat Puffer, pH 3,9  
Puffer Nr. 5: 80% 0,005 mol/L Ammoniumformiat Puffer, pH 3,1 20%  
Acetonitril  
Puffer Nr. 6: 0,005 mol/L Ammoniumformiat Puffer, pH 4 +  
5% Methanol-modifier

## HPLC :

**Sytem:** Merck Hitachi La Chrom, Darmstadt  
Niederdruckgradientensystem  
UV-Detektor L-7400  
DAD-Detektor L-7455  
Autosampler L-7200  
Pumpe L-7100  
Solvent Degasser L-7612  
Column Oven L-7350  
Peltier Cooling Module for L-7350/7351  
Fraction Kollektor L-7650

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

---

<sup>1</sup> Macherey Nagel

## HPLC-MS (MassenSpektrometer) Systeme :

### System 1

<b>HPLC</b>	Kontron Instruments, Hochdruckgradientensystem Pumpe 325 D
<b>Software</b>	Kontron Data System, DS 450 MTZ/DAD
<b>MS</b>	VG Plattform II, Fa. Fisons Instruments, Manchester, GB
<b>Parameter Quelle</b>	Capillare 35 KV HV Lens 500 V Cone 65 V Temp. 80 °C drying Gas N <sub>2</sub> 250 L/h nebulising Gas 20 L/h
<b>Parameter MS</b>	LM (Low Mass) Resolution 14,9 units HM (High Mass) Resolution 15,7 units Ion energy 2,0 V Ramp 0,0 V Multiplayer 650
<b>Software</b>	MassLynx 2.1 for Windows Mass Spectrometry Handling System for Windows, Fison Instruments

## System 2

<b>HPLC</b>	HP GmbH, Hewlett Packard Str. 8, 76337 Waldbronn Hewlett Packard Series 1100 Degasser G 1322 A Binäre Pumpe G 1312 A Autosampler G 1313 A UV/Vis Detektor G 1314 A
<b>MS</b>	HP MSD System G 1946 A/1947 A für Elektrospray- und chemische Ionisation
Parameter Quelle	Capillary Voltage 3 KV Corona Current 7 $\mu$ A Vaporizer Temp 400°C drying Gas Temp. 350°C drying Gas N <sub>2</sub> 10 L/h nebulising pressure 50 psig
Parameter MS	LM (Low Mass) Resolution 70 m/z HM (High Mass) Resolution 450 m/z Ion energy 2,0 V Ramp 0,0 V Multiplayer 650
<b>Software</b>	HP Chem Station for GC, LC, CE, AID and LC-MS Version A.06.01

## **Feststoff MS**

**System 1 für EI: MAT 711 der Fa. Finnigan**

Parameter EI (Direkteinlaß):

Emission:	80 eV
Ionenbeschleunigung:	8 kV
Elektronenenergie:	0,8 mA
Ionenquellentemperatur:	150°C
Aufnahmetemperatur:	250°C
Auflösung:	>10000

**System 1 für FAB (pos/neg.): MAT CH5 der Fa. Finnigan MAT**

Parameter FAB (positiv und negativ)

Ionenbeschleunigung:	3 kV:
Reaktionsgas:	Xenon
Auflösung:	>3000

**System 2 für EI: MAT 311A der Fa. Finnigan**

Parameter EI (Direkteinlaß):

Emission:	70 eV
Ionenbeschleunigung:	8 kV
Elektronenenergie:	0,8 mA
Ionenquellentemperatur:	250°C
Aufnahmetemperatur:	250°C
Auflösung:	>10000

**Software :** MASPEC Data System for Windows  
Data Version 2.11, Software Version 14.0

## 6.2 Darstellung von Peroxynitrit

### 6.2.1 „Quenched Flow“ Methode

Bei der „Quenched Flow“ Methode wird acidifizierte Wasserstoffperoxidlösung mit Natriumnitritlösung zur Reaktion gebracht. Da der pKs-Wert von Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) bei 3,3 liegt, wird unter sauren Bedingungen die salpetrige Säure gebildet, welche einen effektiven Nitrosylkationendonator darstellt.

allgemeine Reaktionsgleichung :



Folgende Lösungen wurden hergestellt, auf ca. 2°C gekühlt und in einem von *Beckman* beschriebenen<sup>53)</sup> und etwas modifizierten „Quenched Flow“-Reaktor zur Reaktion gebracht:

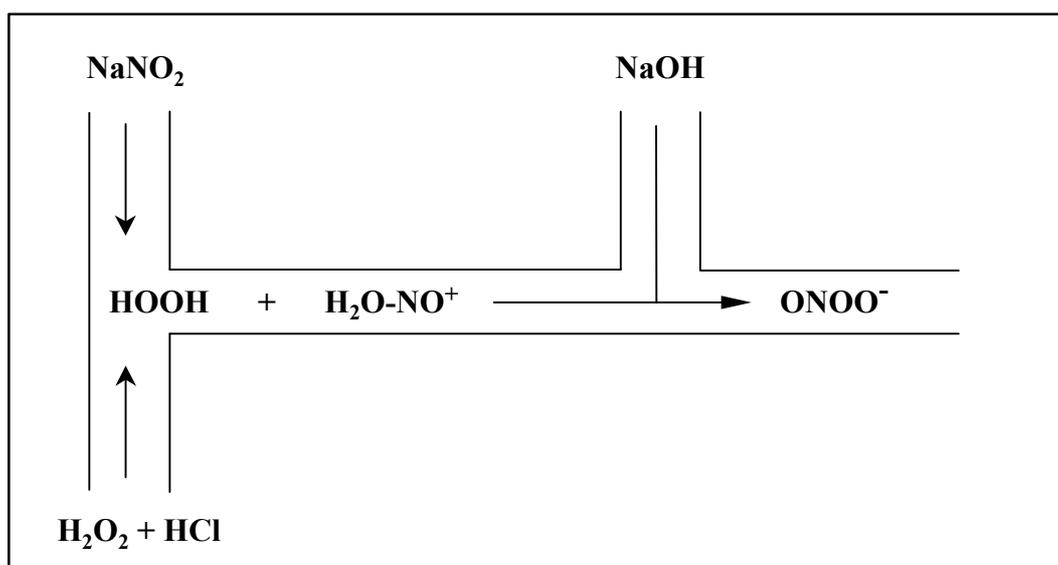
- 0,6 M Natriumnitrit
- 0,6 M Wasserstoffperoxidlösung in 0,7 M Chlorwasserstoffsäure (HCl)
- 1,2 M Natriumhydroxidlösung

