

**Synthese und Untersuchung von  
neuen *N*-Diazeniumdiolaten  
(NONOate)**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Tommy Pozo Vila**

Aus La Paz - Bolivien

Oktober 2005

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

Korreferent: Prof. Dr. Frank-Gerrit Klärner

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Essen unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Rainer Sustmann

angefertigt. Für die interessante Themenstellung, und die mir stets gewährte Unterstützung möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Frank-Gerrit Klärner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich beim gesamten Team des Arbeitskreises und des Instituts für die Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich mich bei Herrn H. Seiffert und Herrn Dr. Korth für die Diskussionen und Ideen. Auf gleicher Weise für die Betreuung, Ideen, Anregungen und nicht selten für die Geduld und wichtige Hilfe möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sustmann bedanken.

Bei Frau B. Krüger bedanke ich mich für die unendliche Geduld und Unterstützung in dieser Zeit.

Für Martha<sup>†</sup> (09.05.2005) und Tomás



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DONATOREN VON STICKSTOFFMONOXID</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>DIAZENIUMDIOLATE</b> .....	<b>7</b>
1.2.1	SYNTHESE VON C-DIAZENIUMDIOLATEN.....	9
1.2.2	C-DIAZENIUMDIOLATE ALS NATURPRODUKTE.....	13
1.2.3	REAKTIVITÄT UND NO-FREISETZUNG AUS C-DIAZENIUMDIOLATEN.....	14
1.2.4	N-DIAZENIUMDIOLATE (NONOATE).....	15
1.2.5	STRUKTUR- UND PHYSIKALISCH-CHEMISCHE MERKMALE DER DIAZENIUMDIOLATE.....	18
1.2.6	REAKTIONEN DER DIAZENIUMDIOLATGRUPPE.....	22
1.2.7	N-DIAZENIUMDIOLATE ALS NO-DONATOREN.....	26
1.2.8	O <sup>2</sup> -SUBSTITUIERTE N-DIAZENIUMDIOLATE ALS NO-DONATOREN.....	28
1.2.9	NEUE ENTWICKLUNGEN IN DER NONOAT-FORSCHUNG.....	30
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>DARSTELLUNG DER GUANIDINIUMSALZE</b> .....	<b>35</b>
3.1.1	SYNTHESE VON BIS-(2-GUANIDINIUMETHYL)-AMINOSULFAT 38.....	38
3.1.2	SYNTHESE VON 2-(2-DIETHYLAMINOETHYLAMINO)-ETHYLGUANIDINIUMSULFAT 40.....	43
3.1.3	UMSETZUNG VON N,N-DIETHYLDIETHYLENTRIAMIN MIT S-METHYLISOTHIOHARNSTOFFSULFAT UND 1 ÄQ. SCHWEFELSAURE <sup>[85-87]</sup> 41.....	48
3.1.4	SYNTHESE VON BIS-(3-GUANIDINIUMPROPYL)-AMINOSULFAT 42.....	52
3.1.5	SYNTHESE VON 1(2-GUANIDINIUMETHYL)-PIPERAZINGUANIDINIUMSULFAT 44.....	56
<b>3.2</b>	<b>DARSTELLUNG DER FREIEN GUANIDINE</b> .....	<b>59</b>
3.2.1	FREISETZUNG DES BIS-(2-GUANIDINETHYL)-AMINS 51 AUS 38.....	61
3.2.2	FREISETZUNG DES 2-(2-DIETHYLAMINOETHYLAMINO)-ETHYLGUANIDINIS 52 AUS 40.....	65
3.2.3	FREISETZUNG DES BIS-(3-GUANIDINPROPYL)-AMINS 53 AUS 42.....	67
<b>3.3</b>	<b>WEITERE SYNTHESSEN</b> .....	<b>70</b>
3.3.1	SYNTHESE VON BIS-(2-DIETHYLAMINOETHYL)-AMIN 54.....	71
3.3.2	SYNTHESE VON BIS-(2-DIMETHYLAMINOETHYL)-AMIN 55.....	75
<b>3.4</b>	<b>SYNTHESE DER GUANIDIN-NONOATE</b> .....	<b>78</b>
3.4.1	UMSETZUNG VON BIS-(2-GUANIDINETHYL)-AMIN MIT STICKSTOFFMONOXID.....	79
3.4.2	DARSTELLUNG DES INTRAMOLEKULAR STABILISIERTEN NONOATS 57.....	85

## INHALTSVERZEICHNIS

## II

3.4.3	SYNTHESE VON 1-[(2-DIETHYLAMINOETHYL)-(2-GUANIDINIUMMETHYL)-AMINO]-DIAZEN-1-IUM-1,2-DIOLAT 58.....	90
3.4.4	SYNTHESE VON BIS-(3-GUANIDINPROPYL)- <i>N</i> -DIAZENIUMDIOLAT 59.....	94
<b>3.5</b>	<b>SYNTHESEN VON NEUEN NONOATEN AUF DIAMIN- UND TRIAMINBASIS .....</b>	<b>99</b>
3.5.1	UMSETZUNG VON <i>N,N'</i> -DIISOPROPYLETHYLENDIAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID.....	99
3.5.2	UMSETZUNG VON <i>N,N'</i> -DI- <i>t</i> -BUTYLETHYLENDIAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID .....	102
3.5.3	UMSETZUNG VON <i>N</i> -(2-AMINOETHYL)-PROPYLAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID.....	105
3.5.4	UMSETZUNGEN VON 54 UND 55 MIT STICKSTOFFMONOXID .....	109
3.5.5	UMSETZUNG VON <i>N,N,N',N'</i> -TETRAETHYLDIETHYLENTRIAMIN 54 MIT STICKSTOFFMONOXID .....	109
<b>3.6</b>	<b>LITERATURBEKANNTE NONOATE .....</b>	<b>113</b>
3.6.1	SYNTHESE VON 1-(2-AMINOETHYL)-PIPERAZIN- <i>N</i> -DIAZENIUMDIOLAT 64 <sup>[57]</sup> .....	113
3.6.2	SYNTHESE VON PIPERAZIN- <i>N</i> -DIAZENIUMDIOLAT 65 <sup>[125]</sup> .....	118
3.6.3	WEITERE SYNTHETISIERTE (LITERATURBEKANNTE) NONOATE .....	123
<b>3.7</b>	<b>UV-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ZERFALL DER NONOATE.....</b>	<b>124</b>
3.7.1	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	129
3.7.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM ZERFALL VON <i>N</i> -DIAZENIUMDIOLATEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM PH-WERT .....	133
3.7.3	UV-UNTERSUCHUNGEN ZUM ZERFALL VON NONOATEN IN ANWESENHEIT VON IONENAUSTAUSCHERN. ....	143
3.7.3.1	Wechselwirkung von 57, 58 und 67 mit dem Poly-(natriumacrylat)-Austauscher 70 .....	144
3.7.3.2	Wechselwirkung von 57, 58 und 67 mit dem Poly-(natriumvinylsulfonat)-Austauscher 71 ....	149
3.7.3.3	Wechselwirkung von 57 und 58 mit Natriumsulfat .....	152
<b>3.8</b>	<b>FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>153</b>
<b>3.9</b>	<b>NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON NONOATEN .....</b>	<b>159</b>
<b>3.10</b>	<b>PRODUKTANALYSE DES ZERFALLS VON NONOATEN.....</b>	<b>167</b>
3.10.1	PRODUKTANALYSE DES ZERFALLS VON 1-(2-AMINOETHYL)-PIPERAZIN- <i>N</i> -DIAZENIUMDIOLAT 64.....	169
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>175</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>179</b>
<b>5.1</b>	<b>ARBEITEN UNTER SCHUTZGAS.....</b>	<b>179</b>
<b>5.2</b>	<b>VERWENDETE GERÄTE UND METHODEN.....</b>	<b>179</b>

<b>5.3</b>	<b>TROCKNUNG DER LÖSUNGSMITTEL .....</b>	<b>183</b>
<b>5.4</b>	<b>ALLGEMEINE VORSCHRIFT ZUR DARSTELLUNG VON GUANIDINVERBINDUNGEN.....</b>	<b>185</b>
5.4.1	DARSTELLUNG VON BIS-(2-GUANIDINIUMETHYL)AMINSULFAT 38.....	186
5.4.2	UMSETZUNG VON <i>N,N</i> -DIETHYLDIETHYLENTRIAMIN MIT <i>S</i> - METHYLISOTHIOHARNSTOFFSULFAT ZU 2-(2-DIETHYLAMINOETHYLAMINO)- GUANIDINIUMSULFAT 40 .....	188
5.4.3	UMSETZUNG VON <i>N,N</i> -DIETHYLDIETHYLENTRIAMIN MIT <i>S</i> - METHYLISOTHIOHARNSTOFFSULFAT UND 1 ÄQ. SCHWEFELSÄURE 41 .....	191
5.4.4	UMSETZUNG VON BIS-(3-AMINOPROPYL)-AMIN MIT <i>S</i> -METHYLISOTHIOHARNSTOFFSULFAT 42 .....	193
5.4.5	UMSETZUNG VON 1-(2-AMINOETHYL)PIPERAZIN MIT <i>S</i> -METHYLISOTHIOHARNSTOFFSULFAT 44.....	195
<b>5.5</b>	<b>FREISETZUNG DER GUANIDINE .....</b>	<b>197</b>
5.5.1	FREISETZUNG VON BIS-(2-GUANIDINETHYL)-AMIN 51 .....	197
5.5.2	FREISETZUNG DES 2-(2-DIETHYLAMINOETHYLAMINO)-ETHYLGUANIDINS 52 AUS 40.....	199
5.5.3	FREISETZUNG DES BIS-(3-GUANIDINIUMPROPYL)-AMINS 53 AUS 42.....	201
<b>5.6</b>	<b>ANDERE AMIN-SYNTHESEN.....</b>	<b>204</b>
5.6.1	SYNTHESE VON BIS-(2-DIETHYLAMINOETHYL)-AMIN 54 .....	204
5.6.2	SYNTHESE VON BIS-(2-DIMETHYLAMINOETHYL)-AMIN 55.....	206
<b>5.7</b>	<b>ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR AUTOKLAVENVERSUCHE ZUR NONOAT-SYNTHESE ...</b>	<b>208</b>
5.7.1	UMSETZUNG VON BIS-(2-GUANIDINETHYL)-AMIN MIT STICKSTOFFMONOXID IN ACETONITRIL/ISOPROPANOL.....	210
5.7.2	UMSETZUNG VON BIS-(2-GUANIDINETHYL)-AMIN MIT STICKSTOFFMONOXID IN ISOPROPANOL .....	213
5.7.3	UMSETZUNG VON 2-(2-DIETHYLAMINOETHYLAMINO)-ETHYLGUANIDIN 52 MIT STICKSTOFFMONOXID UNTER BILDUNG VON 1-[(2-DIETHYLAMINOETHYL)-(2- GUANIDINIUMMETHYL)-AMINO]-DIAZEN-1-IUM-1,2-DIOLAT 58 .....	215
5.7.4	UMSETZUNG VON BIS-(3-GUANIDINIUMPROPYL)-AMIN 53 MIT STICKSTOFFMONOXID.....	217
5.7.5	UMSETZUNG VON <i>N,N'</i> -DIISOPROPYLETHYLENDIAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID.....	219
5.7.6	UMSETZUNG VON <i>N,N'</i> -DI- <i>t</i> -BUTYLETHYLENDIAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID .....	221
5.7.7	UMSETZUNG VON <i>N</i> -2-(AMINOETHYL)-PROPYLAMIN MIT STICKSTOFFMONOXID.....	223
5.7.8	UMSETZUNG VON <i>N,N,N''',N'''</i> -TETRAETHYLDIETHYLENTRIAMIN 54 MIT STICKSTOFFMONOXID .....	225
5.7.9	UMSETZUNG VON 1-(2-AMINOETHYL)-PIPERAZIN MIT STICKSTOFFMONOXID <sup>[57]</sup> .....	227
5.7.10	UMSETZUNG VON PIPERAZIN MIT STICKSTOFFMONOXID <sup>[54, 55, 125]</sup> .....	230
5.7.11	UMSETZUNG VON BIS-(3-AMINOPROPYL)-AMIN MIT STICKSTOFFMONOXID <sup>[57]</sup> .....	233

INHALTSVERZEICHNIS	IV
5.7.12 UMSETZUNG VON DIETHYLENTRIAMIN (DETA) MIT STICKSTOFFMONOXID <sup>[57]</sup> .....	237
<b>5.8 UV- UND FLUORESZENZ-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON NONOATEN....</b>	<b>240</b>
5.8.1 ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR UV- UND FLUORESZENZMESSUNGEN.....	240
5.8.2 VORBEREITUNG DER PHOSPHATPUFFERLÖSUNGEN .....	241
5.8.3 CHARAKTERISIERUNG VON NONOATEN MIT HILFE DER UV-SPEKTROSKOPIE .....	243
5.8.4 UNTERSUCHUNG DES ZERFALLS VON NONOATEN IN ABHÄNGIGKEIT DES PH-WERTES .....	247
5.8.5 UV-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ZERFALL VON NONOATEN (57, 58 UND 65) IN ANWESENHEIT VON IONENAUSTAUSCHERN .....	250
5.8.5.1 Wechselwirkung von 57 mit Poly-(natriumacrylat) 70 .....	251
5.8.5.2 Wechselwirkung von 57 mit Austauscher Poly-(natriumvinylsulfonat) 71 .....	254
5.8.5.3 Wechselwirkung von 57 mit Natriumsulfat .....	256
5.8.5.4 Wechselwirkung von 58 mit Poly-(natriumacrylat) 70 .....	257
5.8.5.5 Wechselwirkung von 58 mit Poly-(vinylsulfonsäure Natriumsalz) 71 .....	259
5.8.5.6 Wechselwirkung von 58 mit Natriumsulfat .....	261
5.8.5.7 Wechselwirkung von 67 mit dem Austauscher Poly-(natriumacrylat) .....	262
5.8.5.8 Wechselwirkung von 67 mit Poly-(natriumvinylsulfonat).....	264
<b>5.9 FLUORESZENZ-MESSUNGEN .....</b>	<b>266</b>
5.9.1 HERSTELLUNG DER FÄNGER- UND ANDEREN VERWENDETEN STAMMLÖSUNGEN .....	267
5.9.2 HERSTELLUNG DER GESÄTTIGTEN WÄSSRIGEN STICKSTOFFMONOXIDLÖSUNG .....	268
5.9.3 BESTIMMUNG DER AUS 64 IN PUFFERLÖSUNG FREIGESetzten MENGE AN STICKSTOFFMONOXID MIT DEM FÄNGER 72 .....	268
5.9.3.1 Kalibrierung der Fluoreszenzmessung.....	268
5.9.3.2 Zerfall von 64 in Anwesenheit des Fängers 72.....	271
5.9.4 BESTIMMUNG DER AUS 57 UND 58 IN PUFFERLÖSUNG FREIGESetzten MENGE AN STICKSTOFFMONOXID MIT DEM FÄNGER 73 .....	272
<b>5.10 PRODUKTANALYSE DES ZERFALLS VON 1-(2-AMINOETHYL)-PIPERAZINDIAZENIUMDIOLAT 64.....</b>	<b>279</b>
5.10.1 ZERFALL UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN .....	279
5.10.2 ZERFALL UNTER AEROBEN BEDINGUNGEN .....	281
5.10.3 NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM ZERFALL VON 64 .....	282
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>287</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>296</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>al.</i>	andere (lat.: <i>alii</i> )
<i>t</i> -Bu	<i>tert.</i> Butyl
cyclo-GMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CysNO	Nitrosocystein
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DEANO	( <i>Z</i> )-1-( <i>N,N</i> -Diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolat Natriumsalz
DETANO	( <i>Z</i> )-1-[ <i>N</i> -(2-Aminoethyl)- <i>N</i> -(2-ammoniummethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPTANO	( <i>Z</i> )-1-[ <i>N</i> -(3-Aminopropyl)- <i>N</i> -(3-ammoniumpropyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
Et	Ethyl
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAB	Fast Atom Bombardement
GAG	Glykosaminoglykan
GTN	Nitroglycerin
GSNO	<i>S</i> -Nitrosoglutathion
IAMN	Isoamylnitrit
ISDN	Isosorbiddinitrat
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
<i>K<sub>s</sub></i>	Dissoziationskonstante einer Säure (Säurekonstante)
MAHMANO	( <i>Z</i> )-1-{ <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -[6-( <i>N</i> -methylammonium)hexyl]amino}-diazen-1-ium-1,2-diolat

Me	Methyl
Methyl-NONOat	( <i>Z</i> )-1-{ <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -[2-( <i>N</i> -methylammonium)ethyl]amino} diazen-1-ium-1,2-diolat
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NONOat	<i>N</i> -Diazeniumdiolat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxide synthase)
PAPANO	( <i>Z</i> )-1-[ <i>N</i> -(3-Ammoniumpropyl)- <i>N</i> -( <i>n</i> -propyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolat
Ph	Phenyl
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
p <i>K</i> <sub>s</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten einer Säure (Säurekonstanten)
PIPENO	( <i>Z</i> )-1-(Piperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat Natriumsalz
ppm	<i>parts per million</i> (Anteil pro 1.000.000)
Pr	Propyl
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -Propyl
PVC	Polyvinylchlorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
SIN-1	3-Morpholino-sydnonimin-Hydrochlorid
SNAP	<i>S</i> -Nitroso- <i>N</i> -acetylpenicillamin
SNP	Natriumnitroprussid, Natriumpentacyanonitrosylferrat (III)
SPERNO	( <i>Z</i> )-1-{ <i>N</i> -[3-Aminopropyl]- <i>N</i> -[4-(3-aminopropylammonium)butyl]-amino} diazen-1-ium-1,2-diolat
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

# 1 Einführung

1980 erbrachte FURCHGOTT<sup>[1]</sup> den Nachweis darüber, dass aus der inneren Zellschicht der Blutgefäße (Endothel) eine Substanz freigesetzt wird, die für die Gefäßerweiterung notwendig bzw. verantwortlich ist. Diese Substanz wurde EDRF (*endothelium derived relaxing factor*) genannt. IGNARRO<sup>[2]</sup> und MONCADA<sup>[3]</sup> identifizierten diesen Botenstoff als Stickstoffmonoxid, ein bis dahin für die Organische Chemie wenig interessantes, für toxisch gehaltenes Gas.

1992 wurde Stickstoffmonoxid von der Zeitschrift Science zum „*molecule of the year*“ ernannt,<sup>[4]</sup> und 1998 erhielten die Wissenschaftler FURCHGOTT, MURAD und IGNARRO den Nobel-Preis für ihre Entdeckungen bezüglich des „NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System“.<sup>[5]</sup>

In lebenden Organismen ist Stickstoffmonoxid an physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt.<sup>[3]</sup> Wie alle unpolaren Gase kann es durch die Zellmembran diffundieren und reagiert im Innern der Zelle mit verschiedenen Zielmolekülen. Als wichtiger intra- und intermolekularer Botenstoff beteiligt sich NO an der Blutdruckregulation. Stickstoffmonoxid verhindert die Blutplättchenaggregation, es ist gleichzeitig ein Botenstoff im zentralen Nervensystem. In der Immunabwehr dient NO als zytotoxischer Stoff der Makrophagen. Unter dem pathophysiologischen Gesichtspunkt verursacht NO Zellschädigungen bei chronischen Entzündungen und Schlaganfällen, es spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer.

Ein möglicher Einsatz von Stickstoffmonoxid in der Krebstherapie als apoptoseinduzierendes Agens wird geprüft. Stickstoffmonoxid wird als diagnostischer Marker bei entzündlichen Erkrankungen benutzt, da es unter diesen Bedingungen in höheren Mengen synthetisiert wird. Körperliche Schädigungen sind mit einer Überproduktion von Stickstoffmonoxid verbunden, auf diese Weise kann es infolge bakterieller Infektionen zu einer enormen Steigerung der Synthese von NO in Leukozyten, z. B. Makrophagen kommen, dessen Zytotoxizität der Abwehr von Bakterien dient. Gleichzeitig wird ein starker Blutdruckabfall ausgelöst, der zum Kreislaufkollaps führen kann.

Stickstoffmonoxid wird aus einem Guanidin-Stickstoffatom der Aminosäure *L*-Arginin durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) enzymatisch gebildet (s. Abb. 1).<sup>[6]</sup>

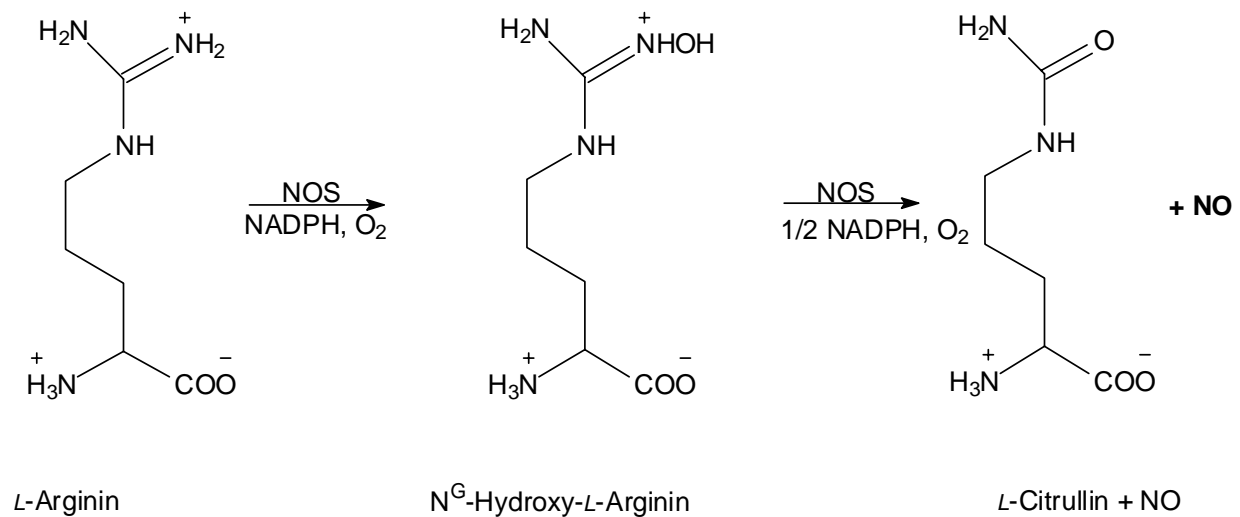


Abb. 1: Biosynthese von Stickstoffmonoxid.

Drei Formen der Stickstoffmonoxid-Synthasen sind in den Makrophagen, Endothelzellen, Hepatozyten und Neuronen nachweisbar, je nach Herkunft und Wirkungsweise werden diese als induzierbare (iNOS), neuronale konstitutive (nNOS) und als endotheliale konstitutive (eNOS) Form bezeichnet. In den verschiedenen Zellen werden unterschiedliche Mengen an Stickstoffmonoxid detektiert. Der Grund dafür sind die verschiedenen NOS-, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-, Redoxfaktor- oder *L*-Arginin-Konzentrationen und Phosphorylierungsraten. Die Rolle des Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin als Kofaktor ist hervorzuheben, da es Elektronen auf das Eisen-Häm-Zentrum des Enzyms überträgt und so die jeweiligen NO-Synthasen im aktiven Zustand erhält. Ohne diesen Kofaktor verhalten sich die NO-Synthasen wie eine NADPH-abhängige Reduktase, und es kann kein *L*-Arginin umgesetzt werden. Falls dem aktiven Zentrum die Aminosäure als Substrat fehlt, katalysieren NO-Synthasen die Umwandlung von Sauerstoff zu Superoxid-Radikalanionen (Abb. 2A). Stickstoffmonoxid wird nur in Anwesenheit von *L*-Arginin gebildet (Abb. 2B). Die Aminosäure wird entweder über einen Kationenkanal oder gebun-

den als Peptid, das unter *L*-Arginin-Freisetzung hydrolysiert wird, in die Zelle transportiert. *L*-Argininsuccinat ist ein *L*-Arginin-Lieferant und wird im Harnstoff-Zyklus aus *L*-Citruillin regeneriert.<sup>[7]</sup>

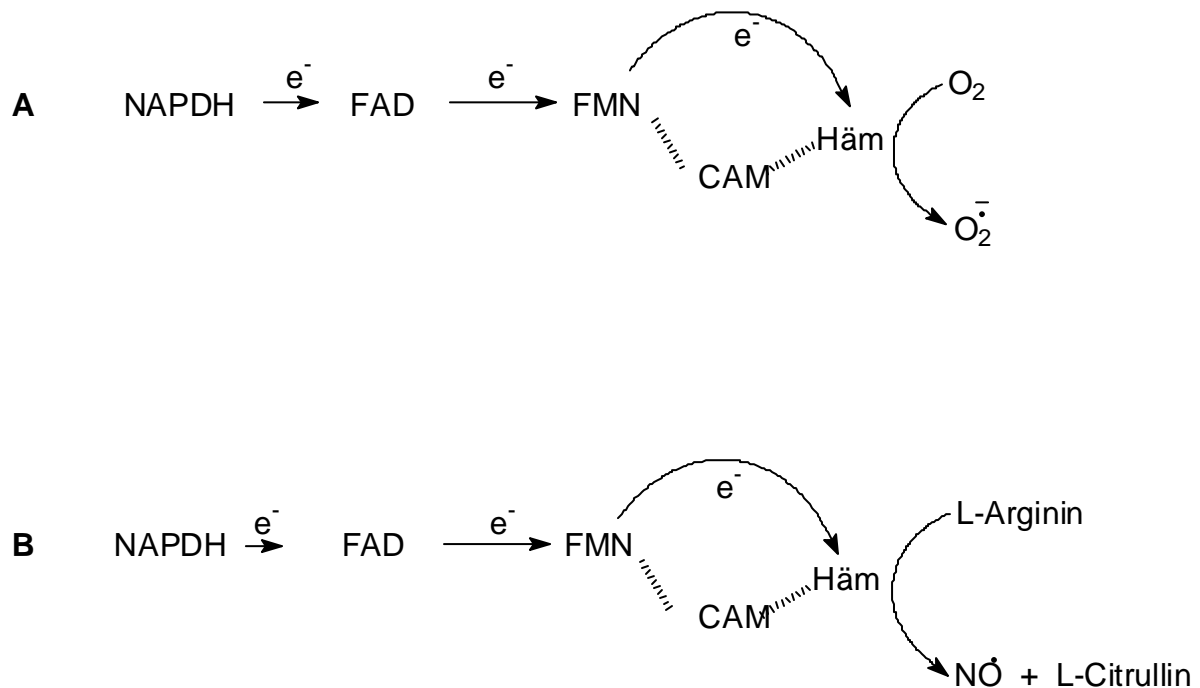


Abb. 2: Reaktion von NOS in Abwesenheit (**A**) und in Anwesenheit (**B**) von *L*-Arginin.

## 1.1 Donatoren von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Funktionen, was zur Entwicklung von NO-freisetzenden Verbindungen geführt hat. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wird eine spezifische Verbindungsart behandelt: die so genannten NONOate. Davor aber eine kleine Übersicht über die verschiedenen NO-Donatoren.<sup>[8-11]</sup>

Nitroglycerin (Glycerintrinitrat) wird seit mehr als hundert Jahren in der Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten benutzt. Insbesondere hat es in der Therapie der koronaren Herzkrankheiten Verwendung gefunden.

Die Wirkung von Nitroglycerin und anderen organischen Nitraten konnte aber erst mit der Entdeckung von Stickstoffmonoxid als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) verstanden werden.

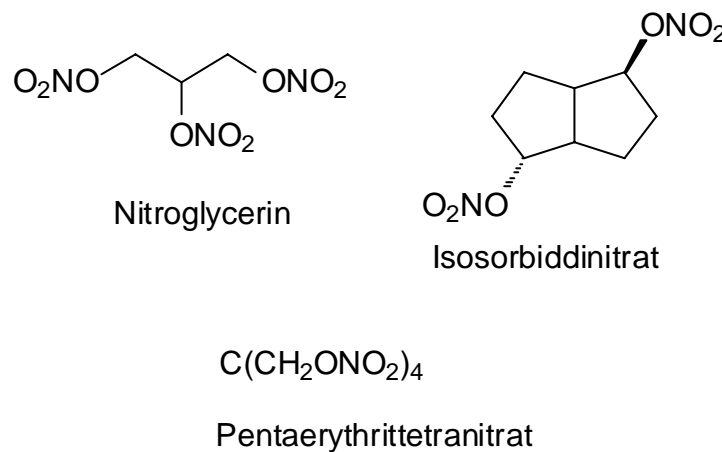


Abb. 3: Einige Stickstoffmonoxid-freisetzende Substanzen.

Anders als die physiologische Stickstoffmonoxid-Bildung aus *L*-Arginin werden Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat sowie Pentaerythritetranitrat im Stoffwechsel auf reaktivem Weg abgebaut. Diskutiert wird dabei sowohl eine Bioaktivierung über Thiole (via Nitrosothiole) als auch eine thiolunabhängige Reduktion über P450-Reduktase bzw. über ein Isoenzym der GST-Familie. Der Nachteil dieser Verbindungen besteht in der Immunisierung (Nitrotoleranz), die sich bei längerer Anwendung entwickelt.

Andere auf reaktivem Weg NO-freisetzende Stoffe wie z.B. die Eisen-Nitroso-Komplexe (z.B. Natriumpentacyanonitrosylferrat (III) Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO], bekannt auch als Natriumnitroprussid, SNP) werden im klinischen Bereich zur Bekämpfung von akutem Bluthochdruck eingesetzt. Das Problem bei der Anwendung dieses Stickstoffmonoxid-Vasodilators ist die zur NO-Bildung parallel verlaufende Cyanid-Abspaltung.

Molsydnonimin **1**, ein therapeutisch als antianginal benutztes Präparat, setzt das Stickstoffmonoxid unter oxidativen Bedingungen frei.

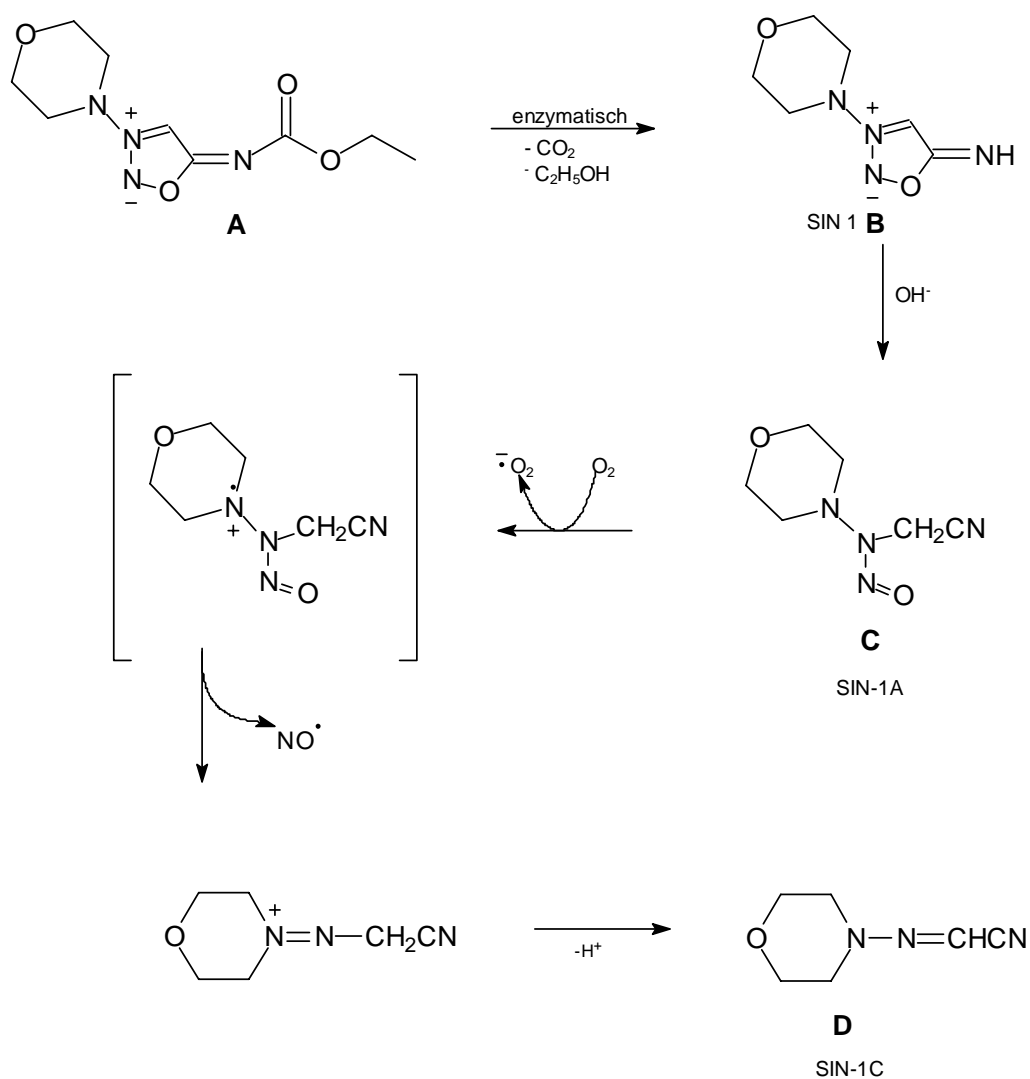
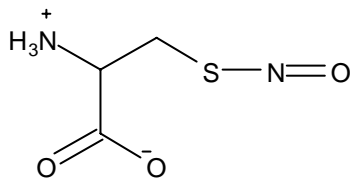


Abb. 4: Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Molsydnonimin **A** unter oxidativen Bedingungen.

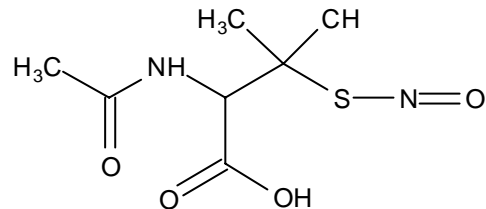
Als erstes wird der Ethoxycarbonylsubstituent des Molsydnonimins **A** enzymatisch hydrolysiert (Abb. 4); dabei entsteht 3-Morpholinosydnonimin **B** (SIN-1), dessen spontane Ringöffnung den aktiven Metaboliten SIN 1A **C** liefert. Dieser zerfällt nach einer Oxidation durch Sauerstoff in Stickstoffmonoxid und das Hydrazon **D**. Als weiteres Produkt wird Superoxid gebildet.

S-Nitrosothiole sind vermutlich bei Freisetzung, Transport und Lagerung von Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen eingebunden. Einige Forscher vermuten sogar, dass S-Nitrosothiole als der eigentliche EDRF fungieren. S-Nitrosocystein und das in fester Form stabile S-Nitroso-N-acetylpenicillamin

(SNAP) zeigen inhibierende Wirkung bei der Blutplättchenaggregation. SNAP hat zusätzlich blutdrucksenkende Eigenschaften. Die S-Nitrosothiole setzen bei ihrer Lösung in physiologischen Puffersystemen spontan bzw. Übergangsmetall-katalysiert Stickstoffmonoxid frei. Die Reaktionsprodukte deuten auf eine homolytische Spaltung der S-N-Bindung hin. Der Zerfall wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst wie z.B.: biologisches Material, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffdruck, Redoxverbindungen, die Anwesenheit von Nucleophilen und von Übergangsmetallionen, z.B. Eisen und Kupfer.



S-Nitrosocystein



S-Nitroso-N-acetylpenicillamin

*Abb. 5: S-Nitrosocystein und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin zeigen inhibierende Wirkung bei der Blutplättchenaggregation.*

Anhang 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Stickstoffmonoxid-Donatoren,<sup>[12]</sup> ihre Eigenschaften und Handhabung.

## 1.2 Diazeniumdiolate

Der Bedarf<sup>[13]</sup> an Stickstoffmonoxid-Donatoren wuchs in den letzten Jahren rasant. Es gibt wenige Substanzklassen, die in der Lage sind, NO direkt zu generieren. Zu diesem ausgewähltem Kreis gehört die Familie der *N*-Diazeniumdiolate (NONOate), eine Unterklasse der Diazeniumdiolate.

Diazeniumdiolat-Verbindungen wurden schon im vorigen Jahrhundert synthetisiert und untersucht.<sup>[14, 15]</sup> Es gibt eine Reihe von Verbindungen, die die Diazeniumdiolat-Gruppe tragen. Die Nomenklatur hingegen wurde erst in den letzten Jahren eindeutig festgelegt.<sup>[16]</sup> Bis dahin kannte man sie unter verschiedenen Bezeichnungen wie Isonitramine, Nitrosohydroxylamine, Alkoxydiazene-*N*-Oxide, NO-Adukte oder NO-Komplexe aus der Umsetzung von Metallalkylen mit NO. Abb.6 erläutert die aktuelle Nomenklatur dieser Verbindungen. Es sind zwei Resonanzstrukturen möglich. Die Diazen-Bezeichnung bezieht sich auf die N=N-Doppelbindung, die „ium“-Bezeichnung auf das positiv geladene Stickstoffatom und die „diolat“-Bezeichnung auf die zwei negativ geladenen Sauerstoffatome. Je nach Atom X, das die funktionelle Gruppe trägt, bezeichnet man diese Teilchen als C-, O-, oder *N*-Diazeniumdiolate. Die Bezeichnung beruht auf Röntgenstruktur-Analysen, aus denen hervorgeht, dass diese Moleküle einen erheblichen N-N-Doppelbindungscharakter besitzen. Aus diesen Untersuchungen kann man auch ersehen, dass die Resonanzstruktur **1** dominiert. Die beiden Sauerstoffatome stehen *cis* zueinander. Das Stickstoffatom, das an dem X-Atom gebunden ist, bekommt die Zahl 1, so dass man diese Teilchen als „Diazen-1-ium-1,2-diolate“ bezeichnen kann.

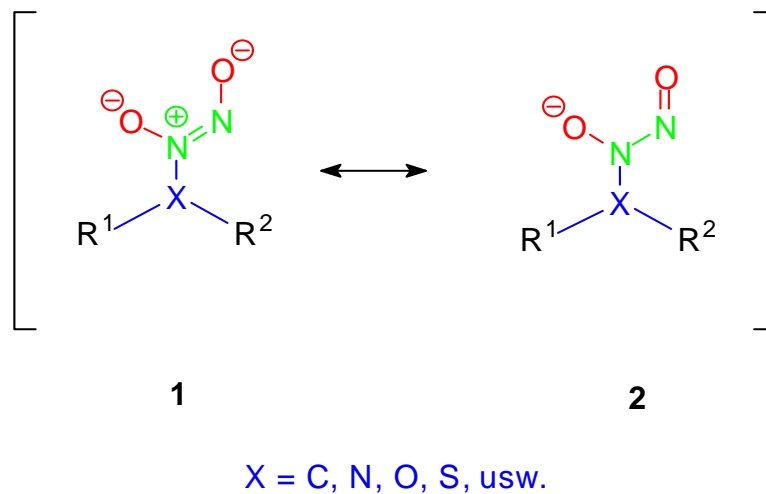


Abb. 6: Resonanzstrukturen der Diazeniumdiolat-Gruppe.

Die Diazeniumdiolat-Gruppe kann sowohl am  $O^1$  als auch am  $O^2$ -Atom substituiert werden. Es resultieren dann die Strukturen **3** und **4**. Die Strukturen **2** und **4** könnte man auch als Nitrosohydroxylamine auffassen. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff „C-Diazeniumdiolat“ für die an einem C-Atom sitzende funktionelle Gruppe verwendet, analog dazu wird der Begriff N-Diazeniumdiolat, bzw. „NONOat“ für die Verbindungen verwendet, bei denen X ein Stickstoffatom ist.

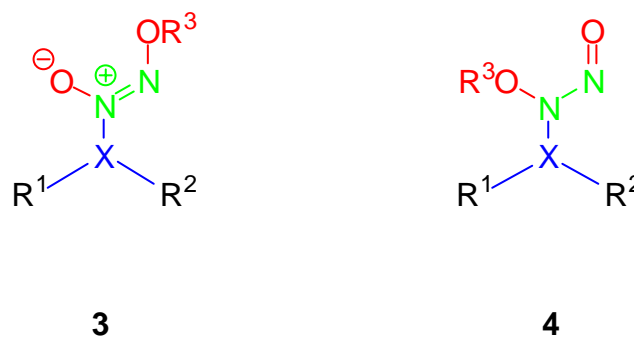
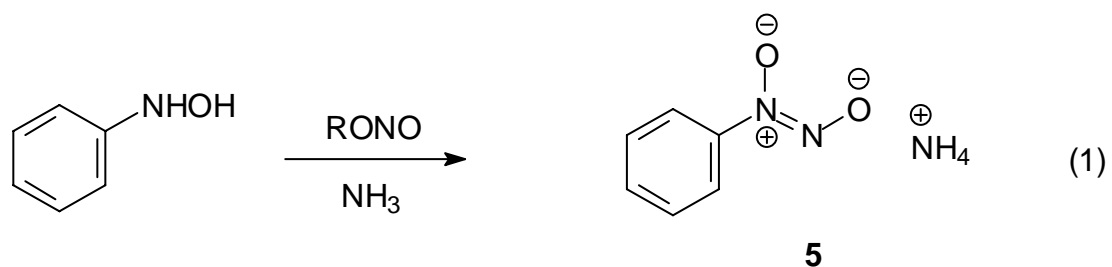


Abb. 7: Am Sauerstoffatom substituierte Diazeniumdiolate.

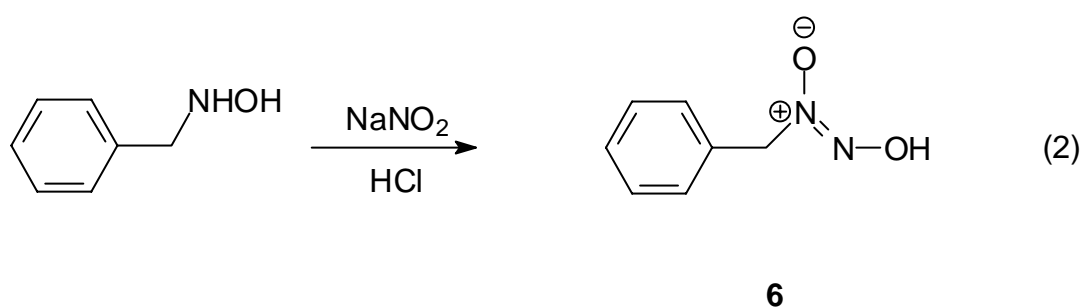
### 1.2.1 Synthese von C-Diazeniumdiolaten

C-Diazeniumdiolate können nach verschiedenen Verfahren synthetisiert werden. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Verbindungsklasse ist Cupferron **5**. Dieses Molekül kann Metalle komplexieren<sup>[17]</sup> und findet eine breite Anwendung in der analytischen Chemie.<sup>[18]</sup>

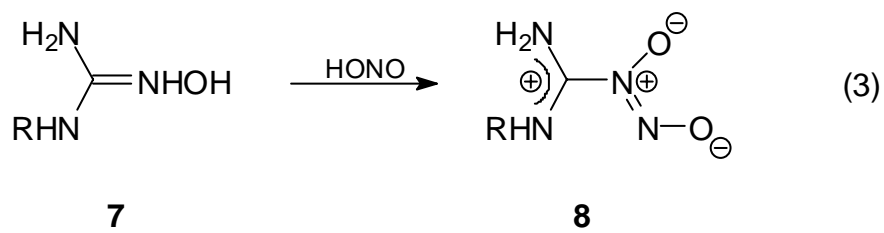
Die Synthese erfolgt auf unterschiedlichen Wegen, wobei die Nitrosierung von Hydroxylaminen in Ammoniak eine klassische Methode darstellt.



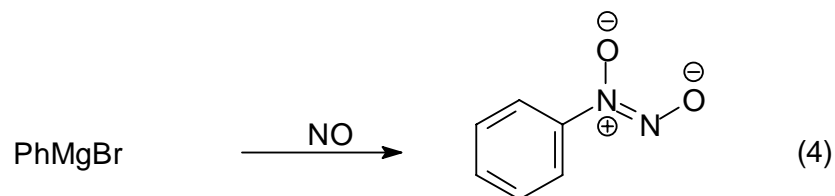
Man arbeitet meistens im Basischen, weil diese Verbindungen säureempfindlich sind. Dennoch ist es auch möglich, im Säuren zu arbeiten. Hierbei erhält man die „freie Säure“ **6**.



Eine andere Methode zur Darstellung von C-Diazeniumdiolaten stellt die Nitrosierung von Oximen dar. Diese Methode wurde angewandt, um Oxim-Derivate von Terpenen<sup>[19]</sup> umzusetzen und dient neuerdings zur Umsetzung von Hydroxylguanidin-Derivaten<sup>[20]</sup> **7**.



Eine weitere Methode zur Darstellung dieser Moleküle ist die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Grignard-Reagenzien.<sup>[21, 22]</sup> Diese Reaktion ist präparativ von besonderer Bedeutung.



Reaktionen von Carbanionen oder Carbanion-Äquivalenten führen ebenfalls zu den C-Diazeniumdiolaten. Das älteste und bekannteste Beispiel hierfür wurde vor über 100 Jahren von TRAUBE<sup>[23]</sup> erwähnt. Er beschrieb die Reaktion von Verbindungen mit aciden Protonen mit Stickstoffmonoxid in Anwesenheit von starken Basen. Bei der als „TRAUBE-Reaktion“ bekannten Umsetzung wird z. B. ein Keton in Anwesenheit von NaOMe umgesetzt. Das entstandene Enolat-Ion reagiert mit Stickstoffmonoxid unter Erzeugung des Zwischenproduktes **9**. Dieses Teilchen bildet dann unter Solvolyse das Ester- und das Traube-Produkt **10**.

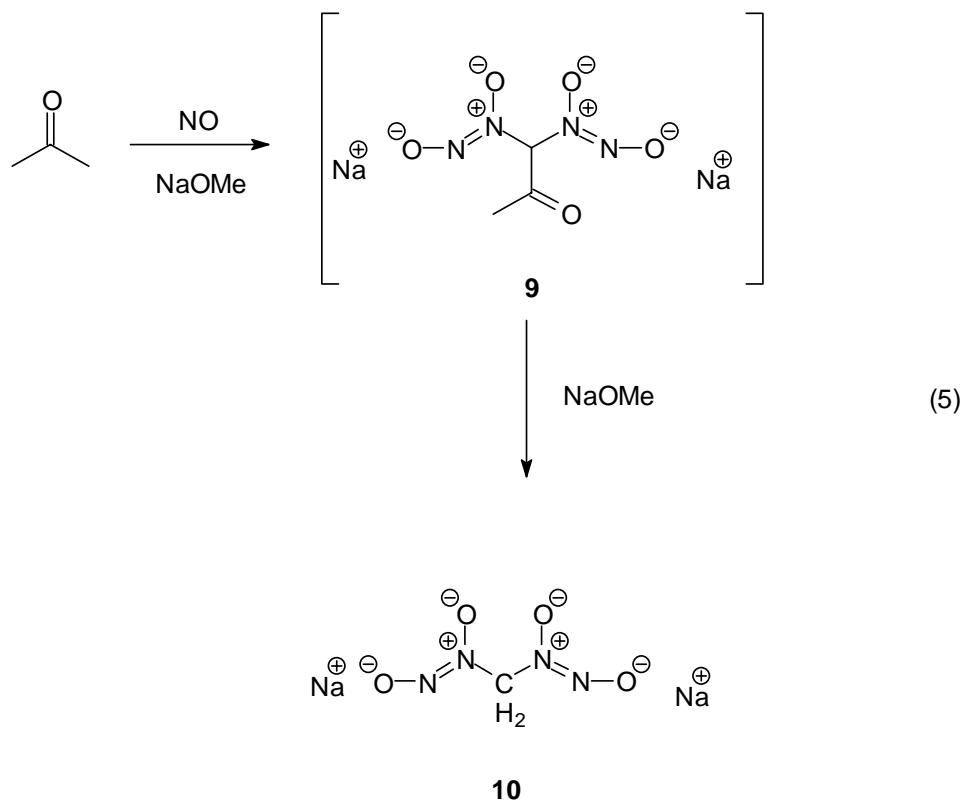
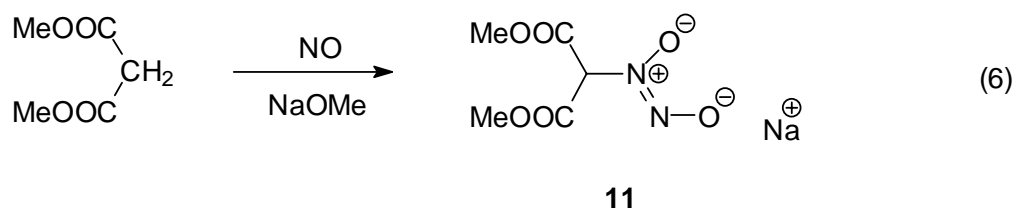
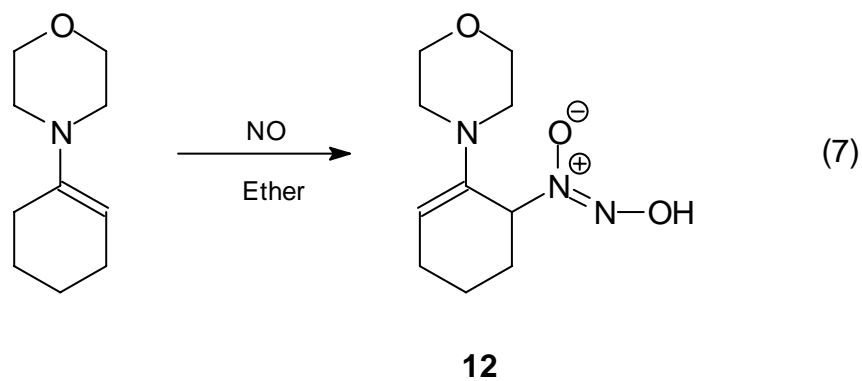


Abb. 8: Beispiel für eine sog. „TRAUBE“-Reaktion.

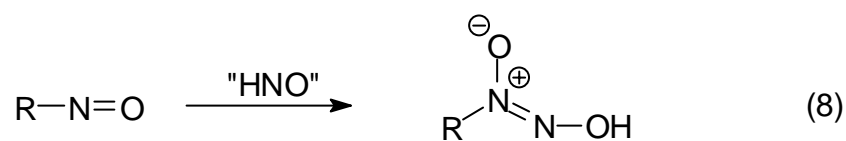
Diese Methode hatte an präparativer Bedeutung verloren, bis eine russische Arbeitsgruppe die Darstellung von C-Diazeniumdiolaten aus Malonestern<sup>[24-26]</sup> (s. Gl. 6) und einer Reihe von Ketonen<sup>[27-29]</sup> beschrieb, die damals nicht erwähnt worden war.



Relativ neu ist auch die Reaktion von Enaminen mit Stickstoffmonoxid<sup>[30]</sup> in Diethylether. Enamine sind neutrale Verbindungen, die als Carbanionäquivalente dienen. Sie gehen Traube-ähnliche Reaktionen ein und bilden Produkte wie **12**.

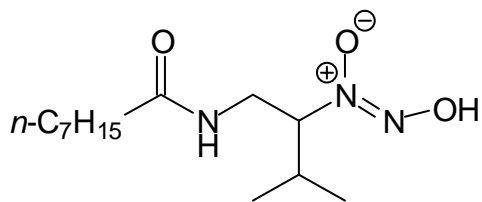


Ein letztes Beispiel ist die Umwandlung von C-Nitrosoverbindungen, wenn sie mit HNO (Nitroxyl) reagieren. HNO kann auf verschiedene Weisen erzeugt werden. Ein klassisches und breit angewandtes Beispiel ist die Erzeugung von HNO aus dem sog. „Angeli´s Salz“, ein O-Diazeniumdiolat. *In situ* erzeugtes HNO wird von Nitrosobenzol unter Bildung von Cupferron gefangen.<sup>[31]</sup> Diese Reaktion erklärt die Bildung von Diazeniumdiolaten bei der Photolyse von Nitrosaminen in Anwesenheit von Olefinen.<sup>[32-34]</sup> Dabei wird durch Addition des Nitrosamins an das Olefin eine C-Nitrosoverbindung gebildet, an die sich dann durch Photolyse aus dem Nitrosamin freigesetztes HNO anlagert. Sie erklärt auch die Bildung von C-Diazeniumdiolaten bei der Reaktion von Monoalkylhydroxylaminen mit Stickstoffmonoxid.<sup>[35]</sup>

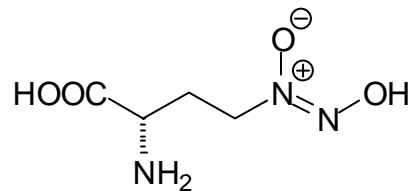


### 1.2.2 C-Diazeniumdiolate als Naturprodukte

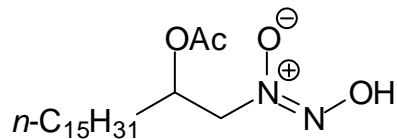
In der Natur kommt eine relativ geringe Anzahl von Diazeniumdiolaten vor. Sie sind alle C-Diazeniumdiolate (s. Abb. 9) und liegen in der protonierten Form vor.



Fragin



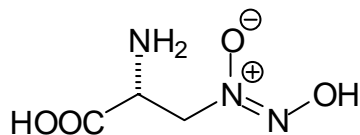
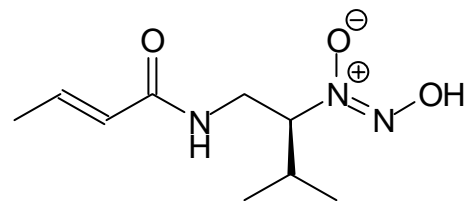
Homoalanosin



Poecillanosin

Abb. 9: Einige in der Natur vorkommende C-Diazeniumdiolate.

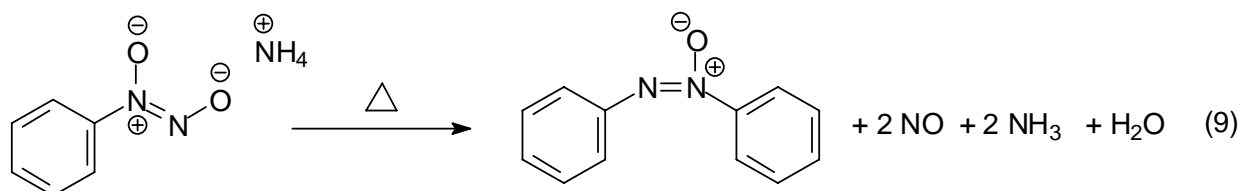
Das bekannteste Beispiel ist das Antitumor-Antibiotikum Alanosin<sup>[36]</sup> **13**. Die Verbindung Dopastin<sup>[37]</sup> **14** wiederum besitzt die Eigenschaft, als Blocker der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase<sup>[38]</sup> zu fungieren.

**13****14**

### 1.2.3 Reaktivität und NO-Freisetzung aus C-Diazeniumdiolaten

Im Rahmen der Thematik dieser Arbeit sind Reaktionen von Interesse, die zur NO-Freisetzung führen. Einige „ausgesuchte“ Vertreter dieser Verbindungsklasse können unter physiologischen Bedingungen über alternative Reaktionswege als NO-Donatoren fungieren.

Die meisten C-Diazeniumdiolate jedoch sind keine NO-Donatoren. Die Hydrolyse dieser Verbindungen führt im Allgemeinen zur Bildung von HNO, welches rasch unter Bildung von N<sub>2</sub>O (Distickstoffoxid) dimerisiert. Daneben werden auch die entsprechenden C-Nitrosoverbindungen gebildet. Ein möglicher Mechanismus dieser Zersetzungsreaktion wird in der Literatur diskutiert.<sup>[39]</sup> Viele Cupferron-Derivate setzen Stickstoffmonoxid durch enzymatische Oxidation frei,<sup>[40-42]</sup> ähnlich wie es O<sup>1</sup>-alkylierte C-Diazeniumdiolate auch tun.<sup>[43, 44]</sup> Bei thermisch oder photochemisch induzierter NO-Freisetzung tritt wohl eine bimolekulare Reaktion, wie in Gl. 9 beschrieben, ein. Diese Reaktion ist vermutlich gemeint, wenn man von Cupferron-Derivaten als „spontanen“ NO-Donatoren spricht.



Zwei Arbeitsgruppen fanden heraus, dass *para*-<sup>[45]</sup> und in einer Reihe von weiteren Fällen auch *ortho*-Substitution<sup>[46]</sup> am Ring die Freisetzung von NO erleichtern kann.

Die neuesten NO-generierenden Verbindungen wurden bereits erwähnt (s. Kap. 1.3.1). Die Vorläufer-Moleküle sind Enamine (s. Gl. 7), Phenolate,<sup>[47]</sup> Nitrile<sup>[48]</sup> und *N*-Hydroxyguanidine<sup>[12]</sup> (s. Gl. 3). Die Mechanismen, die zur NO-Freisetzung führen, scheinen komplizierter als eine einfache Solvolyse zu sein. Eine stöchiometrische Freisetzung von Stickstoffmonoxid wurde nicht beobachtet.

In letzter Zeit sind C-Diazeniumdiolate wieder von besonderem Interesse, weil sie bei der Zersetzung keine potenziell giftigen Nitrosamine bilden.

#### 1.2.4 *N*-Diazeniumdiolate (NONOate)

Wie eingangs erwähnt sind *N*-Diazeniumdiolate eine relativ junge Verbindungsklasse, bei der die Diazeniumdiolat-Gruppe an ein Stickstoffatom gebunden ist.

Ab 1960 synthetisierten DRAGO *et. al.*<sup>[49-53]</sup> die ersten *N*-Diazeniumdiolate, ausgehend von Diethylamin und einer Reihe von anderen Aminen. Fast zum gleichen Zeitpunkt patentierte REILLY<sup>[54, 55]</sup> seine Arbeiten. Er berichtete zum ersten Mal über *O*<sup>2</sup>-alkylierte *N*-Diazeniumdiolate. Diese Verbindungsklasse wurde lange Zeit ignoriert, denn Stickstoffmonoxid hatte zu diesem Zeitpunkt einen eher geringfügigen Stellenwert in der Organischen Chemie. Ein reges Interesse wurde schließlich geweckt, als der Bedarf an NO-Donatoren innerhalb kurzer Zeit rasant wuchs. Anfang der 90er Jahre wurde die Arbeitsgruppe von KEEFER *et. al.*<sup>[56]</sup> auf diese Verbindungen aufmerksam und synthetisierte und patentierte eine Reihe von *N*-Diazeniumdiolaten als potenzielle NO-Donatoren.<sup>[57]</sup> *N*-Diazeniumdiolate sind im Vergleich zu den C-Diazeniumdiolaten nicht so stabil, und sie wurden noch nie in ihrer protonierten Form (freie Säure) isoliert. *N*-Diazeniumdiolate sind in der Lage, Stickstoffmonoxid direkt freizusetzen.

*N*-Diazeniumdiolate können hauptsächlich in drei Varianten vorkommen: als intramolekular stabilisiertes Salz **15**, als Alkali-Salz **16** oder als intermolekular stabilisiertes Ammoniumsalz **17**.