Bei allen Reagentien wurde die höchste Reinheit ausgewählt, da vor allem die Kontamination mit Metallionen vermieden werden sollte. Es wurde ausschließlich zweifach demineralisiertes Wasser verwendet (Aqua *bidest*).

Natriumnitrit	Fluka Best.-Nr. 71759 , >99%, puriss. p.a.
Wasserstoffperoxidlsg. 35%	Fluka Best.-Nr. 95299 , puriss. p.a
Chlorwasserstoffsäure 37%	Fluka Best.-Nr. 84422 , puriss. p.a
Natriumhydroxid	Fluka Best.-Nr. 71690 , >98%, puriss. p.a.

Es wurden 41,4g  $\text{NaNO}_2$  pro Liter Aqua *bidest* , 51,5ml bzw. 58,3 g 35%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung in 0,7 M Chlorwasserstoffsäure (59,2 ml bzw. 70g HCl 37%ig pro Liter Aqua *bidest* ) und 48g NaOH pro Liter Aqua *bidest* gelöst. Diese drei Lösungen wurden im Kühlschrank auf 8°C vorgekühlt und vor der Reaktion in 1L Weithalslerlenmeyerkolben im Eisbad auf 2°C gebracht. Über PVC-Schläuche wurden diese Vorratsgefäße mit dem Glasrohrsystem (siehe Abbildung 6.1) miteinander verbunden und zur Reaktion gebracht.

**Abbildung 6.1**



Die Reaktionsstrecke betrug 11 cm, der Durchmesser der Glasrohre 2 mm. Die Fließgeschwindigkeit betrug 600 mL/min pro Weithalslerlenmeyerkolben. Zur Erzeugung einer definierten Fließgeschwindigkeit wurden Schlauchquetschklammern verwendet und ein Unterdruck angelegt, welcher mit einer Vakuumpumpe (Modell Vacuubrand mit frei einstellbarem Unterdruck) erzeugt wurde. Es wurde ein Unterdruck von 50 mbar angelegt. Die maximal zulässige Druckdifferenz wurde mit 10 mbar festgelegt. Nach Öffnen aller Hähne wurden die Reaktionsprodukte in die Abfallflasche geleitet, bis sich eine konstant gelb gefärbte Lösung gebildet hat. Der 3-Wegehahn wurde nun zum Sammelgefäß umgestellt und die Peroxynitrit-Lösung gesammelt.

Um überschüssiges  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus der Lösung zu entfernen, wurde die Lösung anschließend durch eine mit ca. 25 g Mangandioxid ( $\text{MnO}_2$ -granuliert) gefüllte Chromatographiesäule (1,5 cm x 10 cm) geleitet. Zur Entfernung von Metallionen wurde das verwendete  $\text{MnO}_2$  vorher mit Aqua bidest und 0,3 N NaOH gewaschen. Anschließend wurde die Lösung über doppelte Faltenfilter filtriert.

Die Konzentration an Peroxynitrit wurde mit einer UV-Messung bei 302 nm bestimmt ( $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>46)</sup>. Um Extinktionswerte im meßbaren Bereich zu erhalten (max 1,5) wurde die Peroxynitrit-Lösung mit 1,2 M NaOH verdünnt und gegen einen Blindwert von 1,2 M NaOH vermessen. Die Konzentrationen lagen zwischen 90 und 120 mMol/L.

Die so gewonnene Natriumperoxynitritlösung wird in entsprechende Behältnisse abgefüllt und bei  $-25^{\circ}\text{C}$  eingefroren und sind so mehrere Wochen haltbar. Eine Konzentrationsbestimmung ist jedoch vor jeder Umsetzung erforderlich.

### 6.2.2 Reaktion von Kaliumsuperoxid mit Stickstoffmonoxid

Entgegen früheren Veröffentlichungen<sup>64)</sup> ist die Darstellung von Kaliumperoxynitrit ( $\text{K}^+\text{ONOO}^-$ ) über die Reaktion von Kaliumsuperoxid ( $\text{KO}_2$ ) und  $\text{NO}$  möglich, so daß nun ein neuer Weg zur Herstellung von Peroxynitrit zur Verfügung steht. In Anlehnung an eine von *Koppenol*<sup>50)</sup> beschriebene Methode kann  $\text{K}^+\text{ONOO}^-$  in recht hoher Reinheit mit ca 50% iger Ausbeute dargestellt werden.