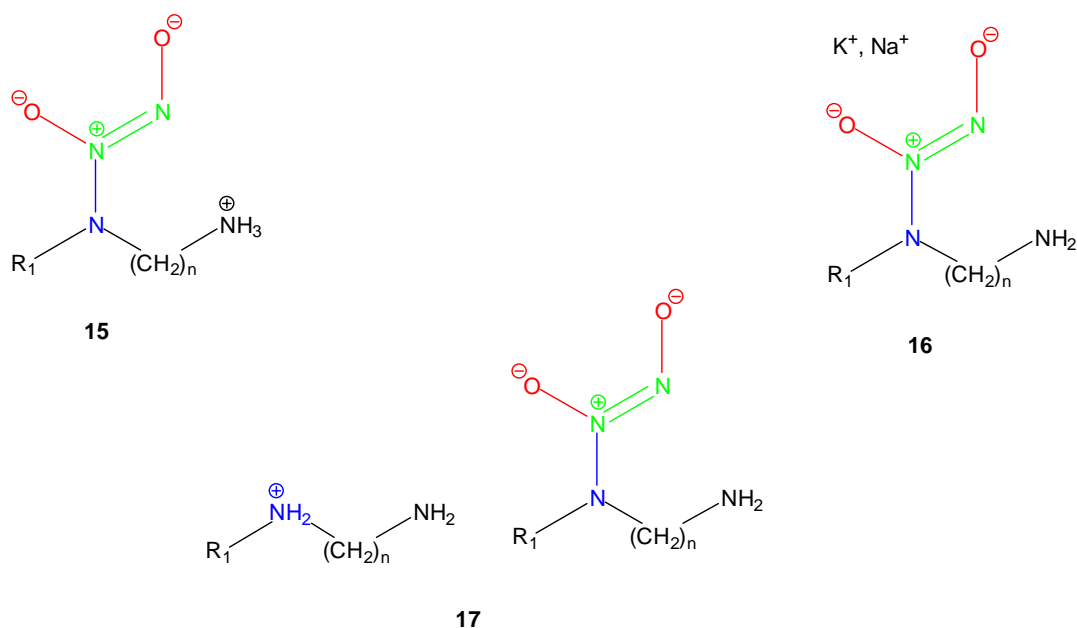


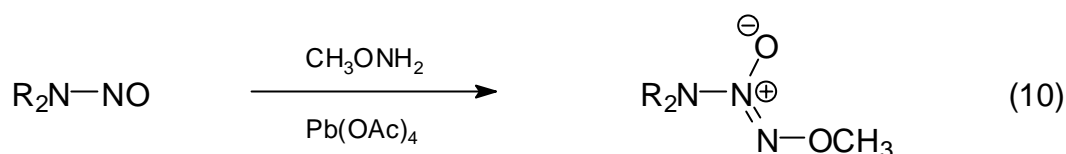
Abb. 10: Strukturen der isolierten N-Diazeniumdiolat-Formen.

Das Entstehen dieser Salze bei der Synthese hängt von mehreren Faktoren ab, nämlich von der Natur desamins, des Lösungsmittels, der Temperatur und dem Druck. KEEFER *et. al.* postulierten 1993<sup>[57]</sup> einen groben Zusammenhang zwischen verwendetem Lösungsmittel und erhaltener NONOat-Klasse. Diese Regel besagt, dass die Tendenz zur Bildung des intramolekular stabilisierten Salzes steigt, je protischer das Lösungsmittel ist. Intermolekular stabilisierte Salze entstehen bei der Umsetzung in Diethylether bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alkalisalze können dagegen auf zwei Wegen entstehen: entweder durch direkte Umsetzung mit Stickstoffmonoxid in Anwesenheit von Base (NaOMe oder NaOEt) oder durch Metathese ausgehend von anderen NONOaten.

Präparativ gibt es zwei klassische Varianten zur Darstellung von N-Diazeniumdiolaten: bei der Hochdruck-Variante wird das Amin in einem aprotischen Lösungsmittel wie Acetonitril oder THF gelöst. Die Umsetzung findet im Autoklaven bei einem Druck von 4 - 8 hPa, Raumtemperatur und über einen Zeitraum von 18 - 24 h statt. Hierbei entsteht bevorzugt das intramolekular stabilisierte Salz. Bei der Kältevariante hingegen wird das in Diethylether gelöste Amin auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Diese Mischung wird dann mit Stickstoffmonoxid gesättigt und das System langsam auf Raumtemperatur erwärmt. In diesem Fall ent-

steht ausschließlich das intermolekular stabilisierte Salz. Alkalisalze werden nach beiden Verfahren synthetisiert.

Eine andere Variante stellt die Reaktion von *O*-Nitrenen mit der Nitroso-*N*-Bindung von Nitrosaminen dar.<sup>[58]</sup>



In neueren Studien<sup>[59]</sup> wird der von DRAGO *et. al.*<sup>[52, 53, 60]</sup> postulierte Bildungs/Dissoziationsmechanismus von NONOaten modifiziert und diskutiert. Danach geschieht die Addition von Stickstoffmonoxid an sekundäre Amine in einem mehrstufigen Prozess und wird durch einen nucleophilen Angriff des Amins auf ein NO-Molekül gestartet. Im darauf folgenden Schritt kommt es zur Addition des zweiten NO-Moleküls. Der Einsatz einer starken Base ermöglicht die Deprotonierung unter Bildung des NONOats. Die treibende Kraft ist die Bildung des Salzes, das als Niederschlag ausfällt und so dem Gleichgewicht entzogen wird.

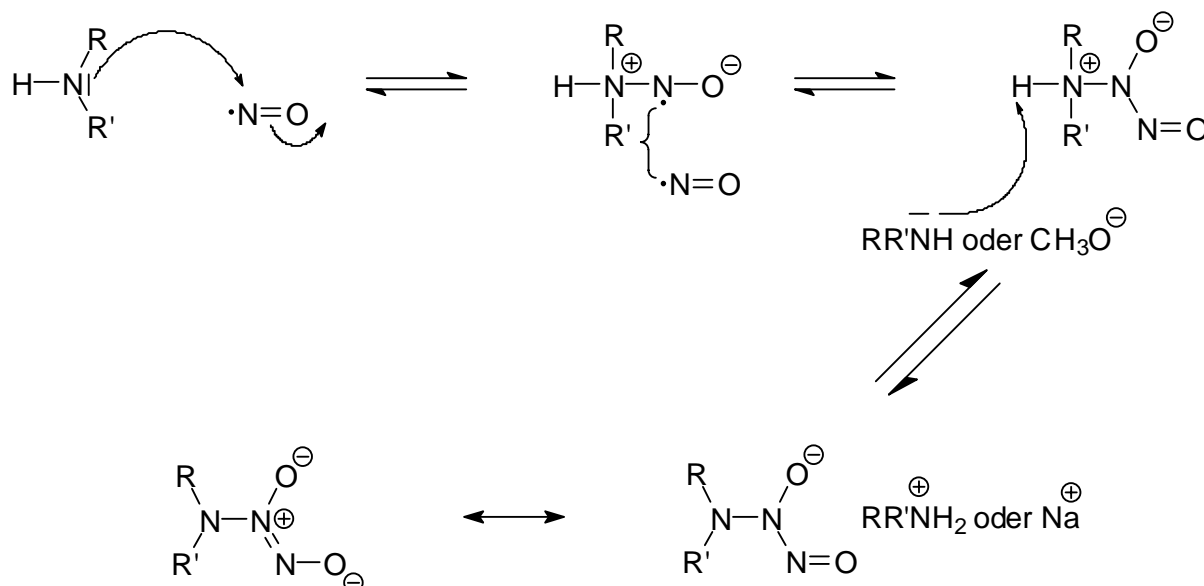


Abb. 11: Bildungs/Dissoziationsmechanismus von NONOaten.<sup>[59]</sup> Modifizierte Variante des von DRAGO *et. al.*<sup>[52, 53, 60]</sup> postulierten Mechanismus.

### 1.2.5 Struktur- und physikalisch-chemische Merkmale der Diazeniumdiolate

Umfangreiche Literatur ist über die chemischen und physikalischen Merkmale der funktionellen Diazeniumdiolat-Gruppe  $X[N(O)NO]^-$  vorhanden. Eine relativ neue Arbeit<sup>[61]</sup> vergleicht unterschiedlich substituierte Diazeniumdiolate miteinander (s. Abb. 12).

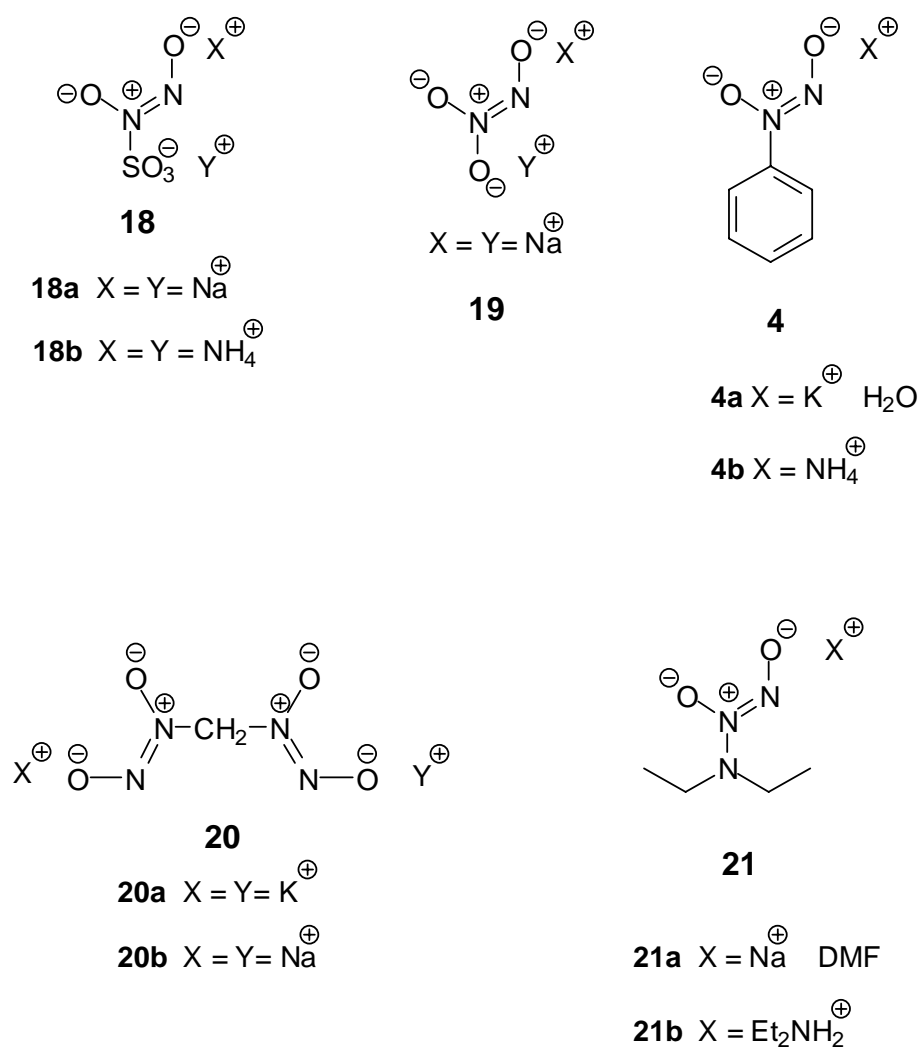


Abb. 12: Einige der in der Literatur untersuchten Diazeniumdiolate.

Es sind Röntgenstrukturanalysen dieser Verbindungen, sowohl für das intermolekular stabilisierte als auch für das Alkalisalz vorhanden, jedoch nicht für

das intramolekular stabilisierte Salz. Sämtliche Analysen zeigen, dass die funktionelle Gruppe planar ist. Sie ist außerdem für sich selbständig, d.h. es gibt keine Wechselwirkungen zwischen der Diazeniumdiolat-Gruppe und dem freien Elektronenpaar der tragenden Aminofunktion.

Wie schon anfangs erwähnt, befinden sich die Sauerstoffatome immer cis zueinander, wobei diese Konfiguration vom Rest X unabhängig ist. Die N-N-Bindung besitzt einen erheblichen Doppelbindungscharakter. In **21a** und **21b** findet man keinen Hinweis auf eine mögliche Konjugation zwischen dem N-Atom und der funktionellen Gruppe. Die gefundenen Werte zeigen eine gewisse Ähnlichkeit zu Heteroatom substituierten Dialkylaminen.

Wasserstoffbrückenbindungen und ihre Wechselwirkungen wurden für die Ammoniumkationen in **18b** und **4b**, das Diethylammonium-Ion in **21b** und das Wasser in **4a** untersucht. In **18b** und **4b** sind die O<sup>1</sup>- und O<sup>2</sup>-Akzeptoren äquivalent in ihrer Bindungsstärke, während es in **21b** zwei starke H-Brückenbindungen zu O<sup>2</sup> und eine einfache schwächere H-Brückenbindung zu O<sup>1</sup> gibt. Die Wechselwirkungen in **21b** könnten zu einer Vergrößerung des terminalen N-O-Abstandes und gleichzeitig zu einer Verkürzung der N<sup>1</sup>-N<sup>2</sup>- und N<sup>1</sup>-O<sup>1</sup>-Abstände führen.

Alle aufgeführten Verbindungen wurden auch mit Hilfe der Raman- und IR-Spektroskopie untersucht. Für Verbindung **21** sind drei Banden von Interesse (s. Abb. 13). Sie wurden mittels Isotopenmarkierung charakterisiert.

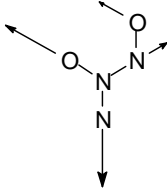
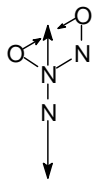
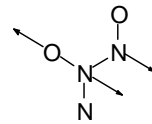
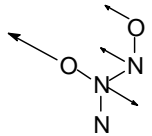
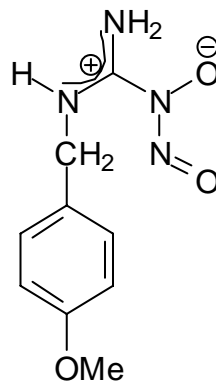
	"in plane" symmetrische Valenzschwingung	<b>21a</b> 952.2 (14.4) [935.8 (18.0)]	
		<b>21b</b> 972.2 (8.1) [958.4 (13.4)]	
	"in plane" symmetrische Valenzschwingung	<b>21a</b> [1215.8 (19.8)]	
		<b>21b</b> [1153.3 (21.8)]	
	O-N-N-O symmetrische Valenzschwingung	<b>21a</b> 1384.4 (44.4) [1359.3 (46.7)] <b>21b</b> 1381.5 (34.6) [1375.1 (33.6)]	
			O-N-N-O Deformationsschwingung
			O-N-N-O asymmetrische Valenzschwingung

Abb. 13: IR- und Raman-Banden für die Diazeniumdiolat-Gruppe der Verbindungen **21a** und **21b**. Die Werte in eckigen Klammern sind die Werte für die Raman-Banden. Die Werte in Klammern stellen die Abweichungen zu den Banden der mit Isotopen gemessenen Spektren dar.

Die UV-Spektren der Verbindungen **4** und **18** - **21** sowie die von  $\text{Me}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$  zeigen, dass der  $\text{X}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Chromophor eine relativ intensive Bande bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} = 248 - 250 \text{ nm}$  besitzt. Die Banden könnten einen  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang beschreiben (weder das HOMO, noch das LUMO des  $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Fragments zeigen nennenswerte Wechselwirkungen mit den Orbitalen der Gruppe X). Der bathochrome Effekt (Rotverschiebung, „red-shift“) von 8 - 9 nm, der bei **18** und **20** beobachtet wird, könnte durch einen „through-space-Stark-Effekt“ erklärt werden.

Während diese Daten eine geringe elektronische Wechselwirkung zwischen dem  $X[N(O)NO]^-$ -Fragment und dem Sulfo-, Oxo (Oxido)- und Dialkylamino-substituenten andeuten, zeigt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 284$  nm für **4**, dass eine Konjugation im angeregten Zustand denkbar ist. Die Bande bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 322$  nm für das Zwitterion **22** (Rotverschiebung  $> 70$  nm im Vergleich zu dem  $NONO^-$ -Chromophor) zeigt, dass hier eine Delokalisierung tatsächlich stattfinden kann.

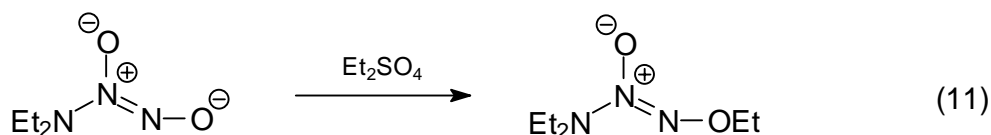
**22**

*N*-Diazeniumdiolate können mit Hilfe der UV-Spektroskopie nachgewiesen werden. Sie besitzen eine charakteristische Absorptionsbande bei einer maximalen Wellenlänge zwischen 248 und 253 nm. Die molaren Extinktionskoeffizienten schwanken zwischen 6000 und 10000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Der spontane Zerfall dieser Teilchen in wässrigen Systemen ist „säurekatalysiert“ und somit pH-abhängig. Er folgt stets einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung.

### 1.2.6 Reaktionen der Diazeniumdiolatgruppe

Analog zu den C-Diazeniumdiolaten kann man zum einen die  $O^2$ -substituierten *N*-Diazeniumdiolate synthetisieren. Zum anderen kann man, sofern vorhanden, die freie Aminfunktion an interessanten Stellen anbringen. Anhand von einigen Beispielen werden die neuesten solcher „geschützten“  $O^2$ -Verbindungen diskutiert.

Bis jetzt sind nur  $O^2$ -substituierte *N*-Diazeniumdiolate bekannt. Dieser Befund stellt eine Vereinfachung in der Synthese dar, da es zu keiner Isomerenmischbildung kommen kann. REILLY<sup>[54, 55]</sup> synthetisierte die ersten alkylierten Verbindungen entsprechend der Reaktionsgleichung 11, mit Ethyl, *n*-Butyl oder Benzyl. Die einfachen  $O^2$ -alkylierten *N*-Diazeniumdiolate sind in der Regel thermisch- und luftstabile Substanzen. Weitere Umsetzungen wurden in den 1990er Jahren mit einfachen Alkylierungsmitteln wie Alkylsulfaten<sup>[62]</sup> (s. Gl. 11), Epoxiden,<sup>[62]</sup> Alkylhalogeniden<sup>[62]</sup> und Arylhalogeniden<sup>[63, 64]</sup> durchgeführt. In letzter Zeit wurden auch höher funktionalisierte Alkylhalide<sup>[65-67]</sup> verwendet.



Ziel der Alkylierung ist der Schutz der funktionellen Gruppe, die je nach Verwendung selektiv entschützt werden kann, so dass eine gezielte NO-Freisetzung ermöglicht wird. Allgemein sind an  $O^2$ -geschützten NONOaten kleine Variationen möglich, so dass kleinere NONOate (z.B. DEA/NO **21**) als Bildungsblock für größere Derivate dienen können.

NONOate, die eine zusätzliche freie Aminfunktion besitzen, können ebenfalls derivatisiert werden. Die Reaktion am freien Amin kann dazu benutzt werden, die Diazeniumdiolat-Gruppe in andere Verbindungen einzubauen.<sup>[68]</sup> Die in Abb. 14 dargestellte Verbindung **23** wurde auf diese Weise mit Alkylhalogeniden

wie 6-Chloropurinribosid, Nicotinylnchlorid und PVC unter Bildung von Diazeniumdiolat-Nucleoside, -Vitamine und -Polymeranaloga umgesetzt.<sup>[68]</sup>

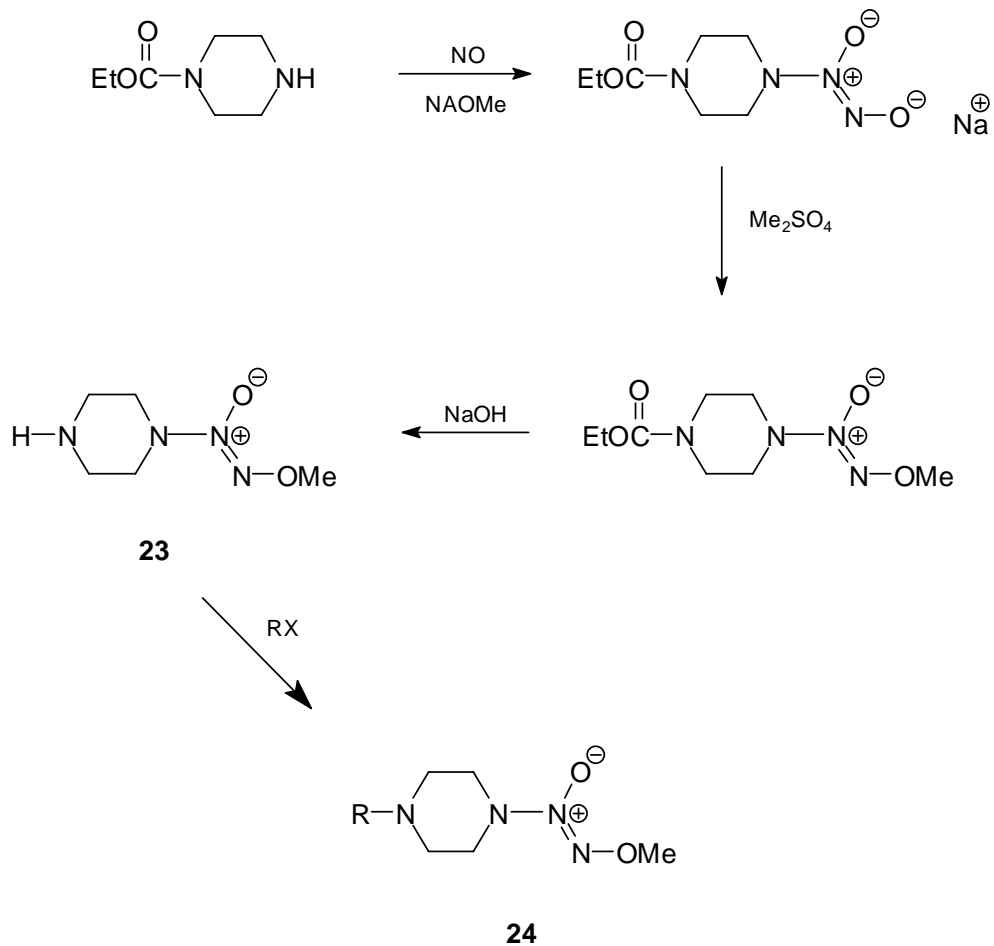


Abb. 14: Ausgehend aus dem geschützten Piperazin wurde die Diazeniumdiolat-Gruppe eingeführt, anschließend entschützt und schließlich das freie Amin für weitere Reaktionen verwendet.

Eine Michael Addition von **25** mit Maleinimiden<sup>[69]</sup> wurde durchgeführt, um ein Derivat **26** des traditionellen Protein-*cross-linking*-Reagenzes GMBS zu erhalten, welches dazu benutzt werden kann, die Lysingruppen in Proteinen zu derivatisieren.

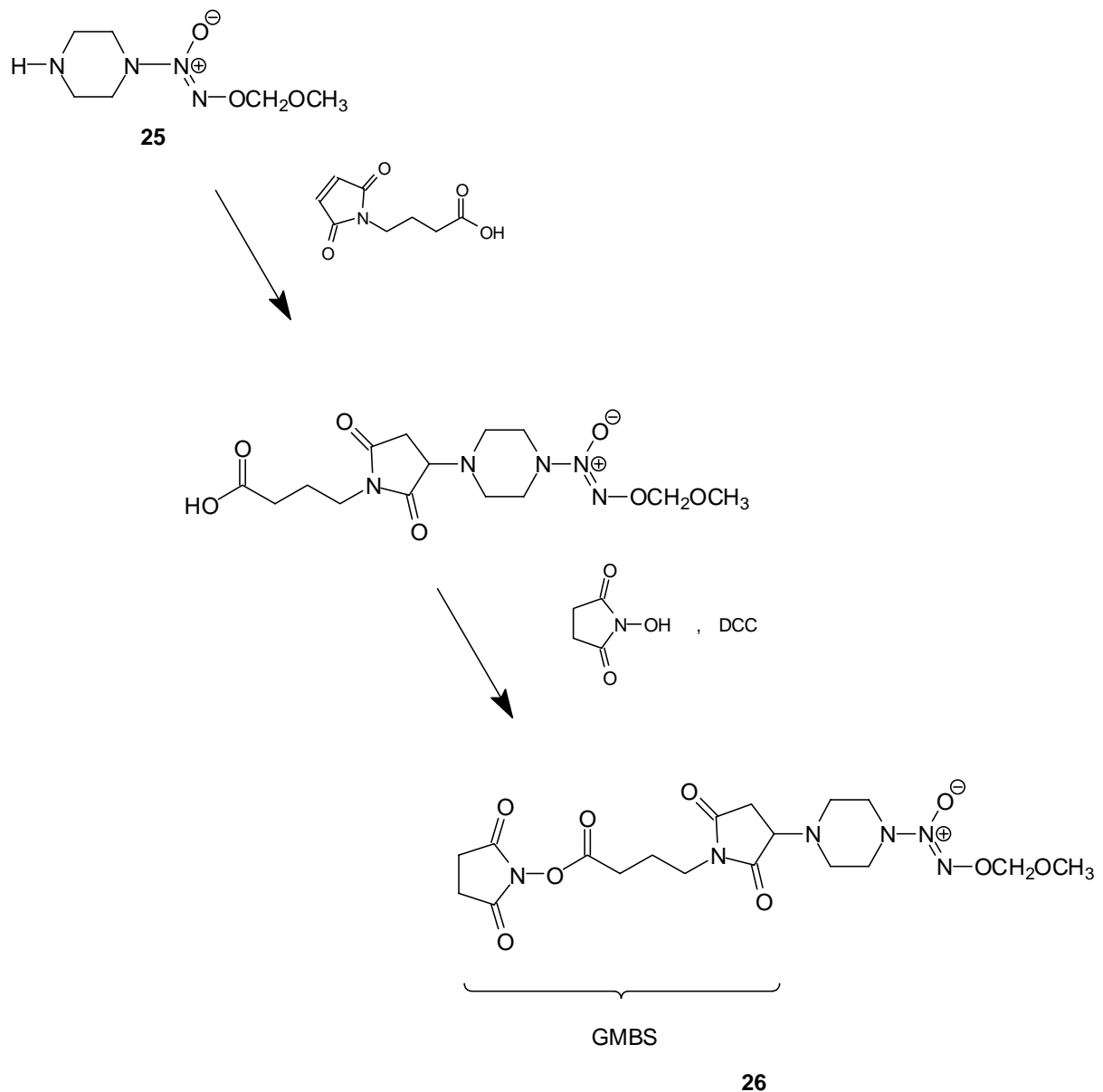
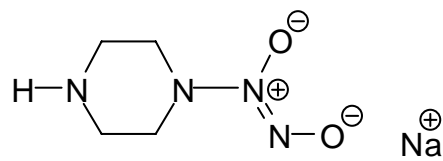


Abb. 15: Synthesebeispiel zur Einführung des Protein-cross-linking-Reagenzes GMBS.

Die Substitution der Sulfatgruppen in Heparin durch **25** ermöglichte den Einbau der Diazeniumdiolat-Einheit.<sup>[70]</sup> Das diazeniumdiolatisierte Material wurde zur Darstellung von thromboseresistenten Polymerfilmen verwendet. Das Salz **27** reagiert mit Heparin am freien Amin und bildet ein Produkt, das die Blutplättchen-Aggregation inhibiert bzw. revertiert.<sup>[71]</sup>



27

Einige O<sup>2</sup>-ungeschützte *N*-Diazeniumdiolate aus Polyaminen wurden an Dextran unter Verwendung von Bromcyan BrCN als *cross-linking*-Reagenz adiert.<sup>[72]</sup>

Es ist eine Vielzahl von Modifikationen an den Sauerstoffsubstituenten möglich. Halogenatome in den Seitenketten können in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit Amin<sup>[62]</sup> oder Thiolaten<sup>[65]</sup> umgesetzt oder auch dehydrohalogeniert<sup>[62]</sup> werden.

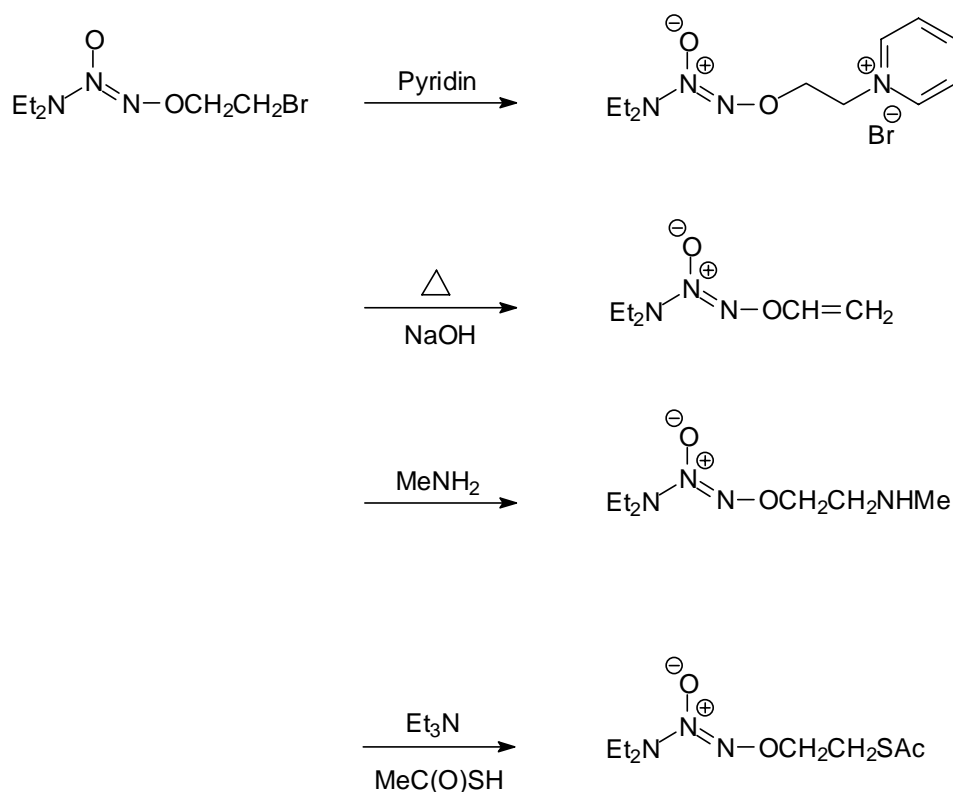


Abb. 16: Mögliche Reaktionen am Halogensubstituenten der Diazeniumdiolat-Gruppe.

Die *N*-Diazeniumdiolat-Gruppe ist inert gegenüber Sulfonylchloriden sowie gegenüber Cäsiumcarbonat<sup>[66]</sup> (s. Abb. 17). Diese Eigenschaft bildet die Basis einer Methode zur Bindung der *N*-Diazeniumdiolate an Proteine (durch O-

Substituenten). Acetylierte O<sup>2</sup>-glykosierte Diazeniumdiolate können ohne Zersetzung deacetyliert werden, wenn man Natriumethoxid benutzt.<sup>[67]</sup>

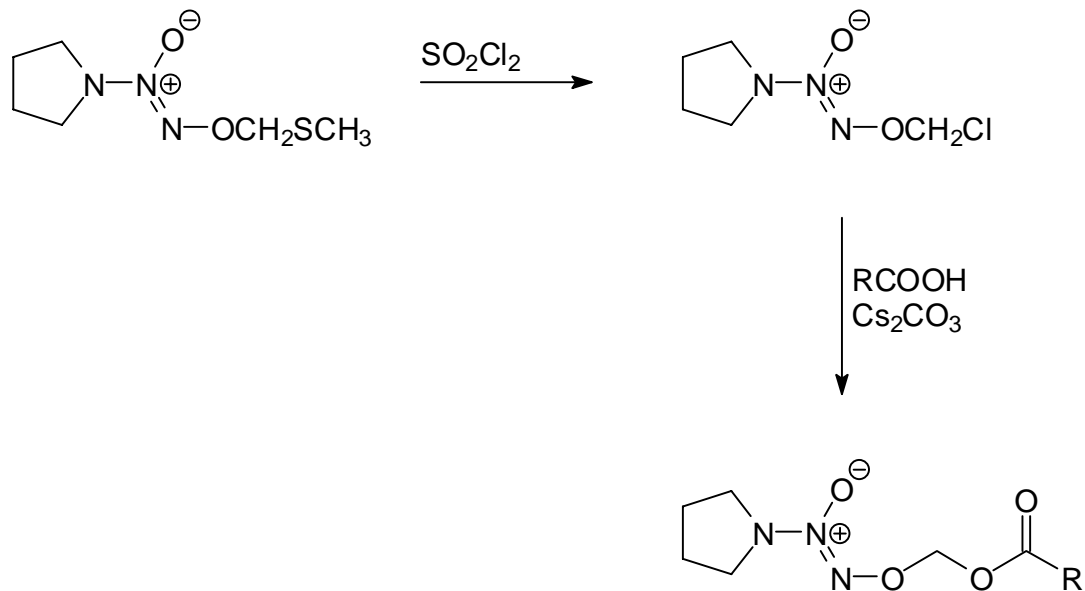


Abb. 17: Methode zur Bindung der Diazeniumdiolat-Gruppe an Proteine.

### 1.2.7 *N*-Diazeniumdiolate als NO-Donatoren

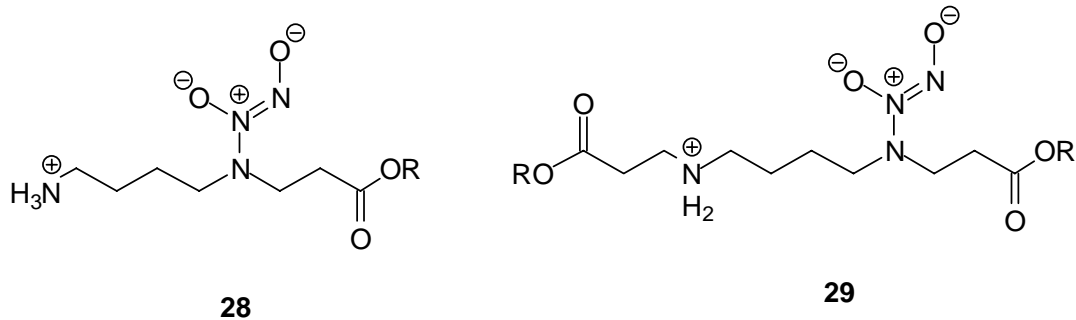
Die Freisetzung von NO steht in Zusammenhang mit der Struktur des jeweiligen Substrats. DRAGO und KARSTETTER<sup>[51]</sup> fanden heraus, dass *N*-Diazeniumdiolate von prim. Aminen weniger stabil sind als die von sek. Aminen. „Ultraschnelle“ *N*-Diazeniumdiolate können experimentell dazu verwendet werden, die Aktivität der NO-Freisetzung zu lokalisieren.

*N*-Diazeniumdiolate von Polyaminen zeigen in Bezug auf die NO-Freisetzungsgeschwindigkeit ein breites Spektrum. Es sind zahlreiche Artikel vorhanden, in denen das Entstehen von Stickstoffmonoxid intensiv untersucht wurde. Da der Abbau der charakteristischen UV-Bande ( $\lambda_{\text{max}} = 248 - 250 \text{ nm}$ ) direkt mit der Freisetzung von Stickstoffmonoxid verbunden wird, sind die ermittelten Halbwertszeiten ein Maß für die Stabilität der Verbindungen unter den gegebenen Bedingungen. Der NONOat-Zerfall folgt einer Kinetik erster Ordnung und wird

meist unter „physiologischen“ Bedingungen (Phosphatpuffer-Lösung mit einem physiologischen pH-Wert von 7.2 – 7.4 und entweder bei 22 oder 37 °C) gemessen.

Wasserlösliche Polymere wie z. B. das Bovin-Serum-Albumin-Derivat, bei dem die Diazeniumdiolat-Gruppe O<sup>2</sup>-methoxymethyliert ist, zeigen eine langsame NO-Freisetzung<sup>[69]</sup> ( $t_{1/2}$  = 20 Tage bei 37 °C), während das Diazeniumdiolat substituierte Heparin (mit der freien Diazeniumdiolat-Gruppe) eine Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzt.<sup>[71]</sup>

Lange Halbwertszeiten besitzen die in der Literatur erwähnten wasserunlöslichen Verbindungen<sup>[73-75]</sup> **28** und **29**. Die Daten wurden auf Grund ihrer Natur unter besonderen Bedingungen bestimmt.



R = Cholesterol,  
Hexadecanol

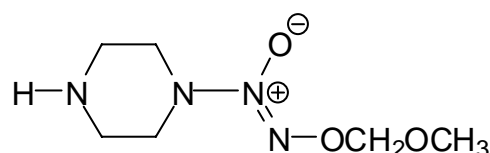
Polyamine wurden in Polymergerüste<sup>[70, 76]</sup> eingebaut. Die resultierenden *N*-Diazeniumdiolate auf der Oberfläche setzten zwar Stickstoffmonoxid frei, jedoch ist die Freisetzung nicht durch eine einfache Hydrolyse erklärbar.

In manchen Fällen fand man heraus, dass die Kinetik signifikant durch die Selbstassoziation<sup>[77]</sup> der NONOate (Bildung von bimolekularen Komplexen bei höheren Konzentrationen und in Anwesenheit von Metallionen) beeinflusst wird.

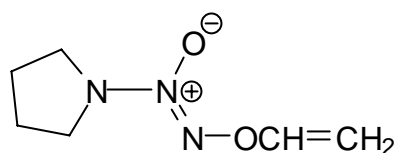
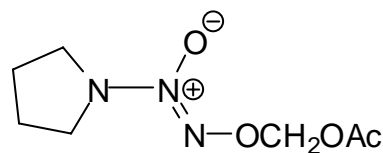
### 1.2.8 $O^2$ -substituierte *N*-Diazeniumdiolate als NO-Donatoren

$O^2$ -substituierte *N*-Diazeniumdiolate sind stabiler (gegenüber Wärme und Luft) als die ungeschützten Verbindungen und können sogar chromatographiert, destilliert oder umkristallisiert werden. Im sauren Medium erfolgt eine langsame Hydrolyse,<sup>[62]</sup> die zur Regeneration der freien Diazeniumdiolat-Gruppe mit anschließender NO-Freisetzung führt.

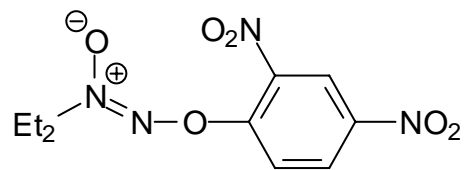
Das Acetal **22** hat eine Halbwertszeit von 17 Tage bei 37 °C. Die Stabilität dieser Verbindung ist dadurch zu erklären, dass der Substituent zu einer Mischung aus freiem Diazeniumdiolat, Methanol und Formaldehyd hydrolysiert werden muss, bevor eine NO-Freisetzung stattfinden kann.<sup>[68]</sup>

**22**

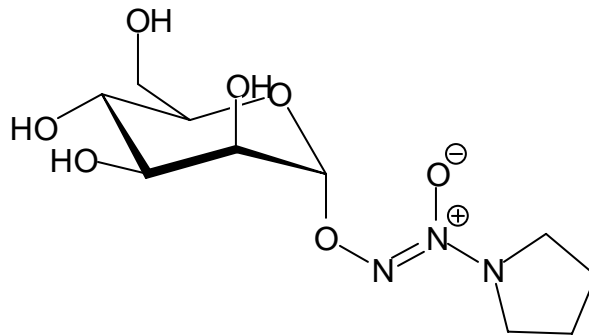
Die Verbindungen **30** und **31** sind enzymselektive NO-Donatoren, die durch die Hepatozyten in der Leber<sup>[13]</sup> und durch verschiedene Esterasen<sup>[65]</sup> aktiviert werden können.

**30****31**

Es wurden auch eine Reihe von  $O^2$ -Arylsubstituierten Verbindungen wie z. B. **32** synthetisiert. Diese werden durch  $S_NAr$ -Reaktionen aktiviert. Ein Angriff des Thiolats der Zink-Finger-Portion von einem HIV-Nucleocapsid-Protein ist also auch möglich.<sup>[63]</sup>

**32**

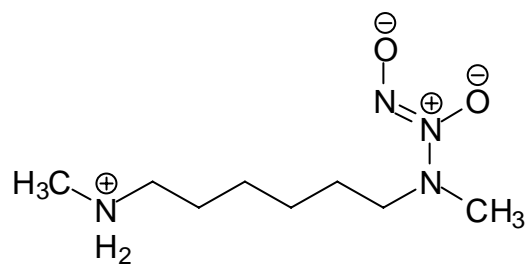
In letzter Zeit wurden O<sup>2</sup>-glykosilierte Diazeniumdiolate synthetisiert. Ein konkretes Beispiel hierfür stellt die Verbindung **33** dar, die bei einem pH-Wert von 7.4 stabil ist. Die NO-Freisetzung wird durch das Enzym  $\beta$ -D-Glykosidase bei einem pH-Wert von 5.6 aktiviert.<sup>[67]</sup>

**33**

### 1.2.9 Neue Entwicklungen in der NONOat-Forschung

Interessante Untersuchungen wurden in den letzten Jahren in Bezug auf Stickstoffmonoxid freisetzende Biomaterialien durchgeführt. Diese hydrophoben Polymere besitzen potenzielle Anwendungen als thromboresistente Beschichtungen für eine Reihe von Blut kontaktierenden biomedizinischen Geräten wie z. B. *in vivo* Sensoren, arteriovenöse Transplantationen, Stents, Katheter und extrakorporale Schaltungen. Mit diesem Ziel wurden verschiedene Biomaterialien auf PVC-, Silicon-, Gummi-, Polymethylmethacrylat- und Polyurethanbasis entwickelt.<sup>[78]</sup> Die resultierenden NO-Polymere sollten zwar in der Lage sein, NO zu spenden, das Amin jedoch (einer vollständigen Rückbildung vorausgesetzt) sollte nicht aus dem Polymergerüst hinausdiffundieren. Thromboresistente hydrophobe NO-Polymere können in drei Kategorien unterteilt werden:

1. Dotierte bzw. dispergierte diskrete *N*-Diazeniumdiolat-Moleküle innerhalb der Polymerfilme. Man begann zunächst damit, *N*-Diazeniumdiolate in Polymergerüste einzubauen.<sup>[79]</sup> So wurden das Natriumsalz des DEA/NO **21a** (s. Abb. 18) und das zwitterionische Spermin-NONOat in Lösungen von Polyethylenglykol (bei 47 °C) sowie das Diethylentriamin-NONOat in Polycaprolacton (bei 60 °C) dispergiert und nach dem Abkühlen zu Filmen verarbeitet, die NO freisetzen können. MOWERY *et. al.*<sup>[70]</sup> fanden heraus, dass das NONOat (MAHMA/NO) **34** und das zugrunde liegende Amin aus der Polymermatrix hinauswanderten. Sie reagierten mit oxidativen Intermediaten von NO unter Bildung von potenziell toxischem Nitrosamin. Neue Untersuchungen zielen auf die Entwicklung von hydrophoberen *N*-Diazeniumdiolaten.<sup>[80]</sup>



34

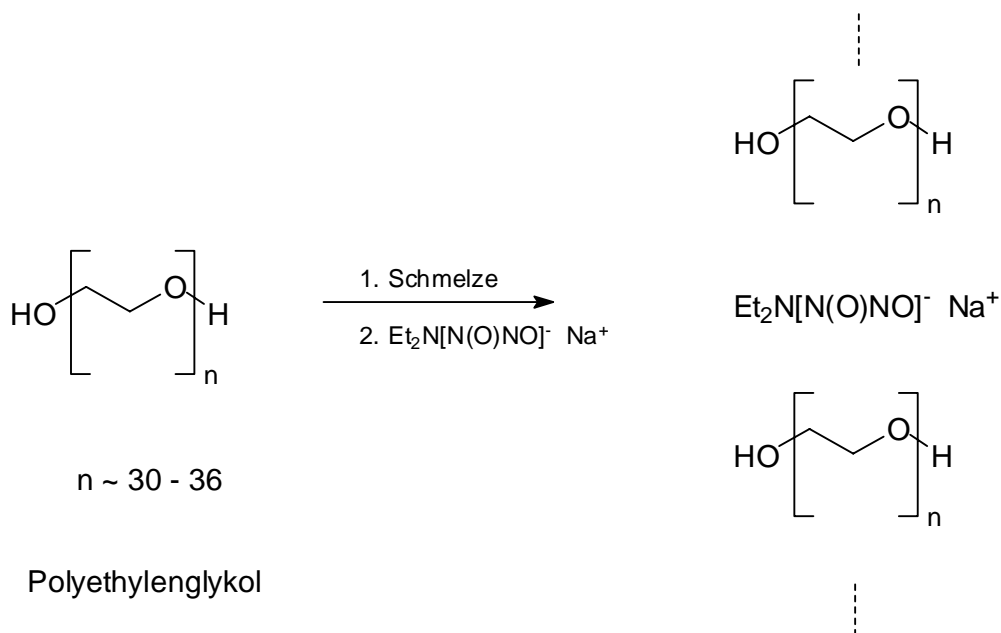


Abb. 18: Darstellung von dotierten bzw. dispergierten diskreten *N*-Diazeniumdiolat-Molekülen innerhalb von Polymerfilmen.

2. Dispersion bzw. Derivatisierung von winzigen Polymerfüllern mit funktionellen Gruppen, die in der Lage sind Stickstoffmonoxid freizusetzen. Siliciumdioxid-(SiO<sub>2</sub>) und Titandioxid-Partikel werden routinemäßig dazu verwendet, die rheologischen Eigenschaften von Polymeren zu steuern.<sup>[81, 82]</sup> Die verwendeten funktionellen Gruppen sind *N*-Diazeniumdiolate,<sup>[83]</sup> aber auch *S*-Nitrosothiole.<sup>[84]</sup> So wurden z. B. Fumed Silica-Kügelchen mit einem mittleren Durchmesser von 7-10 nm mit Alkylaminen auf ihrer Oberfläche dotiert. Dies geschah mit Hilfe von unterschiedlichen Silan-Reagenzien. Mono- und Diaminalkyle wurden auf dieser Weise auf die Oberfläche des Polymerfüllers andockt und anschließend mit



3. Zu der letzten Gruppe gehört die Strategie der kovalenten Bindung von Polyaminen an das Polymergrundgerüst. Diese Polymere werden dann mit Stickstoffmonoxid umgesetzt bzw. dotiert. Die Freisetzungsgeschwindigkeit kann durch die Auswahl des jeweiligen Substrates gesteuert werden. SMITH *et. al.* entwickelten 1996<sup>[79]</sup> diesen Ansatz, sie verbanden Polyethyleniminketten mit Hilfe von 1,4-Butandiolglycidylether als *cross-linking*-Reagenz miteinander. Das resultierende Gebilde wurde dann mit Stickstoffmonoxid umgesetzt und so ein diazeniumdiolatisiertes Polymer erzielt. Effizientere hydrophobe NO-Polymere wurden in der letzten Jahren<sup>[59]</sup> durch Verwendung eines Diamin- bzw. Triaminreagenzes als *cross-linking* Element zwischen Polymethoxysilan-Materialien (Silicongummis) synthetisiert.

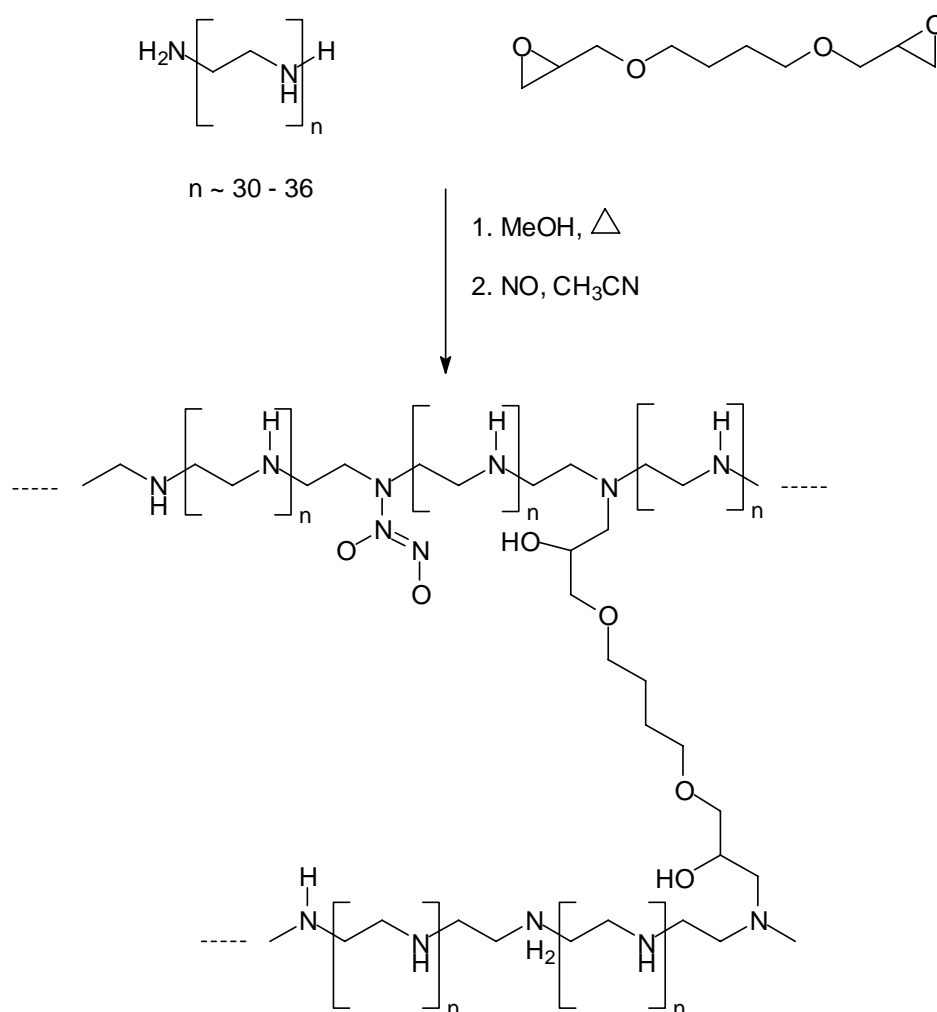


Abb. 20: Synthese von kovalent gebundenen Polyaminen am Polymergrundgerüst mit anschließender Dotierung mit Stickstoffmonoxid.

## 2 Zielsetzung

Zu den Zielen dieser Arbeit zählen die Synthese und Untersuchung von *N*-Diazoniumdiolaten, die in der Lage sind Stickstoffmonoxid selektiv abzugeben. Von Interesse ist der Einbau von biologisch relevanten Gruppen im NONOat-Grundgerüst, sowie die Auswirkungen dieser Gruppen auf die Stabilität und das Verhalten der NONOate unter physiologischen Bedingungen. Ein Beispiel kann die Guanidin-Gruppe sein.

NONOate auf Alkyldiamin-Basis sollen hergestellt werden, da sie dafür bekannt sind, durch eine Verlängerung der Seitenketten an Stabilität unter physiologischen Bedingungen zu gewinnen. NONOate auf Alkyltriamin-Basis sind weitestgehend stabiler als die vorher genannten, sie sollten ebenfalls synthetisiert und untersucht werden.

Der Einfluss von Ionenaustauschern auf die Zerfallsgeschwindigkeit von NONOaten soll untersucht werden. Diese sollen als Modellrezeptoren der extrazellulären Matrix dienen, so dass die Ergebnisse u. U. von biologischem Interesse sein könnten.

Die während der Diplomarbeit durchgeführten Studien zu den Zerfallsprodukten von NONOaten unter verschiedenen Bedingungen sollen vertieft und abgeschlossen werden. Der Befund, dass auch unter anaeroben Bedingungen die Bildung von *N*-Nitrosaminen möglich ist, sollte quantifiziert und gesichert werden.

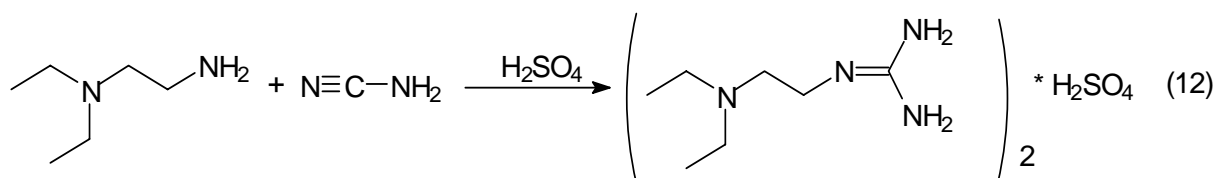
Mit Hilfe von Fluoreszenzsonden (FNOCT's) soll die bei dem NONOat-Zerfall freigesetzte Menge NO quantifiziert werden.

### 3 Ergebnisse

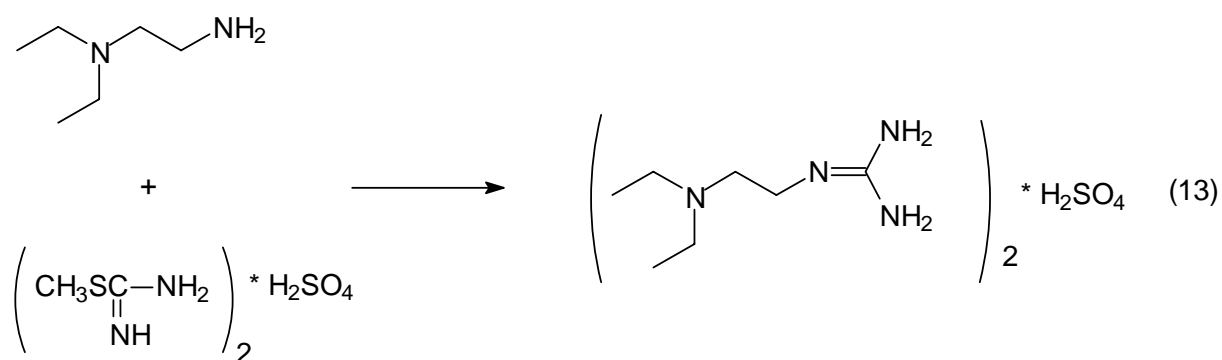
#### 3.1 Darstellung der Guanidiniumsalze

Die Guanidin-substituierten Moleküle sollen zusätzlich über eine sekundäre Aminofunktion verfügen, an die sich dann das Stickstoffmonoxid addieren kann. In der Literatur<sup>[85-87]</sup> sind derartige Synthesen beschrieben worden. In neueren Publikationen<sup>[88, 89]</sup> werden ebenfalls Synthesen von Verbindungen dieser Art genannt. So berichten VILLAROYA *et. al.*<sup>[88]</sup> über die Synthese und Pharmakologie von Alkandiguanidinium-Verbindungen.

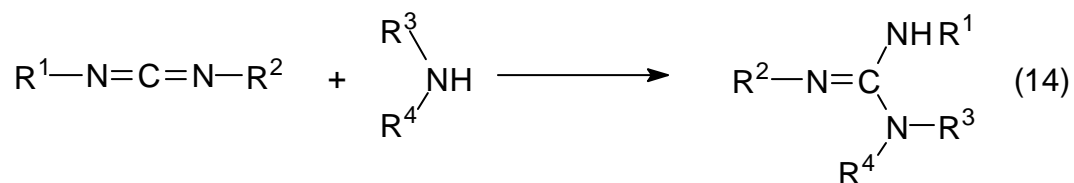
Bei der ersten beschriebenen Methode werden äquimolare Mengen an Amin und Cyanamid in Wasser 6 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt (s. Gl. 12). Anschließend wird ein Äquivalent Säure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) dazu gegeben. Das Lösungsmittel wird abgezogen bzw. der Niederschlag abfiltriert und aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.



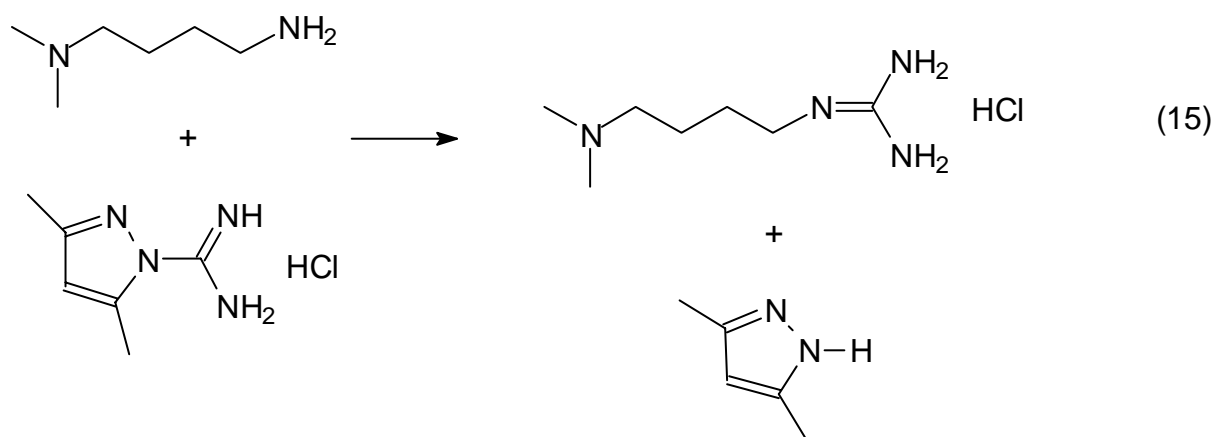
Die zweite Methode wurde von RATHKE<sup>[90]</sup> aufgeführt und beinhaltet die Reaktion von 2-Methyl-2-isothioharnstoffsulfat mit einem primären oder sekundären Amin in Wasser (s. Gl. 13). Eine weitere Variante stellt die Umsetzung dar, bei der anstatt des Harnstoffsulfats in Wasser, das Harnstoffhydroiodid in EtOH verwendet wird. Hierbei wurde beobachtet, dass primäre Amine in der Regel reaktiver sind als sekundäre.



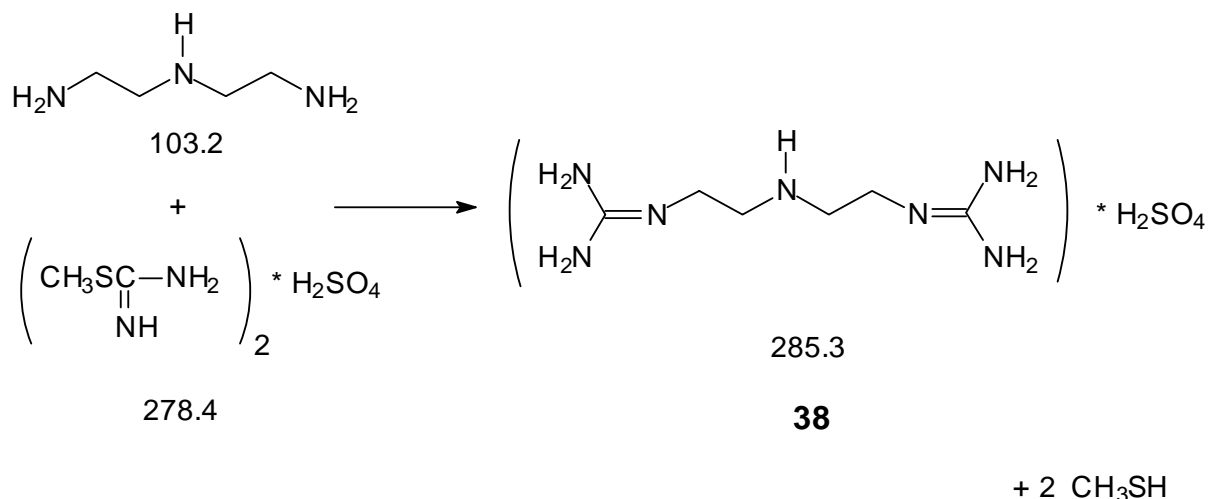
Die dritte Möglichkeit, diese speziellen Verbindungen zu synthetisieren wurde hauptsächlich von RAIFORD und DADDOW<sup>[91]</sup> ausgearbeitet. Substituierte Carbodiimide reagieren mit Ammoniak oder Aminen. Die Reaktion benutzt Benzol als Lösungsmittel, wobei 30 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt wird. Sollte das Amin niedrigsiedend sein, so wurde die Reaktion in einem Autoklaven mit einem Überschuss an Amin als Lösungsmittel durchgeführt. Der Nachteil dieser Methode ist der Mangel an freier Verfügbarkeit von geeigneten Carbodiimiden.