Es wurden 0,3g gepulvertes Kaliumsuperoxid ( $\text{KO}_2$ ) (Aldrich Best. Nr. 27,890-4) und 5g geglühter trockener Seesand in einen vorher mit gereinigtem Stickstoff (siehe 6.2.3) anaerobisierten Erlenmeyerkolben eingewogen und sofort mit einem Septum verschlossen. Da die Mischung intensiv gerührt werden muß, wurde ein Magnetrührkern verwendet, der den Durchmesser des verwendeten Erlenmeyerkolbenbodens hat. Es war unbedingt darauf zu achten, daß die gesamte Apparatur von Sauerstoff frei ist. Mit einer Gasbürette wurde nun eine äquimolare Menge (50 mL) Stickstoffmonoxid unter kräftigem Rühren mit einer Geschwindigkeit von 2 mL/min mittels einer Edelstahlkanüle in die  $\text{KO}_2$ /Quarzsandmischung eingeleitet. Nach der  $\text{NO}$  Einleitung wird das entstandene  $\text{K}^+\text{ONOO}^-$  mit  $8^{\circ}\text{C}$  kalter 0,01 M Kaliumhydroxidlösung versetzt. Nicht umgesetztes  $\text{KO}_2$  disproportioniert hierbei zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### **Gleichung 13**



Dieses entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, mit  $\text{MnO}_2$  entfernt. Anschließend wird die Lösung zügig in einen im Eisbad stehenden Kolben filtriert und eingefroren oder sofort zur Reaktion gebracht.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, die Extinktion bei 302 nm gemessen.

### 6.2.3 Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Stickstoffdioxid

Stickstoffdioxid wurde aus Druckgasflaschen für die Reaktion bereit gestellt ( $\text{NO}_2$  1.8 von Messer-Griesheim mit 98% iger Reinheit). Alle verwendeten Purin- und Pyrimidinbasen wurden in höchst möglicher Reinheit verwendet und zur Reaktion eingesetzt.

Die entsprechenden Purin- und Pyrimidinbasen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zu einer 0,025 M ( $M = \text{mol/L}$ ) Lösung verdünnt. 50 mL dieser Lösung wurden in einem Dreihalskolben mit Hilfe eines Kontaktthermometers für eine halbe Stunde auf  $37^\circ\text{C}$  temperiert. Um die Reaktion zu starten, wurde über ein Teflonschlauchsystem unter ständigem Rühren solange  $\text{NO}_2$  eingeleitet, bis sich der an einem Anschluß des Kolbens befindliche Gasreservoir (siehe Abbildung 2.6) gefüllt hatte. Nun wurde die Gaszufuhr gestoppt. Die Reaktionszeit betrug jeweils 1 Stunde.

Zur vollständigen Entfernung des restlichen  $\text{NO}_2$  wurde zunächst für 30 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Die Reaktionsmischung wurde anschließend unter kräftigem Rühren mittels Vakuum entgast.

### 6.2.4 Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wurde, wie unter 6.2.3 beschrieben, ebenfalls aus Druckgasflaschen für die Reaktion bereit gestellt ( $\text{NO}$  2.5 von Messer-Griesheim mit 99,5% iger Reinheit). Alle Purin- und Pyrimidinbasen wurden in höchst möglicher Reinheit verwendet.

Im Gegensatz zu der in Abschnitt 6.2.3 beschriebenen Versuchsdurchführung mußte bei der Umsetzung mit  $\text{NO}$  streng auf anaerobe Bedingungen geachtet werden. Dazu war es erforderlich, das gesamte System vor der Reaktion mit einem Inertgas zu befüllen und die Purin- und Pyrimidinbasenlösung durch Stickstoffdurchleitung von gelöstem Sauerstoff zu befreien.

Der dazu verwendete Stickstoff wird durch eine Gasreinigungspatrone (Oxisorb von Messer-Griesheim) geleitet und so von Restfeuchte, vor allem aber von Sauerstoff befreit.

Wie schon unter 6.2.3 beschrieben, wurden 50 mL der 0,025 M Purin- und Pyrimidinbasenlösung in einen Dreihalskolben gefüllt, auf  $37^\circ\text{C}$  temperiert und unter ständigem Rühren durch Beginn der Gaseinleitung zur Reaktion gebracht. Die Reaktionszeit betrug jeweils 1 Stunde.

Nach dem Ende der Reaktionszeit ist der gesamte Ansatz unbedingt von noch gelöstem NO mittels Stickstoffdurchleitung zu befreien.

Die Lösung wurde im Kühlschrank bis zur analytischen Untersuchung aufbewahrt.

### 6.2.5 Reaktionen der Purin- und Pyrimidinbasen mit Peroxynitrit

#### **Methode 1**

Herstellung der Reaktionslösung:

- Die entsprechende Purin- oder Pyrimidinbase - Konzentration 1 mg/mL - wurde in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 gelöst.
- Hinzu kommt eine äquimolare Menge HCl, um die KOH oder NaOH der Peroxynitrit-Lösung (PON-Lösung) zu neutralisieren.

Die Bestimmung der Menge HCl für die Neutralisierung erfolgte vorher mit einer Säure-Base-Titration. Es wurde die Menge 25 % HCl bestimmt, mit der ein pH von 6,2 erreicht werden konnte<sup>1</sup>. Als Indikator wurde Bromthymolblau verwendet (Umschlagsbereich pH 6,0-7,6). Um die Reaktion zu starten, wurde zu 20 mL der Reaktionslösung unter ständigem Rühren ein 5-fach molarer Überschuß von Peroxynitrit hinzugesetzt. Der pH-Wert lag nach der Reaktion zwischen 6,1 und 6,8.

Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einer analytischen RP 18 Säule analysiert, um eventuell entstandene Reaktionsprodukte zu detektieren.

Die Separierung einzelner Produkte wurde mittels semipräparativer HPLC auf einer RP 18 Phase durchgeführt.

Die Umsetzungen wurden im Eisbad bei Temperaturen zwischen 2-4°C durchgeführt.

Herstellung Phosphatpuffer pH 7:

Lösung A: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (14,2 g/L Aqua bidest)

Lösung B: 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (13,6 g/L Aqua bidest)

Um einen 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 zu erhalten, müssen 61,8 mL Lösung A und 38,2 mL Lösung B gemischt werden.

---

<sup>1</sup> Die genaue pH-Wertmessung erfolgte mit einer Glaselektrode.

## **Methode 2**

Herstellung der Reaktionslösung:

- die entsprechende Purin- oder Pyrimidinbase - Konzentration 1 mg/mL wurde in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 (siehe Methode 1) gelöst

Zu 100 mL dieser Reaktionslösung wurden jeweils äquimolare Mengen Peroxynitrit-Lösung mit einer Meßpipette hinzugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 25 %iger HCl von etwa 11,5 auf 7,5 gebracht, einen Augenblick gewartet und dann langsam weiter auf pH 6 gesenkt. Bei pH 6 wurde eine Probe genommen und der HPLC-Analytik zugeführt. Da nach der HCl-Zugabe alles Peroxynitrit zerfallen ist (siehe Abschnitt 2.4.3), wurde erneut die äquimolare Menge Peroxynitrit zugefügt.

Dieses wurde 15 mal wiederholt, so daß letztendlich ein 15-facher Überschuß hinzugegeben wurde.

Der pH-Wert wurde während der Reaktion mit einer Glaselektrode verfolgt und zusätzlich mit Unitest-Indikatorpapier am Ende jeder HCl-Zugabe geprüft. Die Reaktionen wurden im Eisbad zwischen 2-4°C durchgeführt.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1) **Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. und Wood, K. S.,** *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical*, *Circ. Res.* **61**, 866-879 (1987).
- 2) **Marletta, M. A.,** *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*, *Biochemistry* **27**, 8706-8711 (1988).
- 3) **Moncada, S., Herman, A. G. und Vanhoutte, P. M.,** *Endothelium derived relaxing factor is identified as nitric oxide*, *Trends Pharmacol. Sci.* **8**, 365-368 (1987).
- 4) **Moncada, S., Radomski, M. W. und Palmer, R. M. J.,** *Endothelium derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in control of vascular tone and platelet function*, *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2495-2501 (1988).
- 5) **Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. und Moncada, S.,** *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*, *Nature (London)* **327**, 524-526 (1987).
- 6) **Gasco, A., Fruttero, R. und Sorba, G.,** *NO-Donors: An emerging class of compounds in medicinal chemistry*, *Il Farmaco* **51**, 617-635 (1996).
- 7) **Rossaint, R., Busch, T. und Falke, K.,** *Nitric oxide inhalation therapy in acute respiratory distress syndrome: Intended effects and possible side effects*. In:

Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer, ed.), S. 442-453, Academic Press Inc., San Diego 1996.

- 8) **Hibbs, J. B., Taintor, R. R. und Vavrin, Z.,** *Macrophage cytotoxicity: Role of L-Arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite*, Science **235**, 473-476 (1987).
- 9) **Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. und Rachlin, E. M.,** *Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **157**, 87-94 (1988).
- 10) **Eshhar, N., Striem, S., Kohen, R., Tirosh, O. und Biegon, A.,** *Neuroprotective and antioxidant activities of HU-211, a novel NMDA receptor antagonist*, Eur. J. Pharmacol. **283**, 19-29 (1995).
- 11) **Dalkara, T. und Moskowitz, M. A.,** *Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischaemia*. In: Neuroprotective Agents and Cells S. 319-336, 1997.
- 12) **Gerlach, M., Riederer, P. und Youdim, M. B. H.,** *Neuroprotective therapeutic strategies. Comparison of experimental and clinical results*, Biochem. Pharmacol. **50**, 1-16 (1995).
- 13) **Simon, D. K. und Standaert, D. G.,** *Neuroprotective therapies*, Med. Clin. N. Amer. **83**, 509-511 (1999).
- 14) **Moncada, S. und Higgs, A.,** *Mechanism of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway*, N. Engl. J. Med. **329**, 2002-2012 (1993).

- 15) **Stuehr, D. J. und Ikeda-Saito, M.,** *Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases*, J. Biol. Chem. **267**, 20547-20550 (1992).
- 16) **Nathan, C. und Xie, Q.,** *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*, J. Biol. Chem. **269**, 13725-13728 (1994).
- 17) **Heinzel, B.,** *Charakterisierung einer aus Kleinhirn isolierten NO-Synthase*, Dissertation, FU Berlin (1993).
- 18) **Moncada, S. und Higgs, A.,** *The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator*, Hypertension **12**, 365-372 (1988).
- 19) **Schmidt, H. H. H. W.,** *NO, ein endogener Botenstoff und Zellgift*, Med. Monatsschr. Pharm. **17**, 168-185 (1994).
- 20) **Pantopoulos, K. und Hentze, M. W.,** *Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: Direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 1267-1271 (1995).
- 21) **Yee, E. L., Pitt, B. R., Billiar, T. R. und Kim, Y. M.,** *Effect of nitric oxide on heme metabolism in pulmonary artery endothelial cells*, Amer. J. Physiol-Lung Cell M. Ph, Amer. Physiological Soc. **15**, L512-L518 (1996).
- 22) **Roy, B., Lepoivre, M., Henry, Y. und Fontecave, M.,** *Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: Reversible modifications of both subunits*, Biochemistry **34**, 5411-5418 (1995).
- 23) **Pryor, W. A., Church, D. F., Govindan, C. K. und Crank, G.,** *Oxidation of thiols by nitric oxide and*

*nitrogen dioxide: Synthetic utility and toxicological implications*, J. Org. Chem. **47**, 156-159 (1982).