Die vierte Methode wurde hauptsächlich von SCOTT, O'DONOVAN und REILLY<sup>[92]</sup> entwickelt. Guanidine werden aus 3,5-Dimethyl-1-guanyl-pyrazolnitrat und Aminen dargestellt. Die Hydrochloride des Pyrazols waren genauso effektiv. Ethanol fungiert bei dieser Synthese als Lösungsmittel.



### 3.1.1 Synthese von Bis-(2-guanidiniummethyl)-aminosulfat **38**



Bei der Synthese dieses Moleküls wurde die in der Literatur<sup>[86-88]</sup> vorhandene Vorschrift verändert und anschließend optimiert. Das Guanidiniumsalz **38** ist eine farblose kristalline Substanz, die luftstabil ist. Man kann sie, wenn notwendig, aus einer Methanol/Wasser-Mischung (10 : 1) umkristallisieren. Die Trocknung erfolgte über Phosphorpentoxid 7 Tage bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa. Die Verbindung ist schwer in Wasser löslich. Erste Ansätze führten zu Ausbeuten um 60 %. Eine Syntheseoptimierung führte schließlich zu quasi quantitativen Ausbeuten (>98 %), was eine Verbesserung gegenüber dem in der Literatur<sup>[88]</sup> angegebenen Wert von 87 % bedeutet.

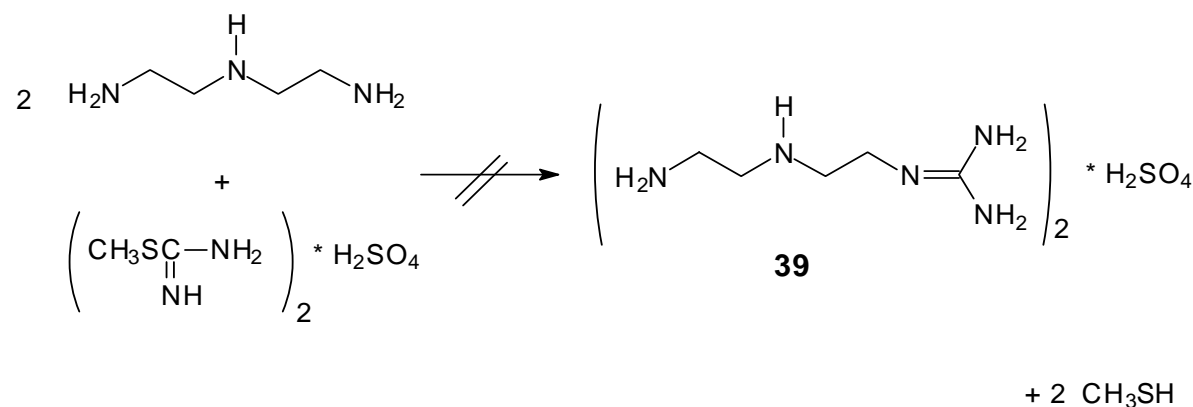
Erste Versuche diese Verbindung zu synthetisieren, wurden mit der Methode 1 (s. Gl. 12) unternommen. Der Verlauf der Reaktion wurde mit der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Es wurden verschiedene Variationen unternommen, um eine quantitative Umsetzung der Edukte zu erreichen. So wurden z. B. die Temperatur, Ansatzgröße, Zeit und die molaren Verhältnisse variiert. Die Umsetzungen führten jedoch zu nicht befriedigenden Ergebnissen.

Parallel dazu wurde die Strategie 2 (s. Gl. 13) angewandt. Hierbei konnte man bei der Umsetzung von Diethyltriamin mit dem S-Methylisothioharnstoffsulfat bei Raumtemperatur über Nacht die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachten. Bei dieser Synthesemethode entsteht Methyl-Mercaptan

(CH<sub>3</sub>SH), das aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe von Argon ausgetrieben wird. Das entstandene Methyl-Mercaptan wird dann mit Hilfe von ges. KMnO<sub>4</sub>-Lösungen in einer Reihe von hintereinander geschalteten Gaswaschflaschen gefangen und unschädlich gemacht.

Um die Umsetzungen zu verbessern, wurde eine Syntheseoptimierung betrieben. Dazu wurde das Amin erst in Alkohol gelöst (Methanol oder Ethanol); das *S*-Methylisothioharnstoffsulfat wurde anfangs in Wasser gelöst und später in einer geringeren Menge Wasser suspendiert. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die alkoholische Aminlösung wurde der Suspension langsam zugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Bildung eines voluminösen, farblosen Niederschlages festgestellt. Da in der Reaktionsmischung noch Mercaptan-Geruch wahrzunehmen war, wurde sie mit Argon gespült. Bei den optimierten Versuchen wurde die Mischung einem geringen Unterdruck von 800 – 900 hPa unterworfen und das Gefäß anschließend mit Ar belüftet. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis kein Mercaptan mehr wahrnehmbar war. Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte isoliert, ein Mal mit kaltem Wasser und drei Mal mit kaltem Methanol gewaschen und anschließend an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 7 Tage zur Trocknung angeschlossen. Die Ausbeute war quantitativ.

Das ursprüngliche Ziel dieser Synthese war es, das monosubstituierte Guanidiniumsalz des Diethylentriamins zu synthetisieren. Es wurde nach Faktoren gesucht, die diese Synthese ermöglichen könnten. Sämtliche Versuche führten jedoch zu dem Bisguanidiniumsalz.



Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, aufgenommen in  $\text{D}_2\text{O}$ , ist auf Grund der Symmetrie durch zwei Signale gekennzeichnet. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommenen Spektren von Diethylentriamin als Vergleich (s. Anhang 2). Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Amins beobachtet man zwei Triplets bei 2.84 und 2.75 ppm mit einem typischen AA'BB'-Muster. Der Einbau der Guanidiniumgruppe sollte sich auf die Lage der Signale bemerkbar machen und in der Tat findet man bei den Spektren des Guanidiniumsulfats (Abb. 21), dass ein Triplett ins Tieffeld zu 3.19 ppm mit einer  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten von 5.9 Hz verschoben wurde. Dieses Signal wird den Methylenprotonen neben den Guanidiniumgruppen zugeordnet. Die Lage des zweiten Signals bei 2.68 ppm mit einer scheinbaren Kopplungskonstanten von 6.0 Hz bleibt weniger beeinflusst vom Einbau der Guanidin-Einheiten und wird den Methylenprotonen um das sek. Ammono-N-Atom zugeordnet.

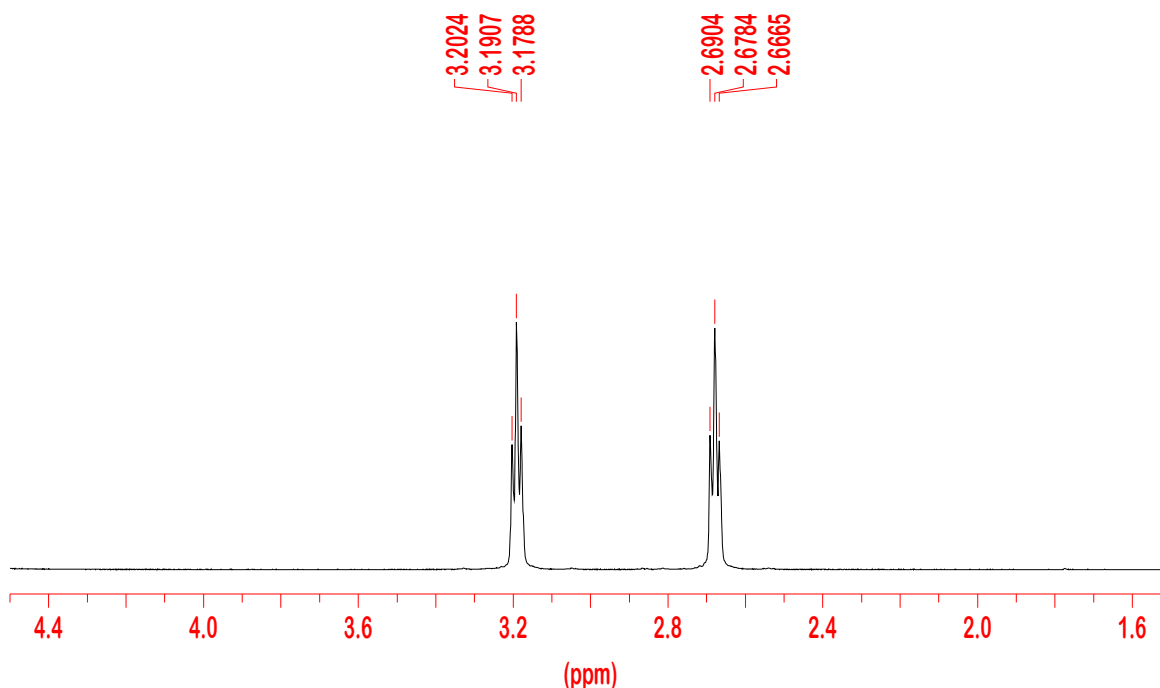


Abb. 21:  $^1\text{H}$ -Spektrum von **38** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind drei Signale vorhanden. Die Zuordnung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Spektren von Diethylentriamin (s. Anhang 2), das Signale bei 51.1 und 40.4 ppm besitzt. Im Guanidinium-Sulfat befinden sich die

Signale bei 46.5 und 40.6 ppm. Das Signal bei 40.6 ppm bleibt praktisch unverändert im Vergleich zum Amin und wird den Methylen-C-Atomen um das sek. Amino-N-Atom zugeordnet. Das Signal bei 46.5 ppm stammt aus den Methylen-C-Atomen neben den Guanidiniumgruppen. Das dritte Signal bei 157.0 ppm wird den Guanidin-C-Atomen im Molekül zugeordnet. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

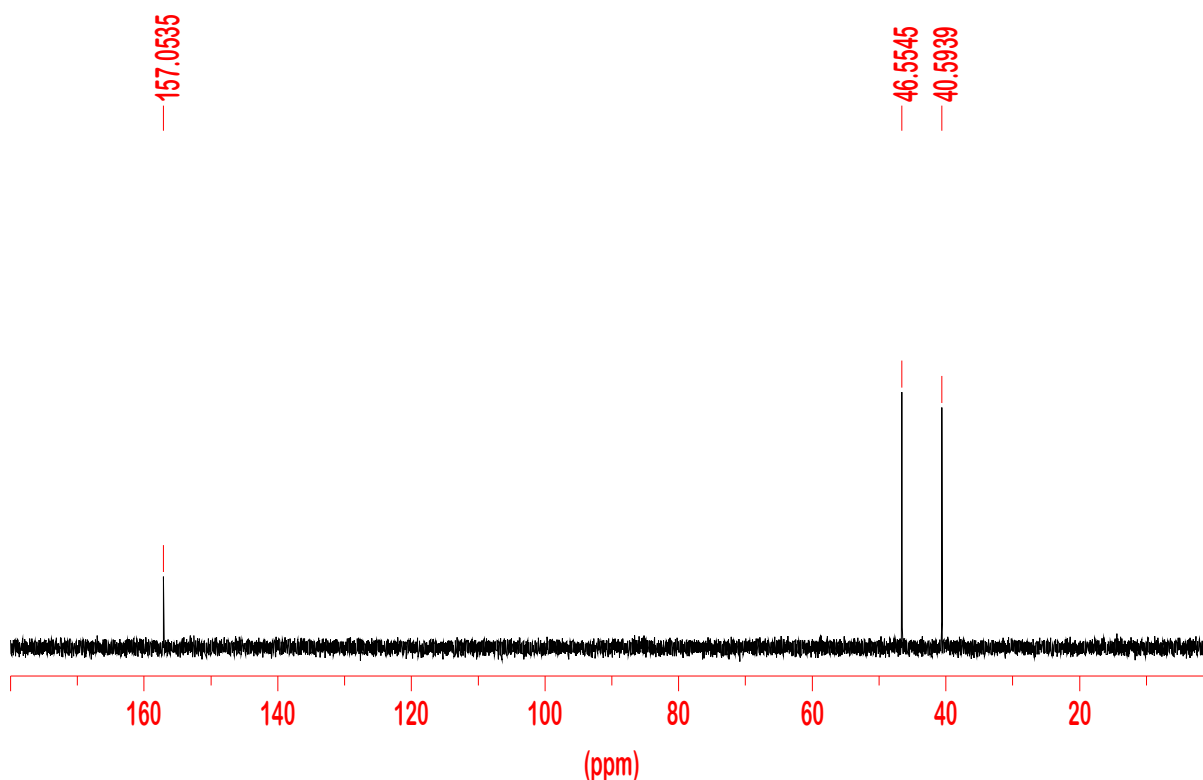


Abb. 22:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **38** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

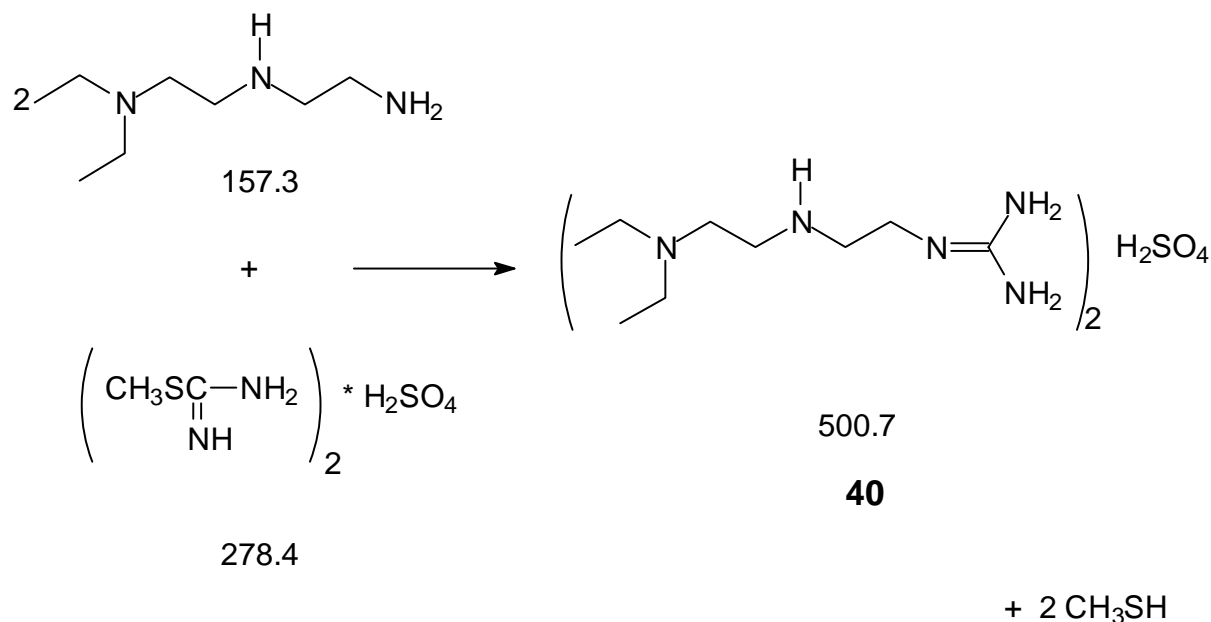
Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum konnte auf Grund der unzureichenden Löslichkeit des Salzes in  $\text{D}_2\text{O}$  und die daraus folgende zu kleine Konzentration in  $\text{D}_2\text{O}$  nicht aufgenommen werden.

Dieses Guanidinium-Salz zeigt eine langsame Zersetzung in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 7 Tagen in  $\text{D}_2\text{O}$  entstehen weitere Banden im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei chemischen Verschiebungen von 3.0, 3.1 und 3.2 ppm. Aus der Literatur<sup>[93, 94]</sup> ist bekannt, dass Guanidine hydrolysiert werden können. Die Produkte dieser Reaktion sind Harnstoffderivate.

Das IR-Spektrum des Salzes zeigt in Übereinstimmung mit den Literaturdaten<sup>[95, 96]</sup> für Guanidin-Verbindungen drei besonders intensive Absorptionsbereiche bei 3500 – 3100, 1650 und 1100  $\text{cm}^{-1}$ . Die breite intensive Bande im Bereich 3500 – 3100  $\text{cm}^{-1}$  gehört zu den N-H-Valenzschwingungen der Guanidinium- aber auch der N-H-Gruppe. Im Bereich 2950 – 2850  $\text{cm}^{-1}$  befinden sich die C-H-Valenzschwingungen in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten<sup>[97, 98]</sup> für diese Gruppe (2960 – 2850  $\text{cm}^{-1}$  für die  $-\text{CH}_2$  bzw. 2820 – 2780  $\text{cm}^{-1}$  für die  $-\text{N-CH}_2$ -Gruppe). Auf Grund der Mesomerie kann man in diesem Bereich auch die  $=\text{NH}_2^+$ -Valenzschwingung finden. Die scharfe Bande bei 1660  $\text{cm}^{-1}$  gehört wohl den C=N-Valenzschwingungen der Guanidinium- aber auch den  $\text{NH}_2$ -Deformationsschwingungen sowie den C-N-H-Deformationsschwingungen. Harnstoff-Verbindungen zeigen eine scharfe Bande bei 1680 – 1640  $\text{cm}^{-1}$ .

Die  $\text{CH}_2$ -Deformationsschwingungen sind im Bereich 1460 – 1450  $\text{cm}^{-1}$  anzutreffen (Lit.<sup>[97, 98]</sup> 1470 – 1430  $\text{cm}^{-1}$ ). In diesem Bereich sind aber auch die CN-Valenzschwingungen anwesend. Eine weitere scharfe sehr starke Bande befindet sich bei 1110  $\text{cm}^{-1}$ , diese kann den  $\text{NH}_2$ -Pendel-Deformationsschwingungen, den C-N-Valenzschwingungen und dem Sulfatanion in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert für anorganische Anionen (Lit.<sup>[97, 98]</sup> 1130 – 1080  $\text{cm}^{-1}$ ) zugewiesen werden. Diese Beschreibung ist stellvertretend für die anderen hier synthetisierten Guanidiniumsulfate.

### 3.1.2 Synthese von 2-(2-Diethylaminoethylamino)-ethylguanidinium-sulfat **40**



Analog zu der Synthese von **38** wurde hier die in der Literatur<sup>[86, 87]</sup> vorhandene zweite Methode (Gl. 13) geändert und später optimiert. Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine kristalline farblose Substanz, die an der Luft stabil ist. Die Aufbewahrung erfolgt dennoch in einem N<sub>2</sub>-Kolben unter Argon. Eine Reinigung des Produkts wurde erreicht, in dem das Rohprodukt in der Siedehitze in Ethanol gelöst wurde. Noch in der Siedehitze wurde Acetonitril bis zur anfänglichen Trübung gegeben. Beim Abkühlen bildete sich ein voluminöser farblos-er Niederschlag, der isoliert, mit kaltem Acetonitril gewaschen und an der Öldiffusionspumpe (Raumtemperatur, über Phosphorpentoxid, 7 Tage, 80 – 90 Pa) getrocknet wurde. Die Synthese wurde mehrmals durchgeführt und optimiert. Die Ausbeute konnte von ~ 60 % auf quasi quantitative Werte von >95 % verbessert werden.

Die Reaktion von *N,N*-Diethyldiethylentriamin mit *S*-Methylisothioharnstoffsulfat zeigt ein anderes Verhalten als die von Diethylentriamin. So konnte keine Niederschlagsbildung über Nacht beobachten werden. Bei dem ersten Syn-

theseversuch wurde die entstandene Lösung am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 50 – 60 hPa und einer Temperatur von 40 °C eingengt. Dabei konnte die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachtet werden. Dieser Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte abgetrennt und an der Öldiffusionspumpe über  $P_2O_5$  getrocknet. Eine Umkristallisation war nicht notwendig.

Im  $^1H$ -NMR-Spektrum, das in  $D_2O$  aufgenommen wurde, kann man die erwarteten Signale beobachten. Das Triplett bei 0.97 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz gehört den Methylprotonen, während das Quartett bei 2.50 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz von den zwei Methylengruppen der Ethyl-Substituenten stammen. Bei 2.54 und 2.66 ppm finden sich zwei Triplets mit einem typischen  $AA'BB'$ -Muster, diese Signale gehören der Ethylengruppe zwischen der sek. Aminofunktion und dem diethylsubstituierten Stickstoffatom. Mit Hilfe von Korrelationsspektren konnten die Signale eindeutig zugeordnet werden. Das erste Signal wird der  $CH_2$ -Gruppe, die sich neben dem diethylsubstituierten Stickstoffatom findet, zugeordnet. Das zweite Signal stammt von der  $CH_2$ -Gruppe neben der sek. Aminofunktion.

Das Triplett bei 2.74 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.2 Hz gehört der Methylengruppe, die sich neben der sek. Aminofunktion, zwischen dieser und der Guanidiniumgruppe, befindet. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3.26 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.2 Hz ist von besonderem Interesse, da sie tieffeldverschoben im Vergleich zum Ausgangsamin ist. Diese Bande entspricht zwei Protonen und sollte der Methylengruppe, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der neu gebildeten Guanidiniumgruppe befindet, gehören.

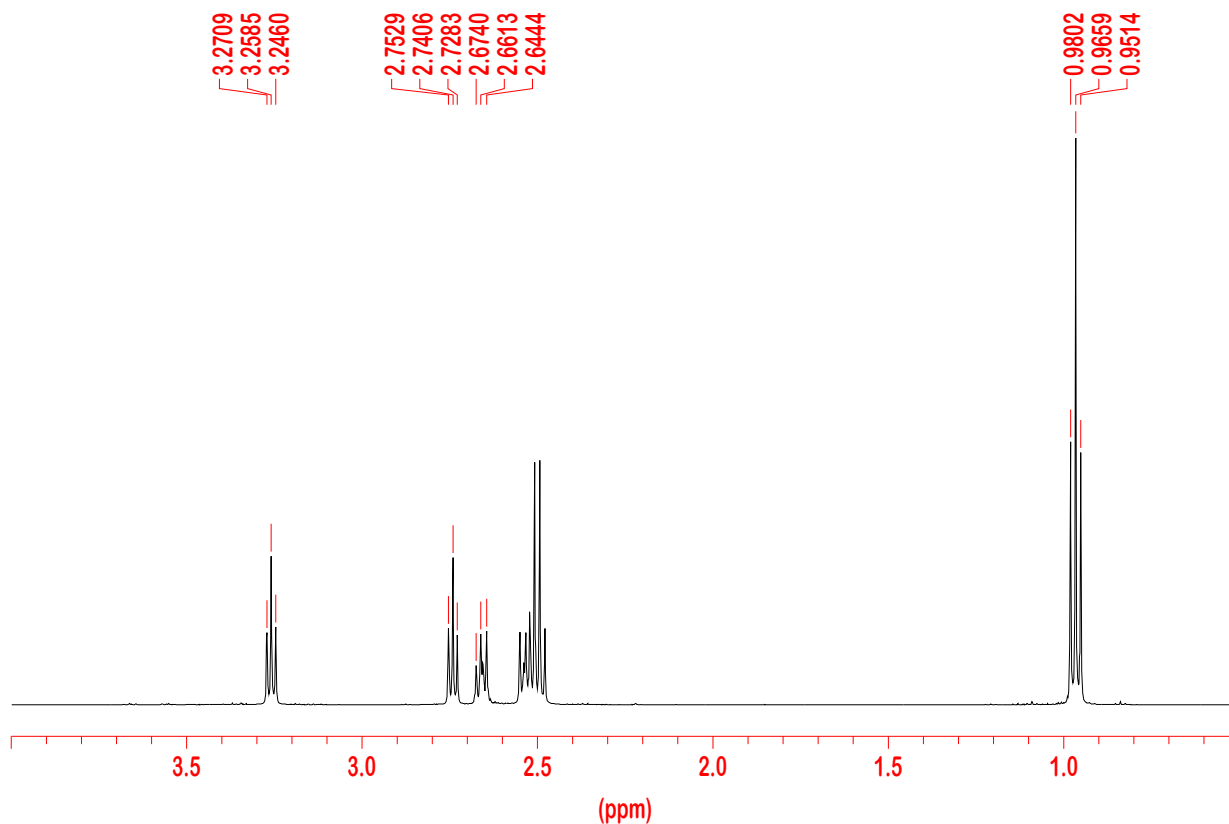


Abb. 23:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **40** in  $\text{D}_2\text{O}$

Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 24) zeigt 7 Signale. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von C-H- und H-H-Korrelationsspektren. Das Signal bei 159.6 ppm gehört dem Guanidinium-C-Atom. Das Signal bei 12.8 ppm gehört den Methyl-C-Atomen, während das Signal bei 49.3 ppm den Methylen-C-Atomen der Ethyl-Substituenten zuzuordnen sind. Das Signal bei 53.5 ppm gehört dem Methylen-C-Atom, das sich in unmittelbarer Nachbarschaft der diethylsubstituierten Aminofunktion befindet. Das Signal bei 49.6 ppm gehört dem Methylen-C-Atom neben der sek. Aminofunktion und zwischen dieser Aminofunktion und der Guanidiniumfunktion befindet. Das Signal bei 47.8 ppm gehört dem Methylen-C-Atom neben dem sek. Stickstoffatom, zwischen diesem sek. Stickstoffatom und der tert. Aminofunktion. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 43.4 ppm gehört dem Methylen-C-Atom in unmittelbarer Nachbarschaft der Guanidiniumgruppe.

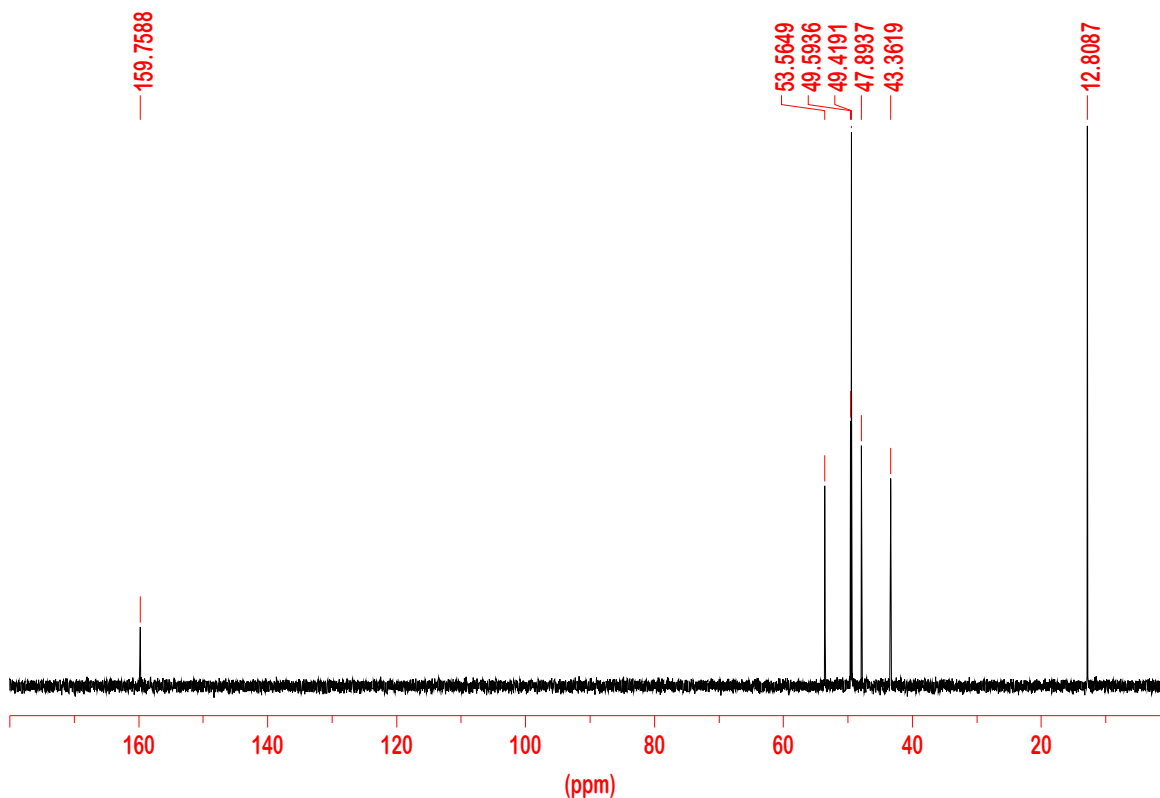


Abb. 24:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **40** in  $\text{D}_2\text{O}$

Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum dieser Substanz, aufgenommen in  $\text{D}_2\text{O}$  liefert vier Signale bei -301.1, -310.8, -336.5 und -350.0 ppm. Die Zuordnung der Banden erfolgt mit Hilfe von den in der Literatur<sup>[99, 100]</sup> vorhandenen Daten. Die Signale bei -301.1 und -310.8 ppm gehören der neu gebildeten Guanidinium-Gruppe. Diese Werte stimmen mit den in der Literatur<sup>[100-103]</sup> vorhandenen Werten für einige Guanidinium-Verbindungen überein. Das Signal bei -336.5 ppm gehört dem tert. Amino-N-Atom, während das Signal bei -350.0 ppm der sek. Aminofunktion zu zuordnen ist. Eine ausführliche Diskussion und weiterführende Beschreibungen dieser Daten werden in einem gesonderten Kapitel gegeben.

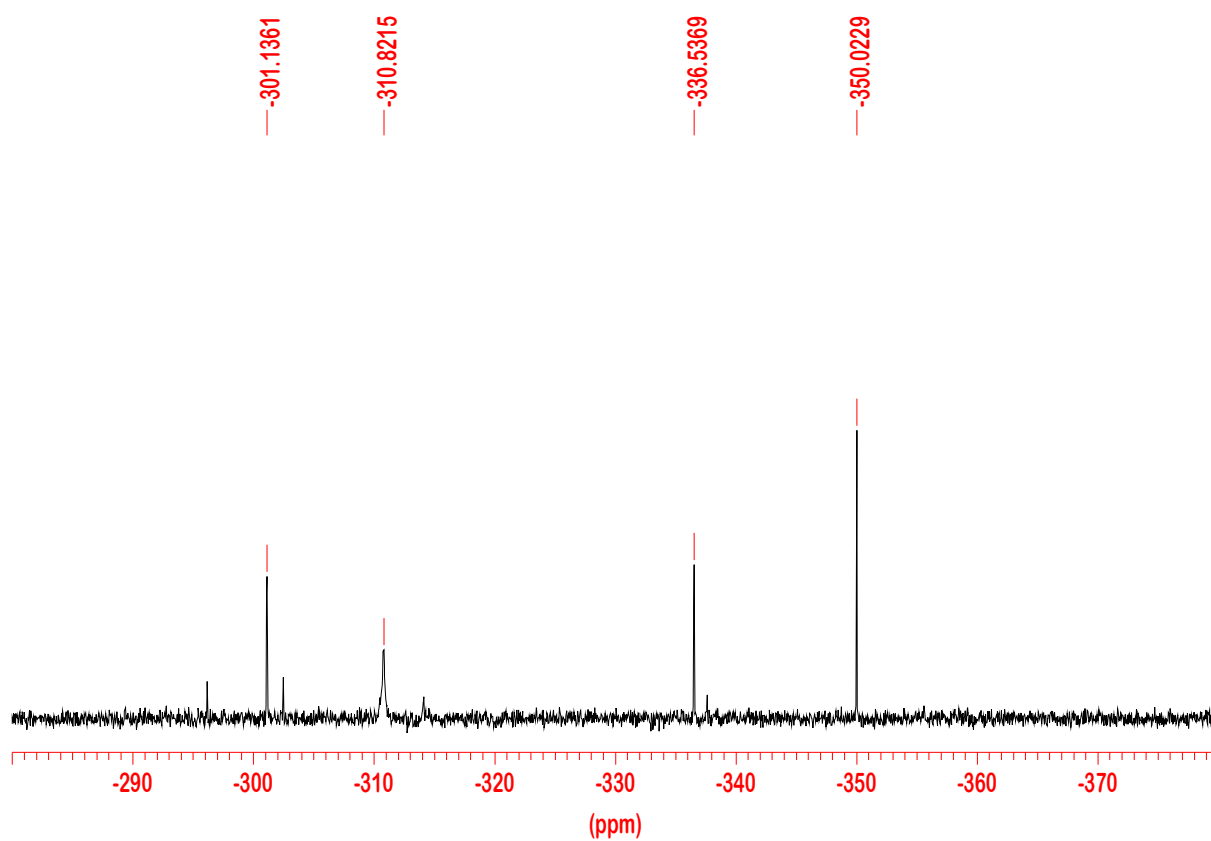
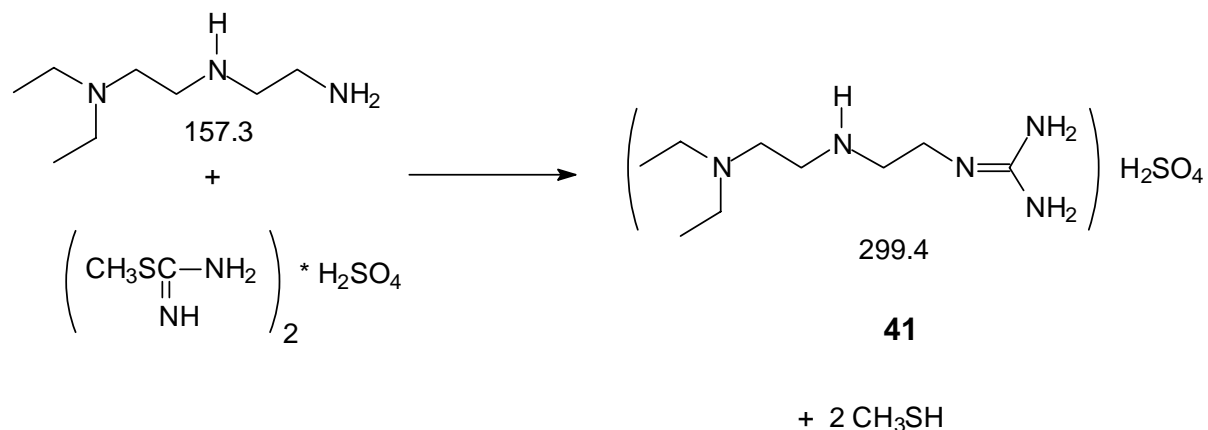


Abb. 25:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **40** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.1.3 Umsetzung von *N,N*-Diethyldiethylentriamin mit *S*-Methylisothioharnstoffsulfat und 1 Äq. Schwefelsäure<sup>[85-87]</sup> **41**



Durch eine kleine Änderung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Vorschrift und in Analogie zu der ursprünglichen Literaturvorschrift<sup>[86, 87, 90]</sup> wurde dem Reaktionsgemisch bestehend aus dem Harnstoffsulfatderivat und Amin noch ein Äquivalent  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugegeben, was zur Bildung eines zweifach protonierten Produktes führt. **40** und **41** wurden parallel synthetisiert, um die nachfolgende Freisetzung des freien Guanidins besser untersuchen zu können.

Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen farblosen kristallinen Feststoff, der luftstabil ist. Die Isolierung der Verbindung unterscheidet sich von der Isolierung der Verbindung **40** und wurde wie folgt durchgeführt: beim Einengen am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 50 – 60 hPa und einer Badtemperatur von 40 °C konnte keine Niederschlagsbildung beobachtet werden. Es entstand ein gelbes Öl. Mehrere Ansätze zur Isolierung des Salzes aus dem Öl waren erfolglos. Unter anderem wurde das Öl in Isopropanol gelöst, der Lösung wurde *n*-Heptan zugegeben, dabei beobachtete eine milchartige Trübung, die allerdings über Nacht verschwand

Das Öl wurde dann bis zur Trockne an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 0.8 - 0.9 hPa und Raumtemperatur 72 h angeschlossen. Es bildete sich ein gelb-bräunlicher Feststoff. Dieser Feststoff wurde in eine Umkehrfritte überführt und beim Waschen mit Acetonitril konnte man beobachten, dass er

farblos wurde. Anschließend wurde die farblose Verbindung noch an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 0.8 – 0.9 hPa und Raumtemperatur über  $P_2O_5$  72 h getrocknet.

Aus dem  $^1H$ -NMR-Spektrum kann die Bildung des zweifach protonierten Salzes bestätigt werden. Neben dem tieffeldverschobenen Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3.30 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.0 Hz (Methylengruppe neben der Guanidiniumgruppe) kann ein weiteres Signal bei 3.16 – 3.20 ppm erkannt werden. Dieses Signal besteht aus einem Triplet und einem Quartett und entspricht drei Methylengruppen. Es wird den  $CH_2$ -Gruppen zugeordnet, die sich in unmittelbarer Nähe des Ammonium-Stickstoffatoms befinden. Im Unterschied zu Verbindung **40** kann hier der Effekt der zweiten protonierten Stelle deutlich erkannt werden. Die Signale, die bei **40** im Bereich von  $\sim$  2.5 ppm zu beobachten werden, sind im zweifach protonierten Salz im Bereich von  $\sim$  3.2 ppm aufzufinden. Die Protonierung des Amin-N-Atoms bewirkt im  $^1H$ -NMR-Spektrum, wie erwartet eine Tieffeld-Verschiebung.

Bei 2.94 ppm findet sich das Triplet, das Teil des AA'BB'-Systems der Ethyleneinheit zwischen dem diethylsubstituierten Ammonium-N-Atom und dem sek. Amin-N-Atom ist und der  $CH_2$ -Gruppe neben dem sek. Amin-N-Atom zugeordnet wird. Ein weiteres Triplet bei 2.81 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.0 Hz stammt von der  $CH_2$ -Gruppe, die sich neben dem sek. Amin-N-Atom, zwischen diesem und dem Guanidinium-Stickstoffatom, befindet. Bei 1.25 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.3 Hz und sechs Protonen entsprechend findet sich schließlich das Triplet der beiden Methyl-Gruppen im Molekül.

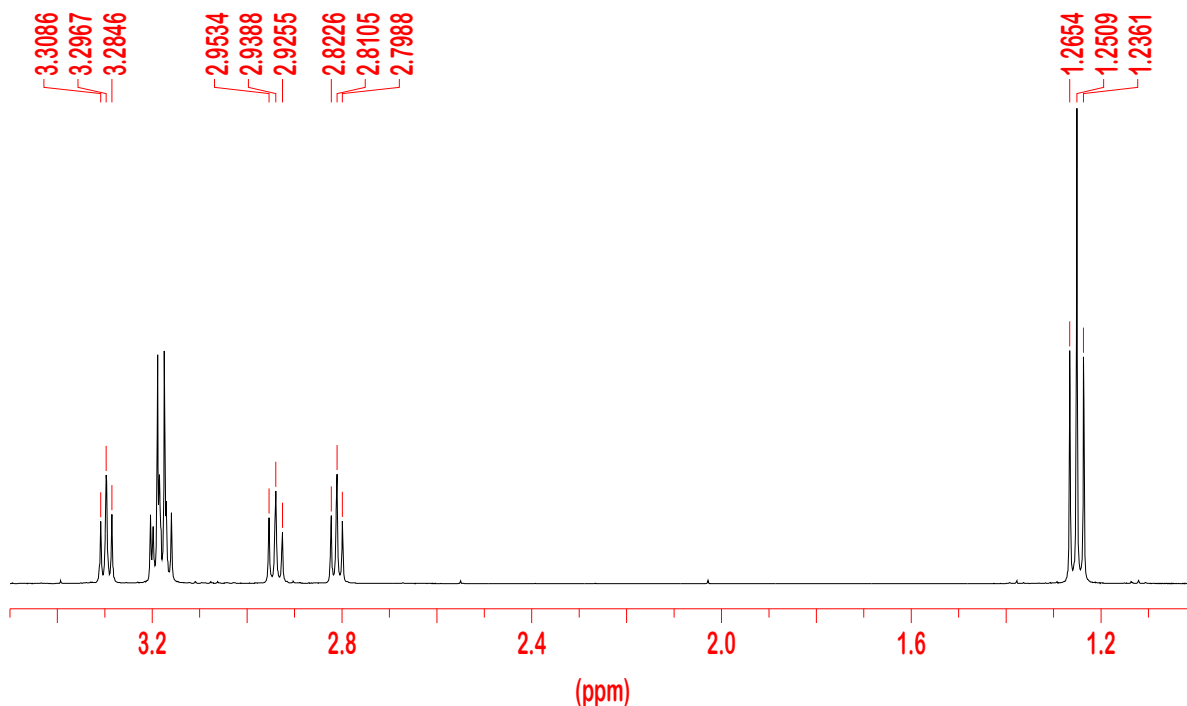


Abb. 26:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **41** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 27) zeigt insgesamt 7 Signale. Das wichtigste Signal befindet sich bei 159.8 ppm und wird dem Guanidinium-C-Atom zugeordnet. Für die Zuordnung der weiteren Signale wurden H-H- und C-H-Korrelationsspektren zu Rate gezogen. Das Signal bei 53.3 ppm gehört dem Methylen-C-Atom des Diethylentriamin-Grundgerüsts in unmittelbarer Nachbarschaft des Ammonium-N-Atoms. Das Signal bei 50.2 ppm gehört zu den zwei Methylen-C-Atomen der Ethyl-Substituenten am Diethylentriamin-Grundgerüst um das Ammonium-N-Atom. Bei 49.5 ppm ist das Signal des Methylen-C-Atoms neben der nun vorhandenen sek. Aminofunktion in der Mitte des Gerüsts und zwischen dieser und der Guanidiniumfunktion. Das Signal bei 45.2 ppm gehört den Methylen-C-Atom der sek. Aminofunktion zwischen dieser und der mit zwei Ethyl-Substituenten vorhandenen Aminofunktion. Das Signal bei 43.4 ppm gehört dem Methylen-C-Atom neben der neuen Guanidiniumfunktion. Das letzte Signal bei 10.9 ppm ist den Methyl-C-Atomen im Molekül zuzuordnen. Mit Hilfe der NMR-Daten ist es nun möglich, die Lage des zusätzlichen Protons zu bestimm-

men. Nach den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten befindet sich das Proton vermehrt am N-Atom mit den beiden Ethyl-Substituenten.

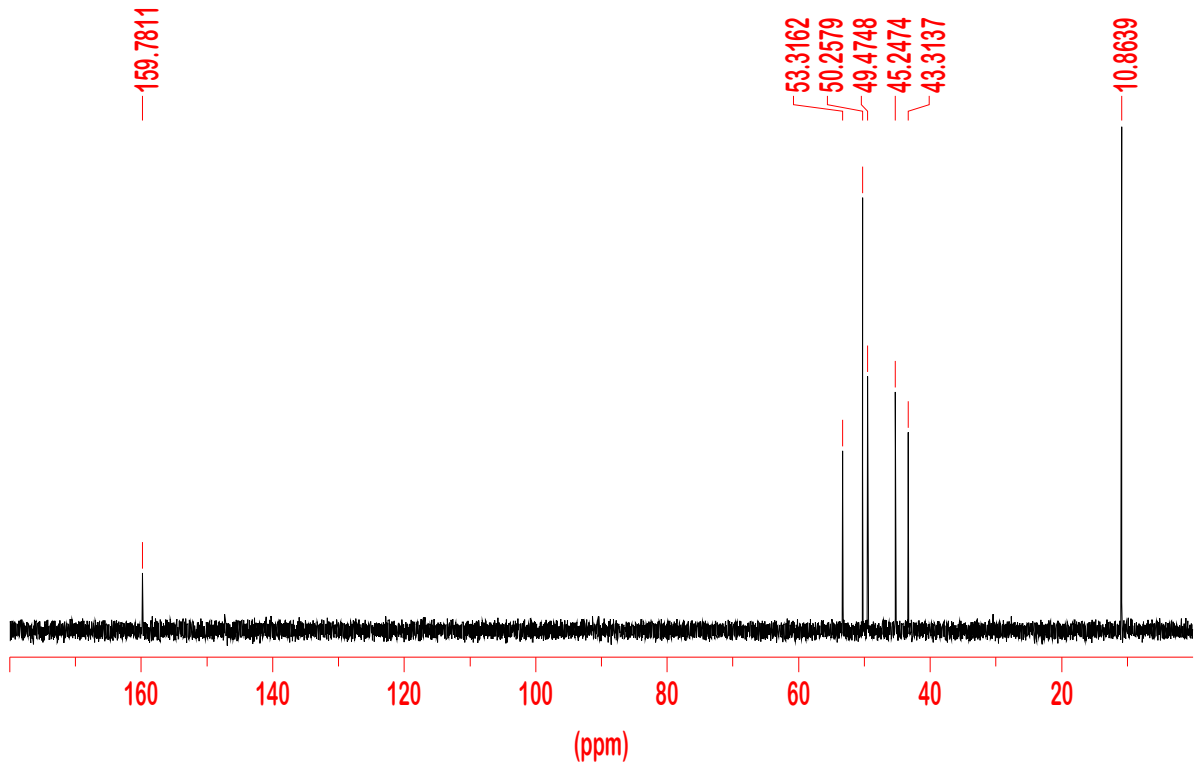
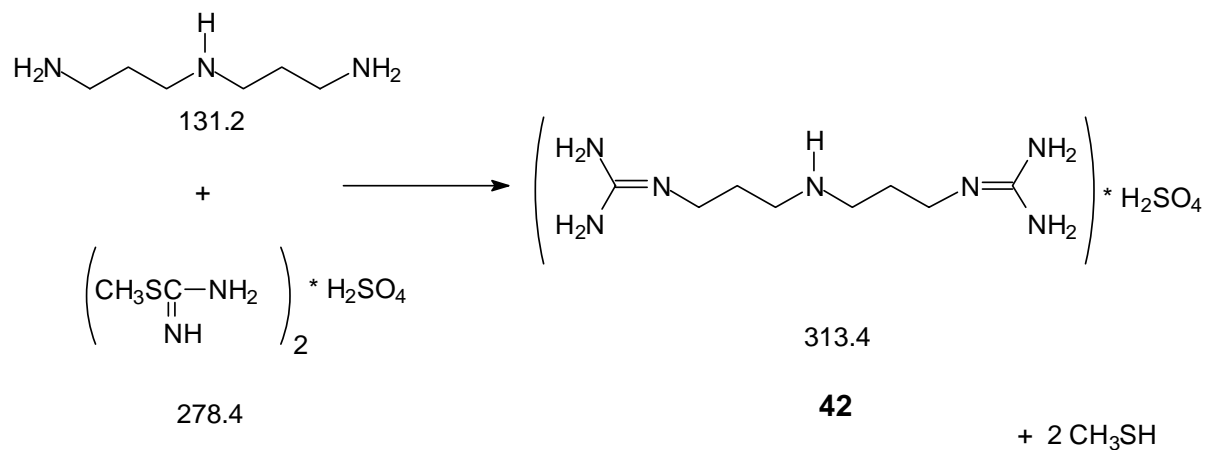


Abb. 27:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **41** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Dieser Ansatz wurde nicht weiterverfolgt, da das einfach protonierte Salz für die weiteren Untersuchungen gewählt wurde.

### 3.1.4 Synthese von Bis-(3-guanidiniumpropyl)-aminosulfat **42**



Die in der Literatur<sup>[88]</sup> vorhandene Synthese wurde geändert und optimiert. Bei der Verbindung **42** handelt es sich um einen farblosen kristallinen Feststoff, der luftstabil ist. Es wurde hier auch versucht, das monosubstituierte Guanidiniumsalz zu synthetisieren. Sämtliche Versuche schlugen jedoch fehl, so dass weiter mit dem Bisguanidiniumsulfat gearbeitet wurde. Die Synthese wurde mehrmals durchgeführt und optimiert. Die Ausbeute konnte gegenüber der in der Literatur<sup>[88]</sup> angegebene erheblich verbessert werden, von 65 % auf quasi quantitativen Werte von 96 %.

Die Synthese erfolgte analog zu den zwei vorangegangenen Darstellungen. Über Nacht war die Bildung eines farblosen Niederschlages zu beobachten. Zur Reinigung wurde der Niederschlag mit 100 mL einer Methanol/Wasser-Mischung (1 : 1) versetzt und zum Sieden erhitzt. In der Siedehitze wurde Acetonitril bis zur bleibenden Trübung zugegeben. Beim Erkalten entstand ein farbloser voluminöser Niederschlag, der mehrmals mit kaltem Acetonitril gewaschen wurde. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa, über Phosphorpentoxid.

Für die Aufnahmen der NMR-Spektren wurde das Salz in D<sub>2</sub>O gelöst, unter diesen Bedingungen sollten die Guanidin-Gruppen protoniert, als Guanidinium-Reste vorliegen. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigt drei Signalgruppen. Das Quintett

bei einer chemischen Verschiebung von 1.65 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz gehört den Methylengruppen in der Mitte der Propylenketten, während das Triplett bei 2.52 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.4 Hz den Methylengruppen gehört, die sich in unmittelbarer Nähe des sek. Amino-Stickstoffatoms befinden. Schließlich wird das Triplett bei 3.10 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.0 Hz den Methylengruppen in unmittelbarer Nachbarschaft der neu gebildeten Guanidinium-Einheiten zugeordnet.

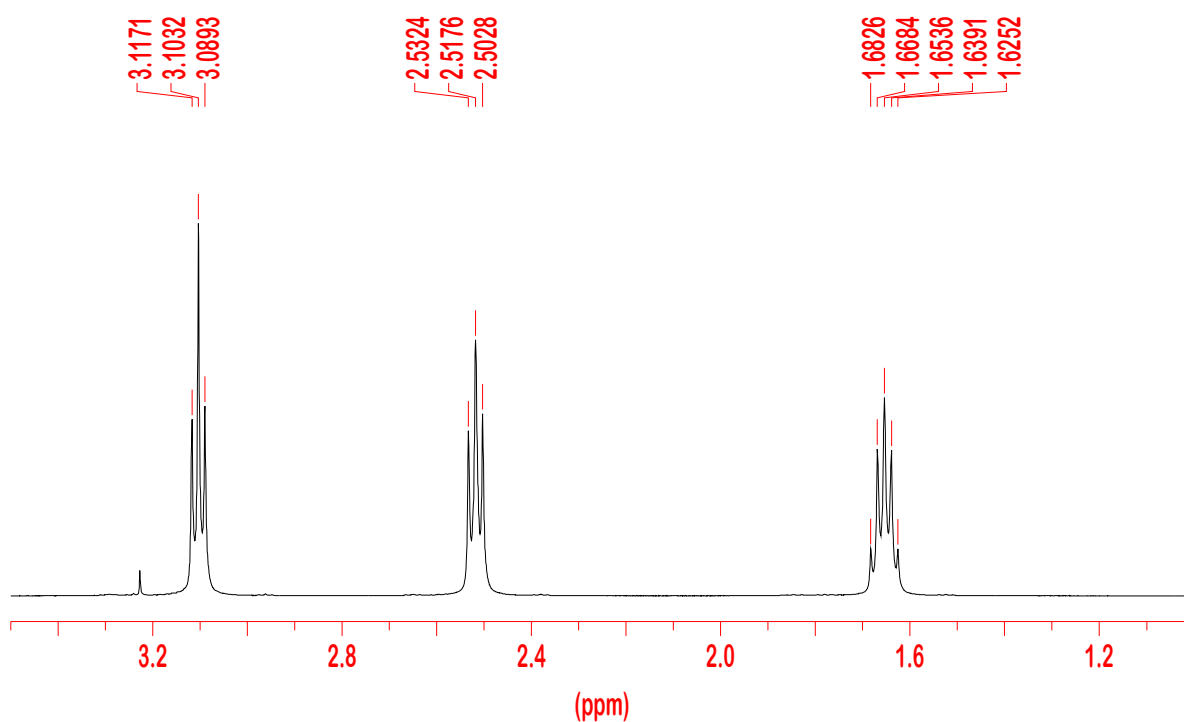


Abb. 28:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **42** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind vier Signale vorhanden. Bei einer chemischen Verschiebung von 156.8 ppm ist ein Signal vertreten, welches den beiden Guanidinium-C-Atomen im Molekül zugeordnet wird. Die restlichen drei Signale gehören den C-Atomen der Propylenketten und werden wie folgt zugeordnet: bei 45.4 ppm sieht man das Signal der beiden Methylen-C-Atome in direkter Nachbarschaft zu den neu gebildeten Guanidinium-Funktionen, während bei 39.0 ppm das Signal der beiden Methylen-C-Atome um das sekundäre Amino-N-Atom anwesend ist. Schließlich wird das verbleibende Signal bei 27.6 ppm den Methylen-C-Atomen in der Mitte der Propylenketten zugeordnet. Die gemessenen chemischen Verschiebungen für die Guanidinium-C-Atome stimmen gut mit den in der Literatur<sup>[95]</sup> vorhandenen Daten überein

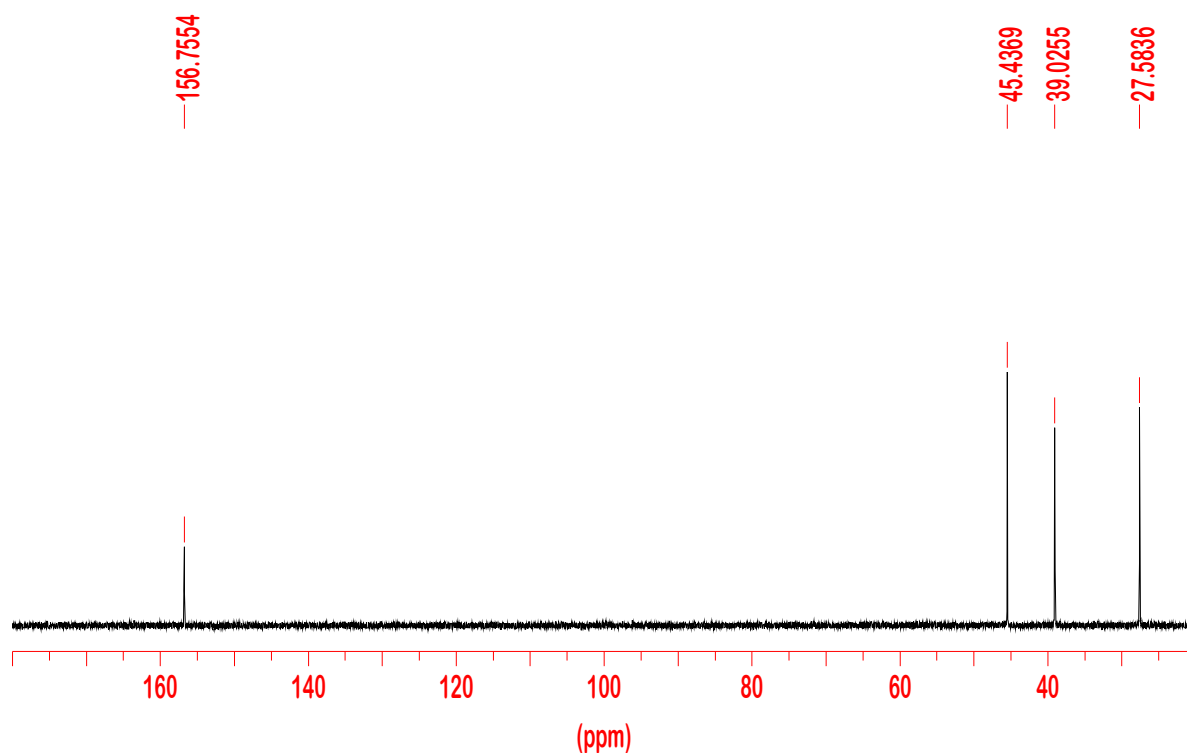


Abb. 29:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **42** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum sind drei Signale deutlich zu erkennen. Auf Grund der geringen Löslichkeit der Verbindung in  $\text{D}_2\text{O}$  war die Aufnahme eines besser

aufgelösten Spektrums nicht möglich. Die Signale wurden analog zu denen der Verbindung **40** mit Hilfe von den in der Literatur<sup>[100, 102-104]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet. Bei -341.1 ppm das Signal der sek. Aminofunktion zu finden, während die Signale bei -309.8 und -296.3 ppm den Stickstoffatomen der neu gebildeten Guanidiniumgruppen gehören. Die gesättigten wässrigen Lösungen von den synthetisierten Guanidiniumsalzen **40**, **41** und **42** reagieren alkalisch. Die <sup>15</sup>N-NMR-Daten von diesen Verbindungen sind neu und werden noch mal ausführlich in Kap. 3.8 behandelt.

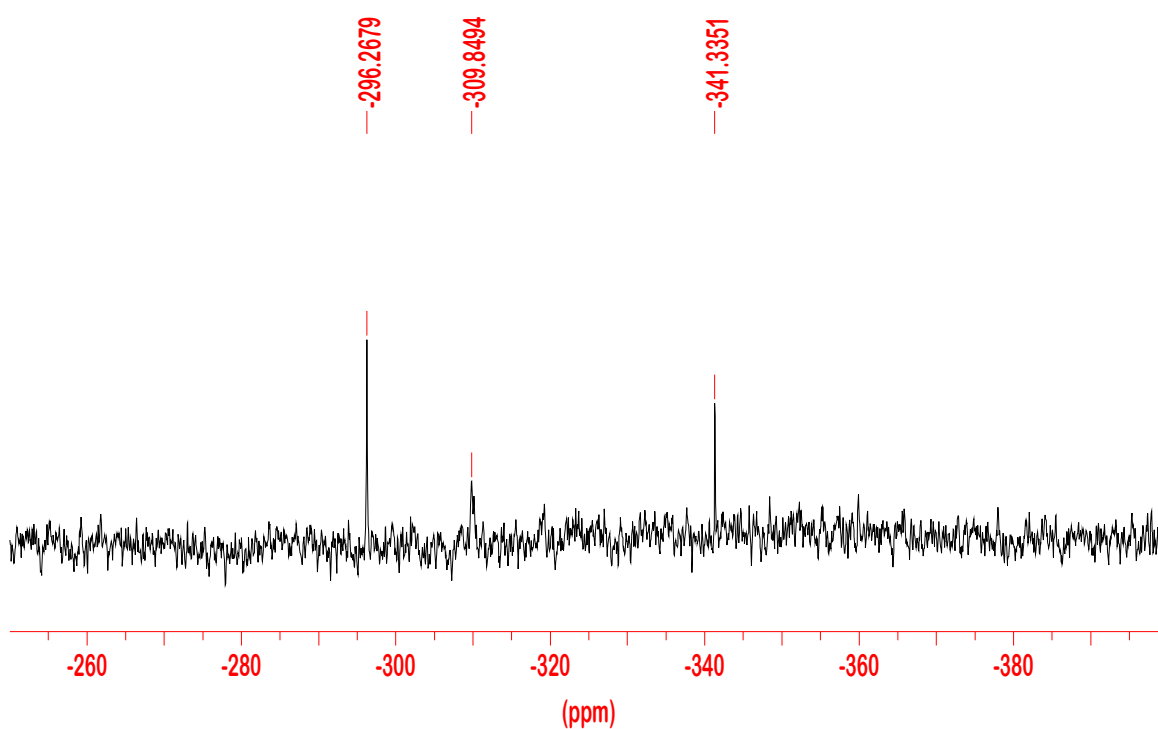
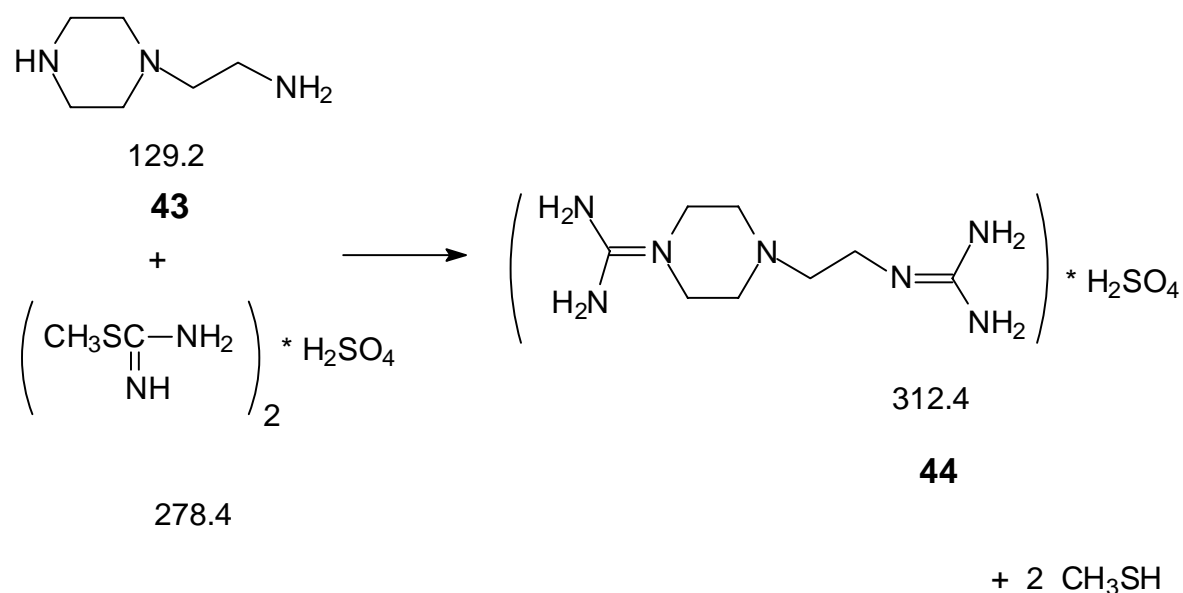


Abb. 30: <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum von **42** in D<sub>2</sub>O.