- 24) **Zhao, W. und Ramos, K. S.**, *Inhibition of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes by benzo[a]pyrene and related aromatic hydrocarbons: Role of Ah-receptor-dependent events*, Toxicology **99**, 179-189 (1995).
- 25) **Salgo, M. G., Bermudez, E., Squadrito, G. L. und Pryor, W. A.**, *DNA damage and oxidation of thiols peroxynitrite causes in rat thymocytes*, Arch. Biochem. Biophys. **322**, 500-505 (1995).
- 26) **Didier, M., Bursztajn, S., Adamec, E., Passani, L., Nixon, R. A., Coyle, J. T., Wei, J. Y. und Berman, S. A.**, *DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures*, J. Neurosci. **16**, 2238-2250 (1996).
- 27) **Chen, J., Jin, K. L., Chen, M. Z., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D. A. und Simon, R. P.**, *Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: Implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death*, J. Neurochem. **69**, 232-245 (1997).
- 28) **Rehse, K., Bade, S., Harsdorf, A. und Clement, B.**, *New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, Part 17 - Arylazomidoximes and 3-arylazo-1,2,4-oxadiazol-5-ones*, Arch. Pharm. **330**, 392-398 (1997).
- 29) **Rehse, K. und Herpel, M.**, *New NO-donors with antithrombotic and vasodilating activities, part 19 -*

- Pseudonitroles and their dimeric azodioxides*, Arch. Pharm. **331**, 79-84 (1998).
- 30) **McCord, J. M.**, *Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase*, Science **185**, 529-531 (1974).
- 31) **McCord, J. M., Stokes, S. H. und Wong, K.**, *Superoxide radical as a phagocyte-produced chemical mediator of inflammation*. In: Advances in Inflammation Research (G. Weissmann, ), S. 273-280, Raven Press, New York 1979.
- 32) **Babior, B. M., Kipnes, R. S. und Curnette, J. T.**, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*, J. Clin. Invest. **52**, 741-744 (1973).
- 33) **Badwey, J. A. und Karnovsky, M. L.**, *Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes*, Annu. Rev. Biochem. **49**, 695-726 (1980).
- 34) **Halliwell, B.**, *Production of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical by phagocytic cells: A cause of chronic inflammatory disease?*, Cell Biology International Reports **6**, 529-541 (1982).
- 35) **Crow, J. P. und Beckman, J. S.**, *Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: Footprints of peroxynitrite in vivo*. In: Nitric Oxide - Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications (L. Ignarro und F. Murad, ), S. 17-43, Academic Press, New York 1995.
- 36) **Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M. und Harrison, D. G.**, *Evidence for enhanced vascular*

- superoxide anion production in nitrate tolerance - A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance*, J. Clin. Invest. **95**, 187-194 (1995).
- 37) **van der Vliet, A., O'Neill, C., Cross, C. E. und Halliwell, B.**, *Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanin and thyrosine by peroxynitrite*, FEBS Lett. **339**, 89-92 (1993).
- 38) **Viner, R. I., Ferrington, D. A., Hühmer, A. F. R., Bigelow, D. J. und Schöneich, C.**, *Accumulation of nitrotyrosin on the SERCA 2a isoform of SR Ca-ATPase of rat skeletal muscle during aging: A peroxynitrite-mediated process?*, FEBS Lett. **379**, 286-290 (1996).
- 39) **Douki, T., Cadet, J. und Ames, B. N.**, *An adduct between peroxynitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine*, Chem. Res. Toxicol. **9**, 3-7 (1996).
- 40) **Inoue, S. und Kawanishi, S.**, *Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide*, FEBS Lett. **371**, 86-88 (1995).
- 41) **Vodovotz, Y., Hsing, A., Cook, J. A., Miller, R. W., Wink, D. A., Ritt, D. M., Mitchell, J. B. und Danielpour, D.**, *Qualitative and quantitative analysis of DNA fragmentation using digital imaging*, Anal. Biochem. **250**, 147-152 (1997).
- 42) **Sugiura, Y. und Matsumoto, T.**, *Nucleotide-selective cleavage of duplex DNA by nitric oxide*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **211**, 748-753 (1995).
- 43) **Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K. und Kawanishi, S.**, *8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-*

- 3'sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin*, J. Biol. Chem. **268**, 13221-13227 (1993).
- 44) **Yermilov, V., Rubio, J. und Ohshima, H.**, *Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination*, FEBS Lett. **376**, 207-210 (1995).
- 45) **Pryor, W. A., Cueto, R., Jin, X., Koppenol, W. H., Nguschwemlein, M., Squadrito, G. L., Uppu, P. L. und Uppu, R. M.**, *A practical method for preparing peroxyxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide*, Free Radicals Biol. Med. **18**, 75-83 (1995).
- 46) **Hughes, M. N. und Nicklin, H. G.**, *The chemistry of pernitrites, Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*, J. Chem. Soc. (A), 450-452 (1968).
- 47) **Uppu, R. M., Squadrito, G. L., Cueto, R. und Pryor, W. A.**, *Synthesis of peroxyxynitrite by azide-ozone reaction*. In: Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer, ), S. 311-321, Academic Press Inc., San Diego 1996.
- 48) **Hughes, M. N. und Nicklin, H. G.**, *Autoxidation of Hydroxylamine in alkaline solutions*, J. Chem. Soc. (A) 164-168 (1971).
- 49) **Yagil, G. und Anbar, M.**, *The formation of peroxyxynitrite by oxidation of chloramine, hydroxylamine and nitrohydroxamate*, J. Inorg. Nucl. Chem. **26**, 453-460 (1964).
- 50) **Koppenol, W. H., Kissner, R. und Beckman, J. S.**, *Syntheses of peroxyxynitrite: To go with the flow or on solid*

*grounds?* In: Nitric Oxide, Pt B (L. Packer,), S. 296-302, Academic Press, San Diego 1996.

- 51) **Papée, H. M. und Petriconi, G.,** *Formation and decomposition of alkaline "Pernitrite"*, Nature **204**, 142-144 (1964).
- 52) **Reed, J., Hansel, H. H. und Jolly, W. L.,** *Chemical synthesis with a quenched flow reactor, hydroxytrihydroborat and peroxyxynitrite*, J. Am. Chem. Soc. **96**, 1248-1249 (1974).
- 53) **Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H. und Crow, J. P.,** *Oxidative chemistry of peroxyxynitrite*. In: Oxygen radicals in biological systems. Part C (L. Packer,), S. 229-240, Academic Press, New York 1994.
- 54) **Tsai, J.-H. M., Harrison, J. G., Martin, J. C., Hamilton, T. P., van der Woerd, M., Jablonsky, M. J. und Beckman, J. S.,** *Role of confirmation of peroxyxynitrite-anion in its stability and toxicity*, J. Am. Chem. Soc. **116**, 4115-4116 (1994).
- 55) **Saha, S., Goldstein, S., Cabelli, D. und Czapski, G.,** *Determination of optimal conditions for synthesis of peroxyxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite*, Free Radicals Biol. Med. **24**, 653-659 (1998).
- 56) **Benton, D. J. und Moore, P.,** *Kinetics and mechanism of the foundation and decay of peroxyxynitrous acid in perchloric acid solutions*, J. Chem. Soc. **A**, 3179-3182 (1970).
- 57) **Anbar, M. und Taube, H.,** *Interactions of nitrous acid with hydrogen peroxide and with water*, J. Am. Chem. Soc. **76**, 6243-6247 (1954).

- 58) **Leis, J. R., Pena, M. E. und Rios, A.,** *A novel route to peroxyxynitrite anion*, J. Chem. Soc. 1298-1299 (1993).
- 59) **Lin, K.-T., Xue, J.-Y., Nomen, M., Spur, B. und Y.-K., W. P.,** *Peroxyxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells*, J. Biol. Chem. **270**, 16487-16490 (1995).
- 60) **Uppu, R. M. und Pryor, W. A.,** *Synthesis of Peroxyxynitrite in a two-phase System, Using isoamylxynitrite and hydrogen peroxide*, Anal. Biochem. **236**, 242 (1996).
- 61) **Uppu, R. M. und Pryor, W. A.,** *Biphasic synthesis of high concentrations of peroxyxynitrite using water-insoluble alkyl xynitrite and hydrogen peroxide*. In: Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer,), S. 322-329, Academic Press Inc, San Diego 1996.
- 62) **Petriconi, G. L. und Pape e, H. M.,** *Aqueous solutions of sodium perxynitrite from alkaline hydrogen and nitric oxide*, Can. J. Chem **44**, 977-978 (1966).
- 63) **Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y. und Hirobe, M.,** *Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system*, Anal. Chem. **65**, 1794-1799 (1993).
- 64) **Firsova, T. P. und Filatov, E. Y.,** *Reaction between nitric oxide and potassum superoxide*, Bull. Acad. Sci. USSR **23**, 1338 (1974).
- 65) **Bohle, D. S., Glassbrenner, P. A. und Hansert, B.,** *Synthesis of pure tetramethylammonium peroxyxynitrite*. In: Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer,), S. 302-311, Academic Press Inc, San Diego 1996.

- 66) **Bohle, D. S., Hansert, B., Paulson, S. C. und Smith, B. D.,** *Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxyxynitrite and its characterization as a tetramethylammonium salt*, J. Am. Chem. Soc. **116**, 7423-7424 (1994).
- 67) **Edwards, J. O. und Plumb, R. C.,** *The chemistry of peroxyxynitrite*, Prog. Inorg. Chem. **41**, 599-635 (1994).
- 68) **Plumb, R. C. und Edwards, J. O.,** *Color centers in UV-irradiated nitrates*, J. Phys. Chem. **96**, 3245-3247 (1992).
- 69) **Mahony, L. R.,** *Evidence for the formation of hydroxylradicals in the isomerisation of pernitrous acid to nitric acid in aqueous solution*, J. Am. Chem. Soc. **92**, 5262-5263 (1970).
- 70) **Squadrito, G. L., Jin, X., Uppu, R. M. und Pryor, W. A.,** *Distinguishing reactivities of peroxyxynitrite and hydroxyl radical*. In: Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer.), S. 366-374, Academic Press Inc., San Diego 1996.
- 71) **Alvarez, B., Denicola, A. und Radi, R.,** *Reaction between peroxyxynitrite and hydrogen peroxide: Formation of oxygen and slowing of peroxyxynitrite decomposition*, Chem. Res. Toxicol. **8**, 859-864 (1995).
- 72) **Radi, R.,** *Kinetic analysis of reactivity of peroxyxynitrite with biomolecules*. In: Nitric Oxide, Pt. B (L. Packer.), S. 354-366, Academic Press Inc., San Diego 1996.
- 73) **Squadrito, G. L., Jin, X. und Pryor, W. A.,** *Stopped-Flow kinetic study of the reaction of Ascorbic acid with peroxyxynitrite*, Arch. Biochem. Biophys. **322 No.1**, 53-59 (1995).