### 3.1.5 Synthese von 1(2-Guanidiniumethyl)-piperazinguanidiniumsulfat **44**



Verbindung **44** ist neu und wurde mit der Synthese-Strategie 2<sup>[85-88, 90]</sup> gemäß Gl. 13 durchgeführt. Beim Produkt handelt es sich um einen farblosen kristallinen Feststoff, der an der Luft stabil ist. Die Aufbewahrung erfolgt dennoch in einem N<sub>2</sub>-Kolben unter Argon.

Da Verbindung **43** bereits während der Diplomarbeit verwendet und untersucht worden war, war die mögliche Synthese der Guanidin-substituierten Verbindung von Interesse. Es wurden unterschiedliche Strategien versucht, um die am prim. Amino-Stickstoffatom substituierte Verbindung zu erhalten. Sämtliche Versuche blieben erfolglos. Es wurde stets die mit zwei Guanidiniumgruppen substituierte Verbindung **44** erhalten, die mit Hilfe der Elementaranalyse und der NMR-Spektroskopie charakterisiert wurde.

Das in D<sub>2</sub>O aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 31) zeigt vier Triplets. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe der <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten und der Integrationswerte. So gehört das Triplet bei 3.48 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 5.2 Hz und einem für vier Protonen entsprechenden Integrationswert den zwei Methylengruppen, die sich im Ring um

das nun zur Guanidinium-Gruppe gehörendem N-Atom befinden. Bei einer chemischen Verschiebung von 3.36 ppm ist ein weiteres Triplett mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.4 Hz und einem Integrationswert gültig für zwei Protonen zu finden. Dieses Signal wird den zwei Methylen-Protonen in der Seitenkette in direkter Nachbarschaft zu der zweiten Guanidiniumfunktion im Molekül zugeordnet. Das dritte Signal bei 2.67 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.4 Hz und einem für zwei Protonen gültigen Integrationswert ist der Methylengruppe der Seitenkette zuzuordnen, die am tert. Amino-N-Atom gebunden ist. Ein letztes Signal bei 2.64 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 5.2 Hz und einem Integrationswert, der vier Protonen entspricht, wird den restlichen Methylen-Protonen im Ring um das tert. Amino-N-Atom zugesprochen.

Es sind weitere Signale geringerer Intensität zu beobachten, diese könnten zum einen dem Ausgangsamin gehören, sie könnten aber auch monosubstituiertes Guanidinium-Sulfat zu erkennen geben.

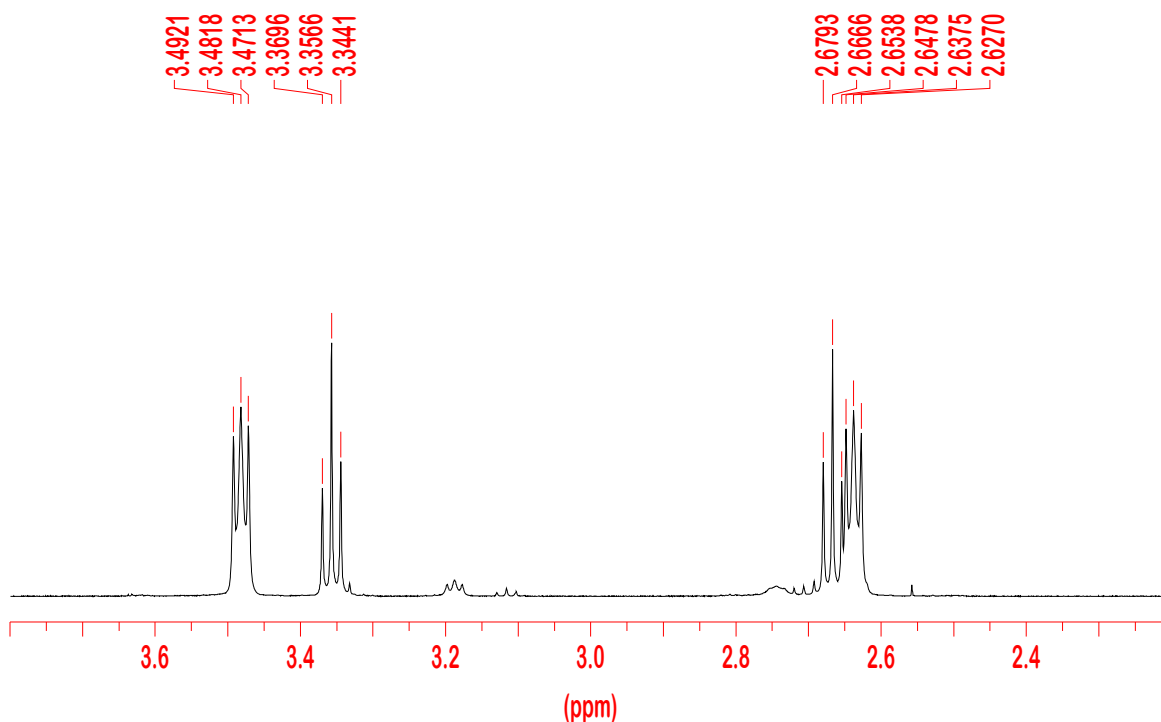


Abb. 31:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **44** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt, wie erwartet zwei Guanidinium-Signale mit einer chemischen Verschiebung von 159.0 und 159.8 ppm. Die restlichen Signale wurden mit Hilfe von H-H- und C-H-Korrelationsspektren zugeordnet. Das Signal bei 40.9 ppm wird dem Methylen-C-Atom der Seitenkette in unmittelbarer Nachbarschaft der Guanidin-Gruppe zugewiesen, während bei 47.4 ppm das Signal der beiden Methylen-C-Atome im Ring in unmittelbarer Nachbarschaft der anderen Guanidinium-Gruppe zu finden ist. Bei 53.9 ppm ist das Signal, das den anderen Methylen-C-Atomen des Piperazinringes zugeordnet wird. Das letzte Signal bei 58.1 ppm stammt aus dem C-Atom des Ethylenrestes in Nachbarschaft zum Ring. Es sind noch zwei Signale bei 26.7 und 66.5 ppm zu beobachten. Diese Signale gehören dem Isopropanol. Weitere schwache Signale können nicht umgesetztem Ausgangsamin, aber auch monosubstituiertem Guanidinium-Sulfat zugeordnet werden.

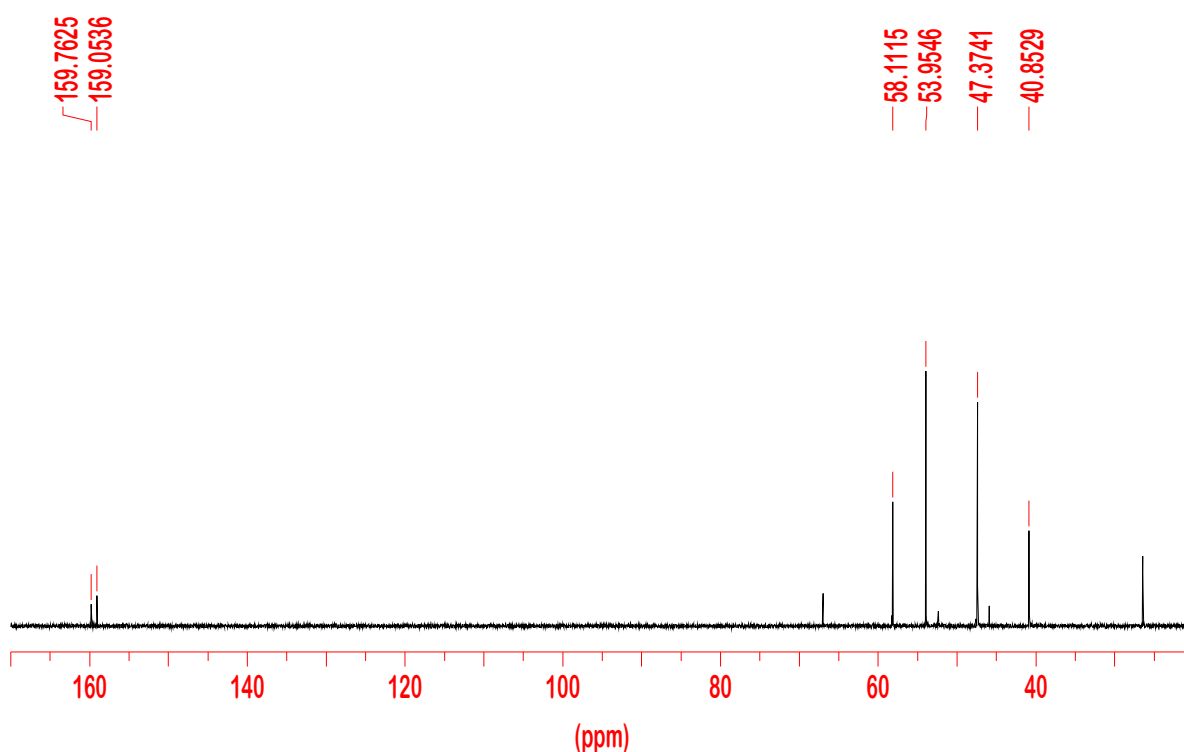
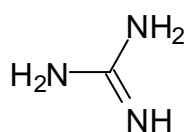
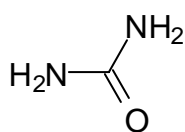
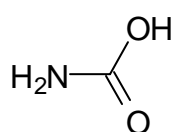
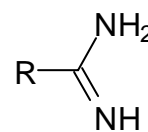


Abb. 32:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **44** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

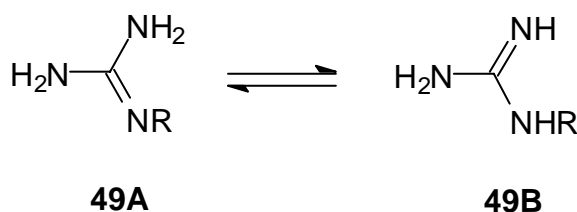
Diese Verbindung wurde nicht weiter untersucht, weil sie über keine sek. Aminofunktion verfügt, so dass eine NONOat-Bildung nicht möglich sein sollte.

### 3.2 Darstellung der freien Guanidine

Guanidine **45** können formal als die Imide von Harnstoff **46** oder die Imidine **48** von der Carbaminsäure **47** betrachtet werden. Die Chemie dieser Verbindungen ist eng mit der Chemie von Amidinen verwandt.

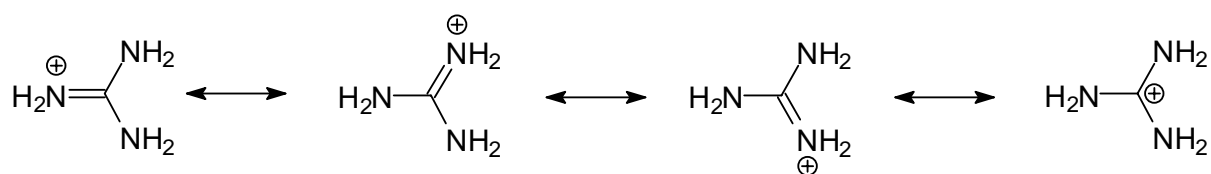
**45****46****47****48**

Die tautomeren Formen **49A** und **49B** der Guanidin-Gruppe zeigen nach Röntgenstrukturanalysen, dass **49A** bevorzugt wird, wenn R ein elektronenziehender Substituent ist. Guanidine gehören zu den stärksten organischen Basen überhaupt, die Basenstärke von Guanidin ist vergleichbar mit der von Natriumhydroxid. Die C-N-Bindungen in Guanidin- und Guanidiniumionen **50** besitzen einen partiellen Doppelbindungscharakter. Die Einführung von Substituenten an dieser Gruppe (Guanidin- und Guanidiniumgruppe) ändert den Charakter aller C-N-Bindungen. In diesem Zusammenhang wurden auch die Isomerisierungsbarrieren untersucht und diskutiert.<sup>[102, 103]</sup>

**49A****49B**

Die bemerkenswerte Stabilität des Guanidinium-Ions **50** wurde in der Literatur<sup>[105-109]</sup> auf der Basis der sog. Y-Delokalisierung (bzw. Y-Aromatizität), aber auch der Resonanz<sup>[110]</sup> diskutiert und erklärt. Zu der Freisetzung von Guanidinen gibt es in der Literatur<sup>[111]</sup> wenige Hinweise. Freies Guanidin (**49** mit R=H) ist

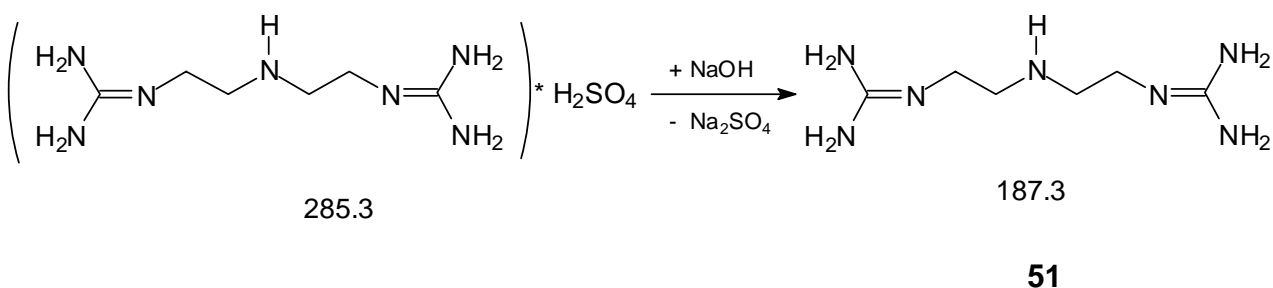
stark basisch ( $pK_a$  13.6),<sup>[112]</sup> sehr hygroskopisch und kristallin (Schmp. 48 – 49 °C).<sup>[113]</sup> Es absorbiert Kohlendioxid und wurde bei der Behandlung von alkoholischen Lösungen von Guanidiniumperchlorat mit KOH isoliert.<sup>[113, 114]</sup> In wässrigen Lösungen wird das Guanidin sehr langsam hydrolysiert. Zuerst entsteht Harnstoff und dann evtl. Kohlendioxid und Ammoniak. In Anwesenheit von Alkali erhöht sich die Hydrolysegeschwindigkeit. 34 % einer Guanidin-Lösung (1.3 M) wird hydrolysiert unter Bildung von Harnstoff bei Raumtemperatur nach 41 Tagen in Anwesenheit von 1 Äq. NaOH. Im Gegensatz dazu sind 19 % nach 31 Tagen ohne NaOH-Zugabe hydrolysiert.<sup>[93]</sup> Die Hydrolyse von Guanidin ist reversibel und in der Tat wurde schon über die Bildung von Guanidin aus Harnstoff und Ammoniak<sup>[94]</sup> berichtet. Die Ausbeute basierend auf Harnstoff ist aber nicht größer als 30 %.



## 50

Die Darstellung des freien Guanidins ist die entscheidende Stufe in der Synthese von NONOaten auf der Basis dieser Verbindungen.

### 3.2.1 Freisetzung des Bis-(2-guanidinethyl)-amins **51** aus **38**



Zuerst wurde eine wässrige Guanidiniumsalz-Lösung mit KOH versetzt, es wurde so viel festes KOH zugegeben, bis sich ein Öl abschied. Dieses Öl wurde abgetrennt und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht, dabei wurde die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten bzw. eine unzureichende Umsetzung des Eduktes beobachtet.

Analog zu der in der Literatur<sup>[111]</sup> beschriebenen Darstellung bestand die zweite Methode darin, das Guanidiniumsalz in Methanol zu suspendieren. Zu dieser Suspension wurde dann NaOH in fester Form zugegeben. Nach 18 h entstand eine trübe Lösung, aus der sich eine gelartige farblose Substanz absetzte. Es wurde erfolglos versucht, die Reaktionsmischung zu filtrieren. Zugabe von Isopropanol erleichterte das Abfiltrieren, die filtrierte Lösung blieb dennoch trüb. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 33) sind die Signale von **51** zu finden: bei 2.90 ppm und mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.4 Hz finden sich die Signale der Methylengruppen neben den beiden Guanidingruppen, während bei 2.44 ppm und mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.3 Hz die Signale der Methylengruppen um das sek. Amin-N-Atom zu beobachten sind. Ebenfalls vorhanden sind bei 3.70 und 0.90 ppm die Signale von Isopropanol und im Bereich von 3.3 - 3.5 ppm weitere schwache Signale, die auf eine Zersetzung des Produktes hindeuten.

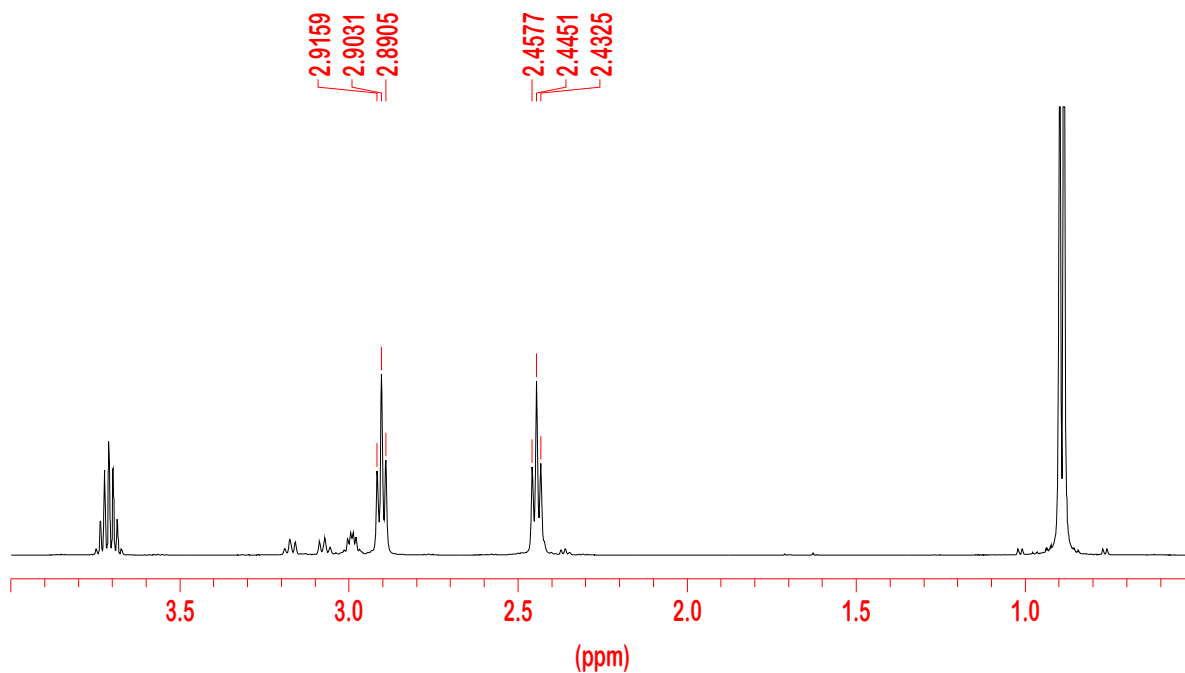


Abb. 33:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **51** und Isopropanol in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 34), in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen, zeigt neben den Signalen für Isopropanol bei 26.7 und 66.5 ppm die drei erwarteten Signale für das Guanidin bzw. Guanidiniumhydroxid, welches in  $\text{D}_2\text{O}$  vorliegt. Im Vergleich zum Guanidinium-Sulfat ist eine Verschiebung ins Tieffeld von 157.0 ppm beim Sulfat zu 162.3 ppm zu beobachten. Bei einer chemischen Verschiebung von 166.8 ppm findet sich ein weiteres Signal, das wohl dem Zersetzungsprodukt zugeordnet werden kann. Es sind weitere Signale im Hochfeld zu sehen, die auch dem Zersetzungsprodukt zugeordnet werden können. Diese Signale sind mit denen in Abschnitt 3.1.1 erwähnten identisch. Es ist wahrscheinlich das Harnstoffderivat<sup>[93, 94]</sup> entstanden.

Eine andere Methode der Freisetzung bestand darin, das Sulfat mit einer Suspension bestehend aus einer wässrigen 50proz. KOH-Lösung und Acetonitril zu versetzen. Dabei war die Entstehung eines leicht gelblichen Öles zu beobachten, das sich in die organische Phase wieder löste. In den NMR-Spektren ist die Bildung des Guanidins festzustellen, daneben ist aber auch die Bildung eines Nebenprodukts sichtbar. Hierbei handelt es sich um Acetat, das Hydrolyseprodukt

von Acetonitril. Die basenkatalysierte Bildung von Acetat aus Acetonitril ist in den Lehrbüchern der Organischen Chemie beschrieben. Vermutlich ist das Guanidiniumacetat als Nebenprodukt entstanden.

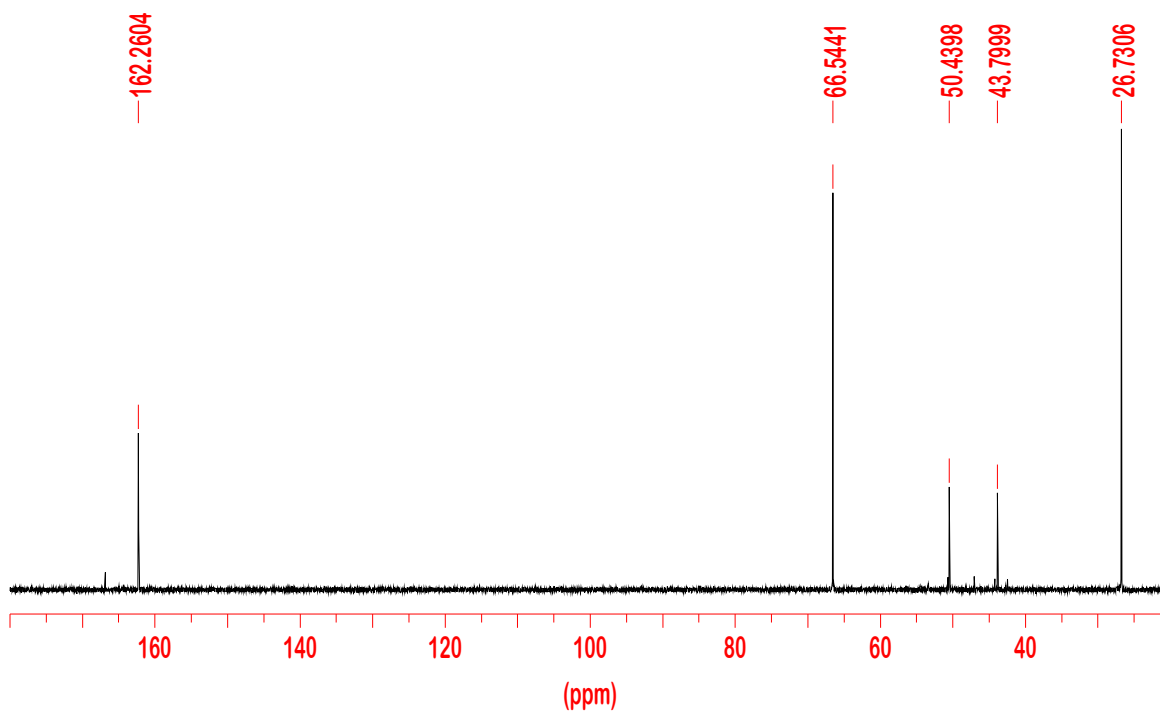


Abb. 34:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **51** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Die beste Methode wurde gefunden, als das Guanidiniumsalz in Acetonitril suspendiert wurde. NaOH wurde in Ethanol gelöst und äquimolar zu der Suspension bei Raumtemperatur zugegeben. Die alkoholische NaOH-Lösung wurde innerhalb von 60 min zugetropft. Nach weiteren 120 min entstand eine klare Lösung, aus der sich nach weiteren 120 min ein Niederschlag bestehend aus Natriumsulfat absetzte. Die Lösung konnte dann vom Niederschlag mit Hilfe einer Umkehrfritte befreit werden, sie wurde am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 60 hPa und einer Temperatur von 30 °C schonend auf etwa 20 Vol.-% eingengt. Wenngleich Nebenprodukte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu beobachten waren, so waren ihre Intensitäten viel geringer als bei den anderen Methoden. Zur Quantifizierung des entstandenen freien Guanidins wurde eine quantitative NMR-Analyse mit 1,4-Dioxan als externem Standard durchgeführt. Die Ausbeute bezo-

gen auf das freie Guanidin betrug 98 %. Diese Lösung wurde direkt mit NO weiter umgesetzt.

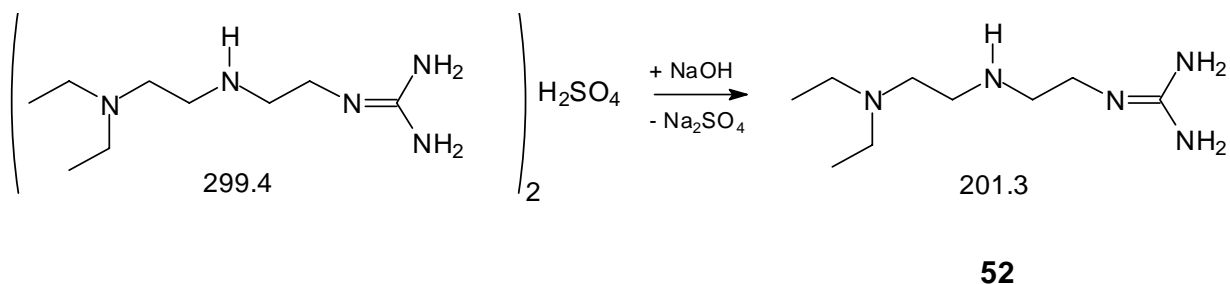
Formell könnte man die Bildung eines Guanidiniumhydroxids vermuten. Die quantitativen NMR-Analysen mit D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel können keinen endgültigen Hinweis auf die Bildung des freien Guanidins bzw. auf die Anwesenheit des Guanidinium-Ions geben. Sobald das freie Guanidin mit D<sub>2</sub>O in Kontakt tritt, können beide Formen nicht mehr voneinander deutlich unterschieden werden.

### *Isolierung kristallinen 51*

Ausgehend aus der Beobachtung, dass die Guanidin-Lösung in Isopropanol beim Versetzen mit Acetonitril trüb wurde, konnte das reine freie Guanidin isoliert werden. Dazu wurde die Lösung an die Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 80 Pa und Raumtemperatur 48 h angeschlossen. Es entstand eine ölige klare Substanz, die mit einer geringen Menge an Methanol (100 mg Öl in 3 – 5 mL Methanol) versetzt und gelöst wurde. Bei der Zugabe von Acetonitril beobachtete man eine Trübung der Lösung, es wurde so viel Acetonitril zugegeben, bis eine milchige Lösung entstand. Aus dieser Lösung bildeten sich dann innerhalb von einer Stunde kleine Kristalle, die weiter wuchsen. Nach 48 h wurden die Kristalle mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Lösung befreit und anschließend zur Entfernung von Lösungsmittelresten an die Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 80 Pa und Raumtemperatur angeschlossen.

Die Elementaranalyse bestätigte die Bildung des freien Guanidins. Die Kristalle waren zu klein, um eine Röntgenstrukturanalyse durchführen zu können.

### 3.2.2 Freisetzung des 2-(2-Diethylaminoethylamino)-ethylguanidinis **52** aus **40**



Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein farbloses Öl. Dieses Öl ist sehr empfindlich an Luft und wird beim Stehen allmählich braun. Die Aufbewahrung erfolgt in einem Stickstoffkolben unter einer Argon-Atmosphäre. Das Öl ist in organischen Lösungsmitteln, wie Acetonitril, Isopropanol, Methanol, Ethanol usw. gut löslich, so dass eine weitere Umsetzung mit Stickstoffmonoxid einfach möglich ist.

Die Freisetzung des Guanidins **52** wurde in analoger Weise zu der von **51** durchgeführt. Nach Zugabe der NaOH-Lösung in Isopropanol bildete sich eine Suspension. Es konnte keine Niederschlagsbildung beobachtet werden. Die Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer bei 35 °C und 60 hPa auf 30 Vol.-% eingengt. Es konnte immer noch kein Niederschlag beobachtet werden. Beim Stehen lassen war das Absetzen einer gelartigen durchsichtigen Substanz festzustellen. Versuche, dieser Substanz mit Hilfe von Umkehrfritten zu isolieren, blieben erfolglos. Durch Zentrifugieren und anschließendes Dekantieren konnte schließlich der gelartige Rückstand erhalten werden. Die verbleibende Lösung wurde noch mal am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 50 hPa und Raumtemperatur eingengt. Das 200-MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt neben Isopropanol die Anwesenheit des freien Guanidins und weitere Nebenprodukte in geringer Konzentration, die vermutlich einer Zersetzung des Guanidins zu Grunde liegen.