- 74) **Beckman, J. S., Wink, D. A. und Crow, J. P.,** *Nitric oxide and peroxynitrite*. In: *Methods in Nitric Oxide Research* (M. Feelisch und J. S. Stamler,), S. 61-70, Wiley, New York 1996.
- 75) **Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B.,** *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. überarbeitete Auflage 1995.
- 76) **Uppu, R. M., Squadrito, G. L. und Pryor, W. A.,** *Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide*, *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 335-343 (1996).
- 77) **Lymar, S. V. und Hurst, J. K.,** *Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity*, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8867-8868 (1995).
- 78) **Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M. und Radi, R.,** *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*, *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49-58 (1996).
- 79) **Stern, M. K., Jensen, M. P. und Kramer, K.,** *Peroxynitrite decomposition catalysts*, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8735-8736 (1996).
- 80) **Groves, J. T. und Marla, S. S.,** *Peroxynitrite-induced DNA strand scission mediated by a manganese porphyrin*, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9578-9579 (1995).
- 81) **Pryor, W. A. und Squadrito, G. L.,** *The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide*

*with superoxide*, Am. J. Physiol.-Lung Cell. M. Ph. **12**, L699-L722 (1995).

- 82) **Coddington, J. W., Hurst, J. K. und Lymar, S. V.**, *Hydroxyl radical formation during peroxy-nitrous acid decomposition*, J. Am. Chem. Soc. **121**, 2438-2443 (1999).
- 83) **Pfeiffer, S., Gorren, A. C. F., Schmidt, K., Werner, E. R., Hansert, B., Bohle, D. S. und Mayer, B.**, *Metabolic fate of peroxy-nitrite in aqueous solution - Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry*, J. Biol. Chem. **272**, 3465-3470 (1997).
- 84) **Merényi, G. und Lind, J.**, *Thermodynamics of peroxy-nitrite and its CO<sub>2</sub> adduct*, Chem. Res. Toxicol. **10**, 1216-1220 (1997).
- 85) **Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. und Freeman, B. A.**, *Apparent hydroxyl radical production by peroxy-nitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 1620-1624 (1990).
- 86) **Koppenol, W., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. und Beckman, J. S.**, *Peroxy-nitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*, Chem. Res. Toxicol. **5**, 834-842 (1992).
- 87) **Koppenol, W. H. und Kissner, R.**, *Can O=NOOH undergo homolysis?*, Chem. Res. Toxicol. **11**, 87-90 (1998).

- 88) **Squadrito, G. L. und Pryor, W. A.**, *The nature of reactive species in systems that produce peroxyxynitrite*, Chem. Res. Toxicol. **11**, 718-719 (1998).
- 89) **Crow, J. P., Spruell, C., Chen, J., Gunn, C., Ischiropoulos, H., Tsai, M., Smith, C. D., Radi, R., Koppenol, W. H. und Beckman, J. S.**, *On the pH-dependet yield of hydroxyl radical products from peroxyxynitite*, Free Radicals Biol. Med. **16**, 331-338 (1994).
- 90) **Koppenol, W. H. und Klasinc, L.**, *Chem. Quant. Biol. Symposium*, Int. J. Quant. **20**, 1-6 (1993).
- 91) **Bartberger, M. D., Olson, L. P. und Houk, K. N.**, *Mechanisms of peroxyxynitrite oxidations and rearrangements: The theoretical perspective*, Chem. Res. Toxicol. **11**, 710-711 (1998).
- 92) **Tsai, J.-H. M., Harrison, J. G., Martin, J. C., Hamilton, T. P., van der Woerd, M., Jablonsky, M. J. und Beckman, J. S.**, *Ab initio and NMR study of peroxyxynitrite and peroxyxynitrous acid: Important biological oxidans*, J. Phys. Chem. **100**, 15087-15095 (1996).
- 93) **Koppenol, W. H.**, *The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite*, Free Radicals Biol. Med. **25**, 385-391 (1998).
- 94) **Goldstein, S., Squadrito, G. L., Pryor, W. A. und Czapski, G.**, *Direct and indirect oxidations by peroxyxynitrite, neither involving the hydroxyl radical*, Free Radicals Biol. Med. **21**, 965-974 (1996).
- 95) **Richeson, C. E., Mulder, P., Bowry, V. W. und Ingold, K. U.**, *The complex chemistry of peroxyxynitrite*

- decomposition: New insights*, J. Am. Chem. Soc. **120**, 7211-7219 (1998).
- 96) **Engelhardt, H. und Hupe, K.-P.**, *Kopplungsverfahren in der HPLC*, GIT Verlag GmbH, 1985.
- 97) **Vogel, M. und Kibat, P.-G.**, *Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie*, Pharm. Ztg. Prisma **1**, 57-67 (1998).
- 98) **Huang, E. C., Wachs, T., Conboy, J. J. und Henion, J. D.**, *Atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. Detection for the separation sciences.*, Anal. Chem. **62**, 713A (1990).
- 99) **Kossel, A. und Steudel, H.**, *Weitere Untersuchungen über das Cytosin*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **38**, 49-59 (1903).
- 100) **Mosselhi, A. und Pfeleiderer, W.**, *Synthesis and properties of 8-nitroxanthine and its N-methyl derivatives*, J. Heterocycl. Chem. **30**, 1221-1228 (1993).
- 101) **Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M. D., Pignatelli, B. und Ohshima, H.**, *Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite in vitro*, Carcinogenesis **16**, 2045-2050 (1995).
- 102) **Ariza, X., Bou, V. und Valarrasa, J.**, *A new route to 15-N-labeled, N-alkyl, and N-amino nucleosides via N-nitration of uridines and inosines*, J. Am. Chem. Soc. **117**, 3665-3673 (1995).
- 103) **Pryor, W. A., Jin, X. und Squadrito, G. L.**, *One- and two-electron oxidations of methionine by peroxy nitrite*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 11173-11177 (1994).

- 104) **Masumoto, H. und Sies, H.**, *The reaction of ebselen with peroxynitrite*, Chem. Res. Toxicol. **9**, 262-267 (1996).
- 105) **Marla, S. S., Lee, J. und Groves, J. T.**, *Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 14243-14248 (1997).
- 106) **Balavoine, G. G. A., Geletii, Y. V. und Benjan, D.**, aus *Nitric Oxide: Biol. Chem. 1*, 1997.
- 107) *Amtliche Ausgabe Deutsches Arzneibuch 1997*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart und und Govi Verlag GmbH, Frankfurt a.M. 1997.

## 8 Anhang: Gefahrstoffe

Nachfolgende, von mir verwendete Reagenzien und Lösungsmittel sind nach Anhang 6 der Gefahrstoffverordnung mit Gefahrensymbolen und Sicherheitsratschlägen versehen.

Lösungsmittel	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
Dimethylsulfoxid	Xi	26
Aceton	F	9-16-2-3.2-33
Chloroform	Xn	36/37
Cyclohexan	F	9-16-33
Dichlormethan	Xn	23.2-24/25-6/37
Diethylether	Xn	22-36/38
Eisessig	C	2-23-26
Ethanol	F	7-16
Ethylacetat	F	16-23.2-29-33
Methanol	T	7-16-24-45
n-Hexan	Xn, F	9-16-24/25-29-51
Petrolether	Xn	9-16-29-33
n-Butanol	Xn	16

Reagenzien	Gefahrensymbole	Sicherheitsratschläge
Salzsäure konz.	C	2-26
Ammoniak 25%ig	C, N	26-36/37/39-45-61
Ameisensäure	C	23.2-26-45
Wasserstoffperoxid	C	3-26-36/37/39-45
Kaliumhydroxid	C	26-37/39-45
Natriumhydroxid	C	26-37/39-45
Natriumnitrat	O, Xn	22-24-41
Natriumnitrit	O, T	45
Natriumsulfat	----	----
Dinatriumhydrogenphosphat	----	----
Kaliumdihydrogenphosphat	----	----
Ammoniumformiat	Xi	26-36
Kaliumsuperoxid	O, C	8-27-36/37/39/-45
Mangan(IV)oxid	Xn	25
Methionin	----	----
Methionisulfoxid	----	----
Mangan(III)tetrakis (4-benzoe-säure)porphyrin	Xn	----
Ascorbinsäure	----	----
Stickstoffmonoxid	T+	45
Stickstoffdioxid	T+	9-26-28.1-36/37/39-45
Adenin	Xn	----
Cytosin	----	----
Uracil	----	----
Thymin	----	----
Guanin	Xi	----
Hypoxanthin	----	----
Xanthin	----	----
5-Nitrouracil	----	----

## 9 Lebenslauf

Name:	Ulrich Riederer
Geburtsdatum:	16.12.1966
Geburtsort:	Zwickau
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Elke Riederer, geb. Lösche Dr. Axel Riederer
09.73 – 07.83	36. Polytechnische Oberschule Berlin- Lichtenberg
09.83 – 07.87	Berufausbildung mit Abitur in Berufsschule Britz/Eberswalde
09.87 – 07.90	Beginn Studium der Lebensmittelchemie an der HU-Berlin (Vordiplom)
10.90 – 01/93	Hauptstudium der Lebensmittelchemie an der TU-Berlin
01/93	Prüfung 1. Staatsexamen
02.93 – 07.94	Arbeit im Labor für Lebensmittel- und Umweltanalytik Dr. Scheutwinkel GmbH Berlin
08.94 – 01.95	1. Teil des prakt. Jahres zum 2. Staatsexamen: Anfertigung einer Arbeit im AK. von Prof. Dr. K. Rubach (TU-Berlin): Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Phenoxy- carbonsäuren in Grundwässern mittels ELISA und GC-MS
02.95 – 07.95	2. Teil des praktischen Jahres im Landesuntersuchungsamt Berlin

- 07.95 Prüfung 2. Staatsexamen der  
Lebensmittelchemie
- 10.95 – 09.96 wiss. Mitarbeiter am Fachbereich Pharmazie  
der FU Berlin
- 10.96 – 12.99 Anfertigung einer Dissertation am Institut für  
Pharmazie der Universität Hamburg unter der  
Leitung von  
Prof. Dr. H.-J. Duchstein