Zur besseren Abtrennung des Natriumsulfats wurde in einem weiteren Ansatz die Suspension am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 50 – 60 hPa

und Raumtemperatur auf 30 Vol.-% eingengt. 50 mL Acetonitril wurden dazu gegeben, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete, der mit Hilfe einer Umkehrfritte einfach abgetrennt werden konnte. Der Niederschlag wurde mit Acetonitril gewaschen. Die entstandene Lösung wurde zuerst am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 50 – 60 hPa und Raumtemperatur weitestgehend eingengt. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten wurde sie an die Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 8 hPa und Raumtemperatur 48 h angeschlossen. Es bildete sich ein hellbraunes Öl. Es wurden unterschiedliche Strategien verfolgt, um das Öl in einen festen Zustand zu überführen. Es wurde zum Beispiel versucht, das Öl bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa über  $P_2O_5$  zu trocknen. Alle Versuche blieben jedoch erfolglos, bei dieser Substanz handelt es sich offensichtlich um ein farbloses visköses Öl, das beim längeren Stehen braun wird.

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde auch hier die quantitative NMR-Spektroskopie mit Hilfe von 1,4-Dioxan als externer Standard herangezogen. Nach den Ergebnissen dieser Messungen konnte man das freie Guanidin quantitativ isolieren.

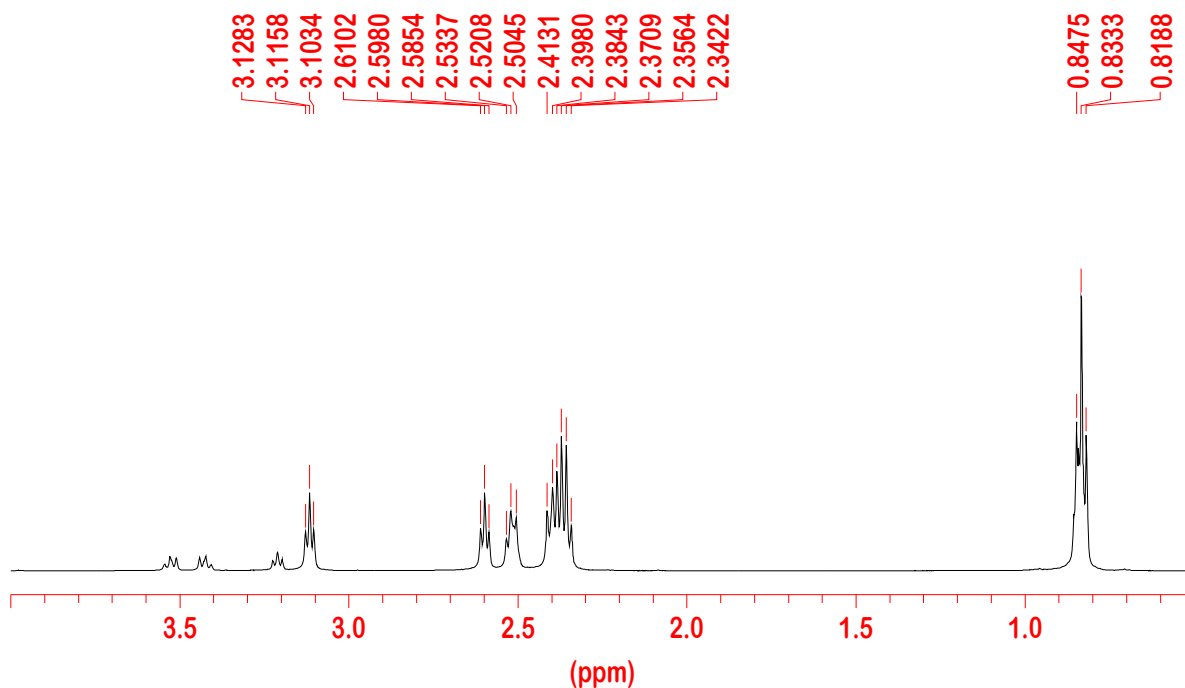
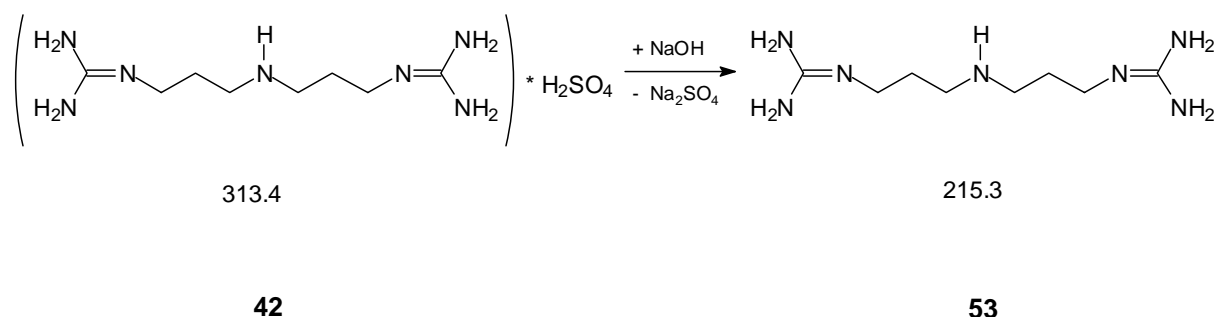


Abb. 35:  $^1H$ -NMR-Spektrum von **52** in 3 M NaOD in  $D_2O$ .

### 3.2.3 Freisetzung des Bis-(3-guanidinpropyl)-amins 53 aus 42



Bei dieser Substanz handelt es sich um einen farblosen Feststoff, der nicht hygroskopisch und an der Luft stabil ist. Die Aufbewahrung erfolgt dennoch in einem Stickstoffkolben unter Argon. Im Gegensatz zu den anderen zwei freien Guanidinen ist die Handhabung dieser Substanz einfacher. Es war sogar möglich, den Schmelzpunkt zu bestimmen, sowie eine Charakterisierung durch Elementaranalyse, IR- und NMR-Spektroskopie sicherzustellen. Die Elementaranalyse beweist, dass es sich bei dem isolierten Feststoff um das freie Guanidin handelt und nicht um das Guanidiniumhydroxid, was auch denkbar ist.

Bei dieser Freisetzung wurde analog zu den vorangegangenen verfahren. Es entstand ein farbloses Öl, das zur Entfernung von Lösungsmittelresten an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 80 Pa und Raumtemperatur 10 h behandelt wurde. Das farblose Öl stand weitere 3 Tage unter Lichtausschluss. Nach Ablauf dieser Zeit hatten sich eine farblose feste Substanz und eine Restflüssigkeit gebildet. Die Substanz wurde noch mal an die Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 80 Pa und Raumtemperatur 48 h angeschlossen. Die farblose feste Substanz wurde mechanisch zu einem feinen farblosen Pulver zerkleinert.

Eine quantitative Ausbeute wurde ebenfalls erreicht.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, aufgenommen in  $\text{D}_2\text{O}$  ist durch drei Signalgruppen der Intensitäten 2:2:2 gekennzeichnet. Das Quintett bei 1.33 ppm zeigt zwei unterschiedliche  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten für den Bereich 1.33 – 1.36 einen  $^3\text{J}$ -Wert von 7.3 Hz und für den Bereich 1.33 – 1.30 ppm einen  $^3\text{J}$ -Wert von 7.0 Hz gehört

den Methylenprotonen in der Mitte der Propylkette. Das Tripletts bei 2.23 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.3 Hz gehört den Methylenprotonen in unmittelbarer Nachbarschaft der sek. Aminofunktion, während das Tripletts bei 2.73 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.0 Hz den Protonen der Methylengruppen in der Nähe der Guanidin-Gruppen zuzuordnen ist.

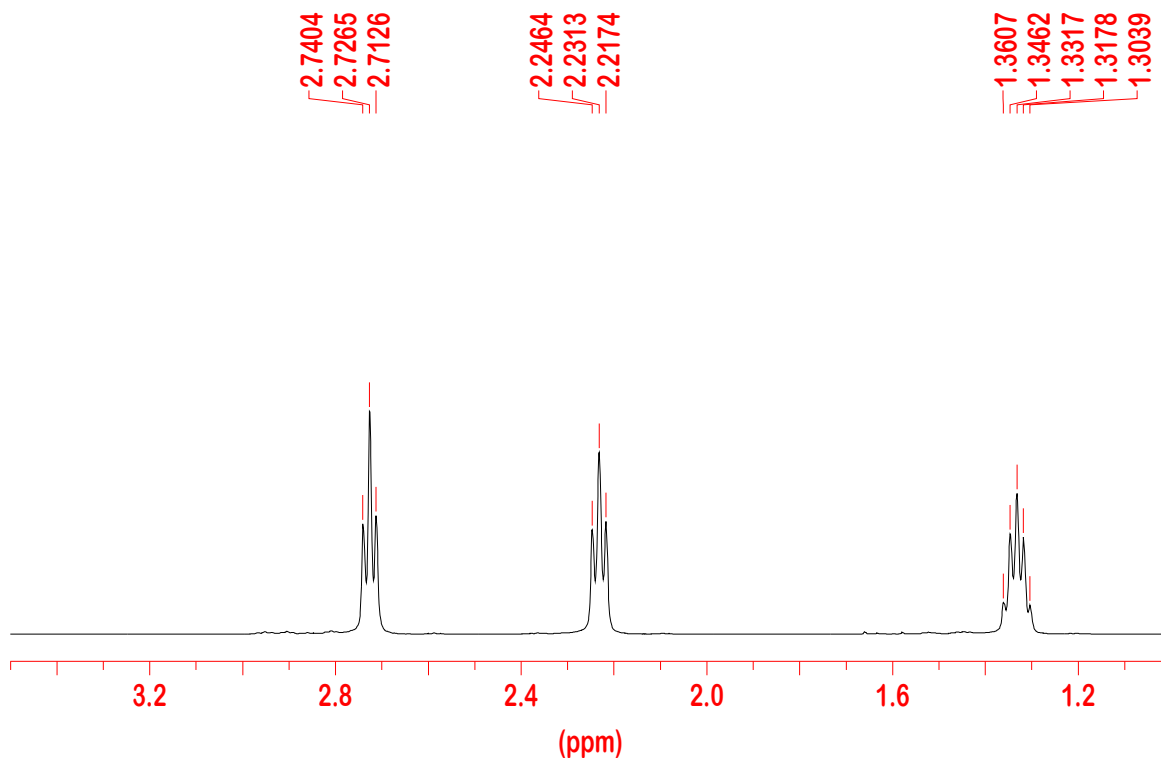


Abb. 36:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **53** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum zeigt vier Signale. Das Signal bei 28.7 ppm gehört den Methylen-C-Atomen in der Mitte der Propylkette. Das Signal bei 39.6 ppm wird den Methylen-C-Atomen in unmittelbarer Nachbarschaft der sek. Aminofunktion zugeordnet. Das dritte Signal bei 46.2 ppm ist den Methylen-C-Atomen in unmittelbarer Nachbarschaft der Guanidin-Gruppe zuzuordnen. Das letzte Signal bei 159.5 ppm stammt von den Guanidin-C-Atomen.

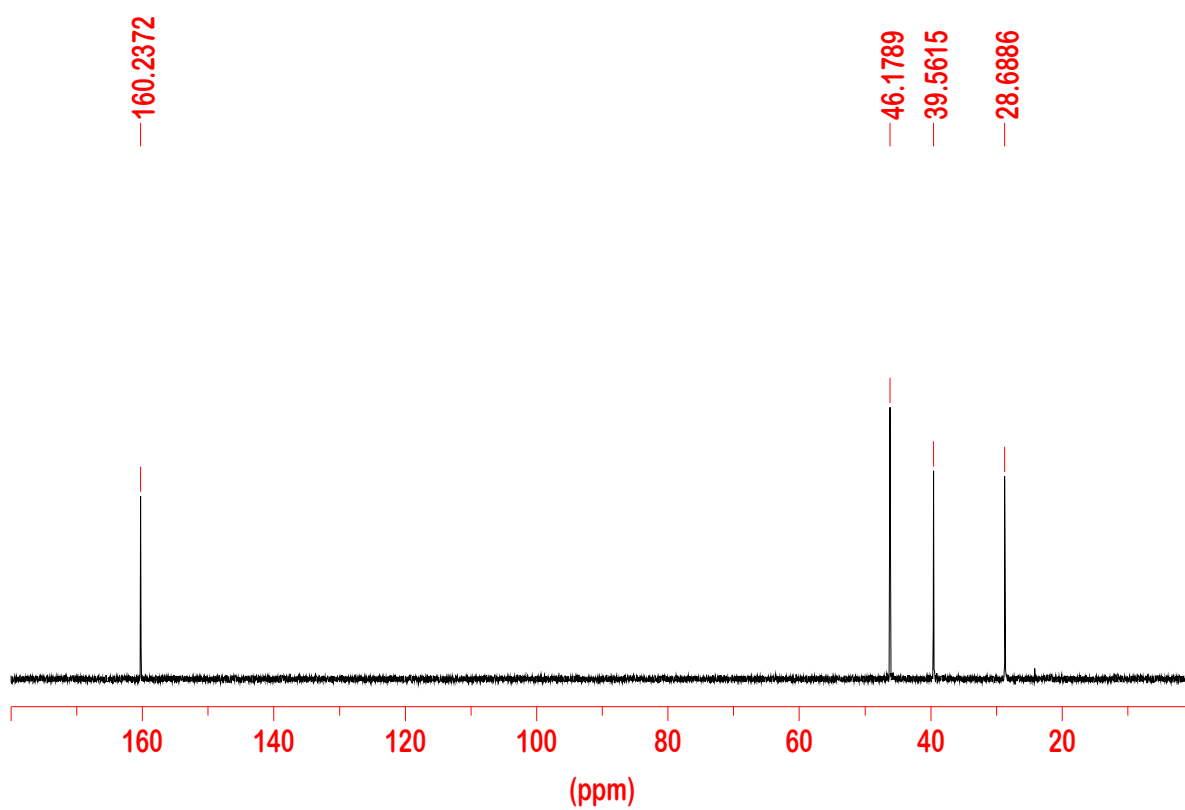


Abb. 37:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **53** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

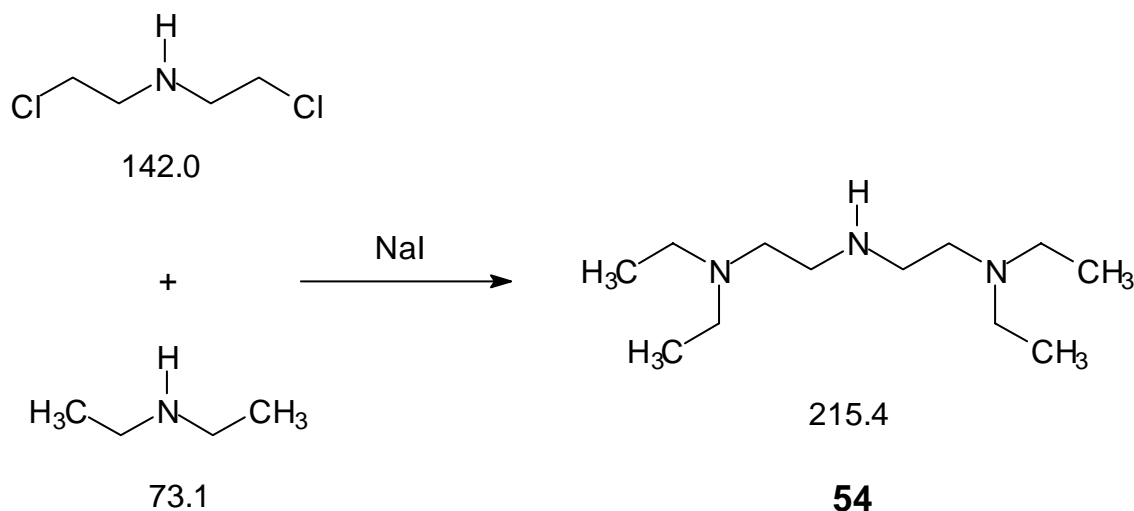
### 3.3 Weitere Synthesen

Es sind wenige Untersuchungen vorhanden, die sich mit Substituenteneffekten (insbesondere Alkyl-Substituenten) am Gerüst von *N*-Diazeniumdiolaten und ihrem Einfluss auf die Stabilität dieser Verbindungen auseinandersetzen.<sup>[57, 73, 115, 116]</sup> Die stabilste wasserlösliche Verbindung ist das NONOat aus dem Diethylentriamin mit einer unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4 und 37 °C) gemessenen Halbwertszeit des Zerfalls von 20 h. Die nächst stabilste Verbindung ist das NONOat aus Bis-(3-aminopropyl)-amin und besitzt laut Literatur<sup>[62]</sup> eine Halbwertszeit von 83 min, gemessen unter gleichen Bedingungen. Der Unterschied zwischen den beiden Gerüsten besteht in einer zusätzlichen Methylengruppe zwischen der terminalen Amino- und der Aminofunktion, an der die Diazeniumdiolat-Gruppe gebunden ist. Bekannt ist auch die Stabilisierung der Verbindungen, wenn man das Grundgerüst des Ethylendiamins mit einfachen Alkylketten substituiert.<sup>[57]</sup>

Interessant im Rahmen dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Effekte eine Substitution am Diethylentriamin (DETA)-Gerüst und anschließender Umsetzung im Autoklaven mit Stickstoffmonoxid auf die Stabilität und auf das generelle Verhalten des resultierenden NONOats haben könnte. In diesem Sinne wurden zwei substituierte Diethylentriamine synthetisiert. Das erste mit 4 Methyl- und das zweite mit 4 Ethyl-Substituenten an den terminalen Stickstoffatomen des Diethylentriamins.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Amine zu synthetisieren. Zwei Strategien wurden verfolgt: die erste Strategie bestand in der Umsetzung nach einer Leuckart-Wallach-Variante, bei der das Amin mit Formaldehyd und Ameisensäure umgesetzt wird. Die zweite Variante stellte die Reaktion von Aminen mit Alkylhalogeniden dar. Bei der Leuckart-Wallach-Reaktion konnte mit Hilfe der GC-Chromatographie und NMR-Spektroskopie festgestellt werden, dass neben den erwünschten Produkten eine ganze Reihe von unterschiedlich substituierten Aminen entstanden war, so dass mit Hilfe dieser Methode eine gezielte Substitution und Isolierung nicht möglich war.

### 3.3.1 Synthese von Bis-(2-diethylaminoethyl)-amin 54



Die Synthese dieser Verbindung erfolgte nach einer geänderten in der Literatur<sup>[117, 118]</sup> vorhandenen Vorschrift. Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine farblose, klare Flüssigkeit, die luftempfindlich ist. Die Aufbewahrung erfolgt in einem Stickstoffkolben unter Argon und im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C.

Für die Darstellung des tetraethylsubstituierten Diethylentriamins wurde die Umsetzung von Bis-(chloroethyl)-amin als Hydrochlorid mit Diethylamin verwendet. Dabei wurde das Diethylamin im Überschuss eingesetzt. Die Reaktion wurde in Wasser und in der Siedehitze durchgeführt; im Laufe der Reaktion färbte sich die Lösung gelb. Um einen besseren Umsatz zu erzielen, wurde eine Spatelspitze NaI in 5 mL Wasser gelöst und durch den Intensivkühler der Reaktionsmischung zugegeben. Nach dem Erkalten wurde das Amin mit Hilfe von 50proz. KOH-Lösung freigesetzt, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend fraktionierend destilliert.

Es wurden Ausbeuten von 33 - 34 % erreicht, wobei keine Syntheseoptimierung durchgeführt wurde. Die in der Literatur<sup>[117, 118]</sup> angegebene Ausbeute beträgt 34 %.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 38) zeigt drei Signalgruppen. Erwartet werden eigentlich vier Gruppen. Im Spektrum überlagern sich zwei dieser Signale. Das Molekül ist symmetrisch und die beiden inneren Ethylgruppen zeigen ein typisches AA'BB'-Muster. Zwei Triplets sind im Bereich 2.58 und 2.45 ppm zu finden. Beide Triplets gehören den inneren Methylengruppen, wobei das tieffeldverschobene Signal der Methylengruppe, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der neuen tert. Aminofunktion befindet, zugeordnet wird. Ein Quartett ist im Bereich 2.43 ppm zu erkennen. Dieses Signal gehört der Methylengruppe der Ethyl-Substituenten. Das verbleibende Signal bei 0.91 ppm mit einer  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten von 7.3 Hz ist den Methylgruppen der Ethyl-Substituenten zuzuordnen.

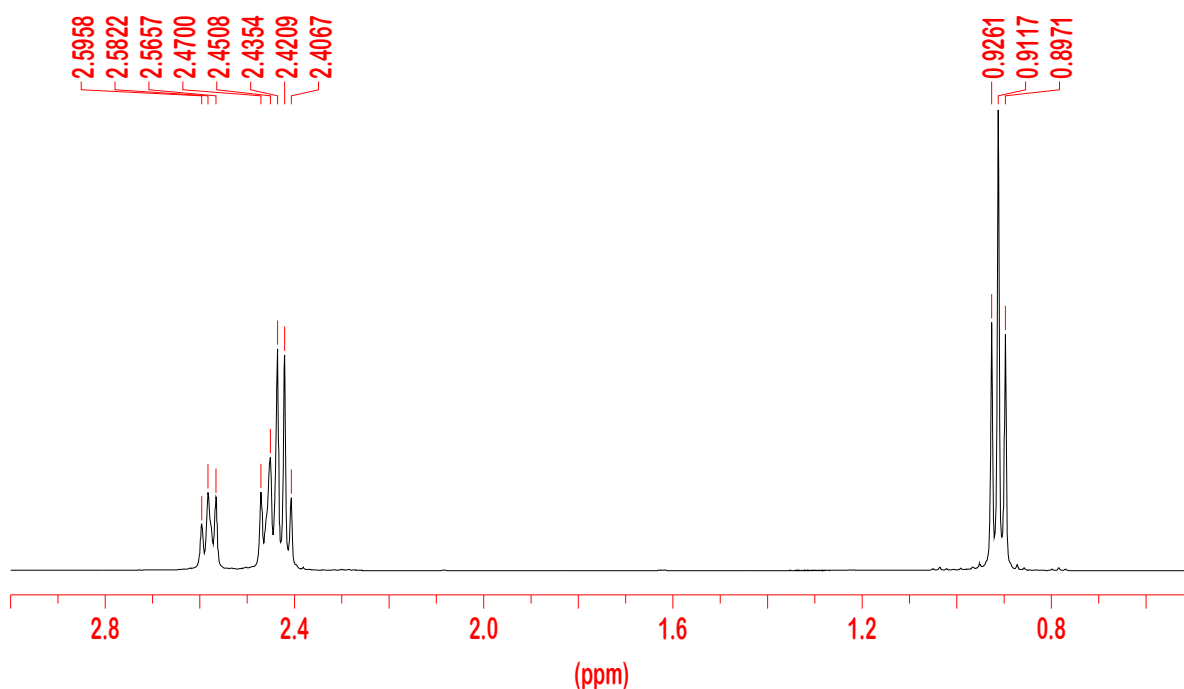


Abb. 38:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **54** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt vier Signale. Bei einer chemischen Verschiebung von 50.9 ppm findet sich das Signal, das den Methylen-C-Atomen in unmittelbarer Nachbarschaft der jetzt vorhandenen tert. Aminofunktion gehört. Bei 46.7 ppm ist das Signal der vier Methylen-C-Atome in den Ethyl-Substituenten. Bei 45.5 ppm sind Signale der zwei Methylen-C-Atome, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der sek. Aminofunktion in der Mitte des Moleküls befinden. Schließlich wird das Signal bei 10.3 ppm den Methyl-C-Atomen in den Ethyl-Substituenten zugeordnet.

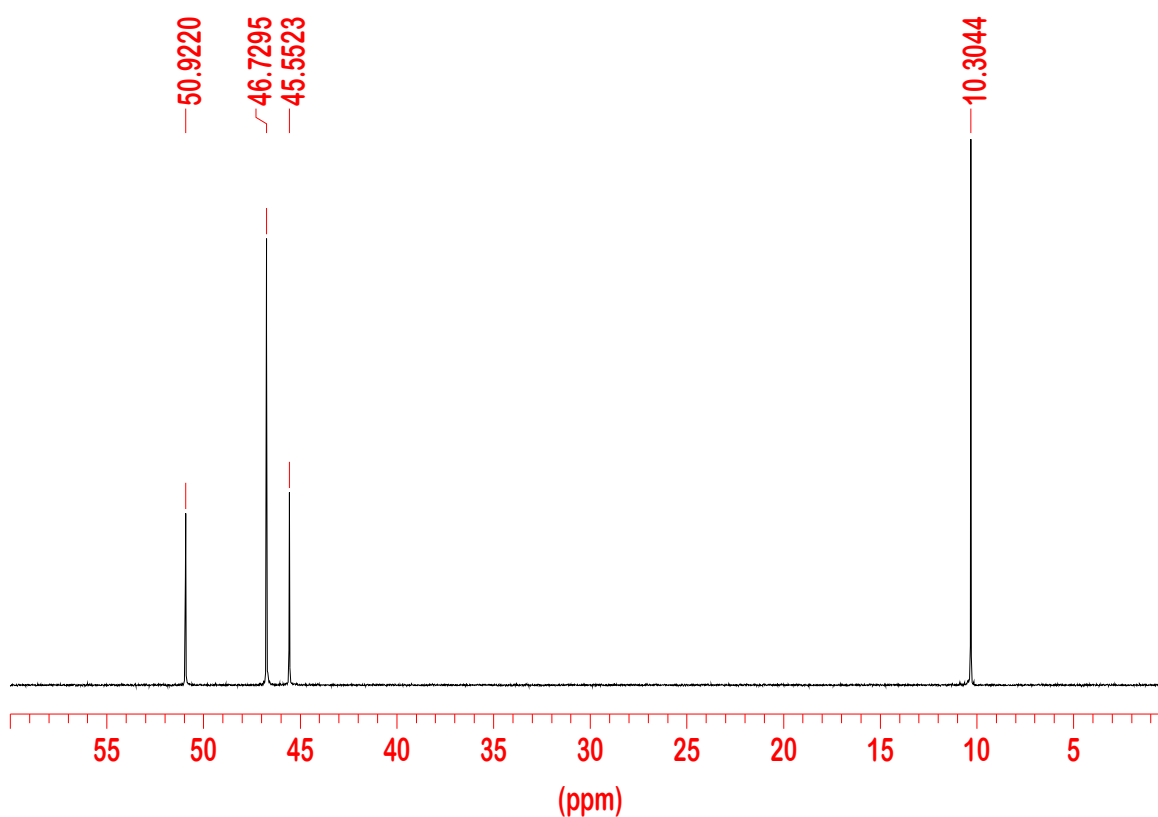


Abb. 39:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **54** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Ein  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum wurde angefertigt, um eine Charakterisierung der Signale, falls im nächsten Schritt bei der Umsetzung mit Stickstoffmonoxid das NONOat entstehen sollte, zu vereinfachen. Das Signal bei -348.5 ppm gehört der sek. Aminofunktion in der Mitte des Moleküls, während das Signal bei -336.7 ppm den beiden tert. Aminogruppen gehören. Die Zuordnung der Signale wird noch mal in dem gesonderten Kap. 3.8 ausführlich behandelt.

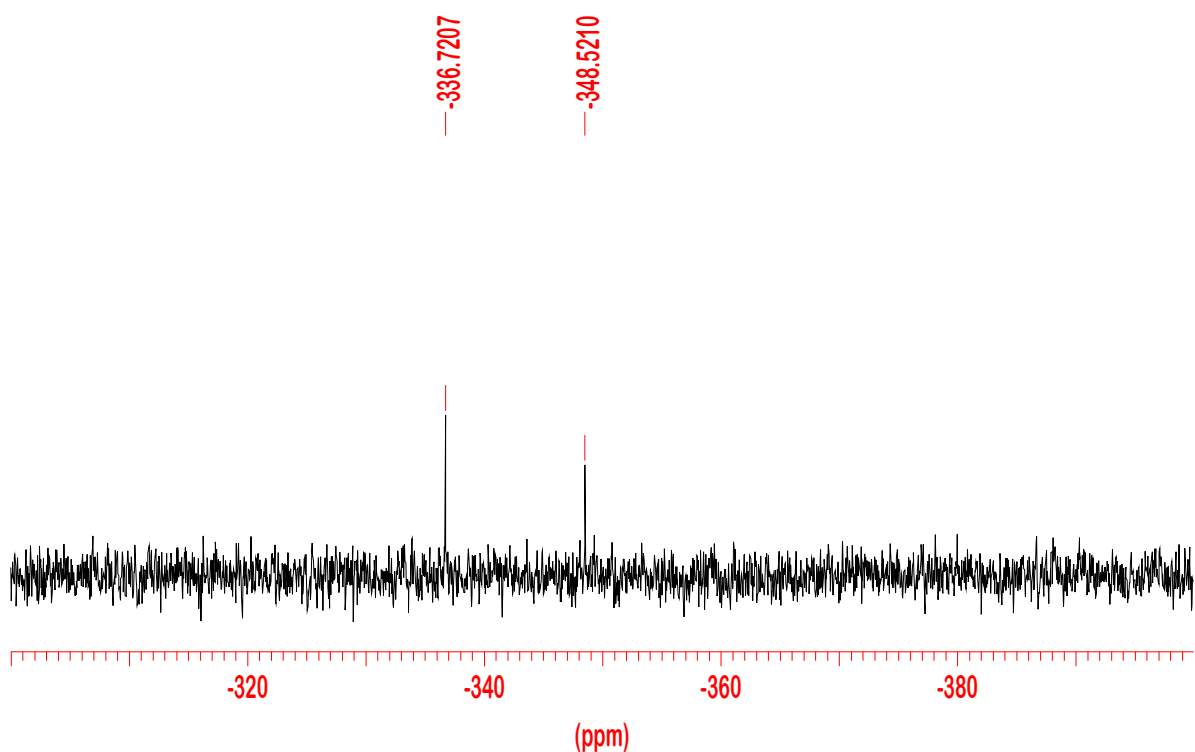
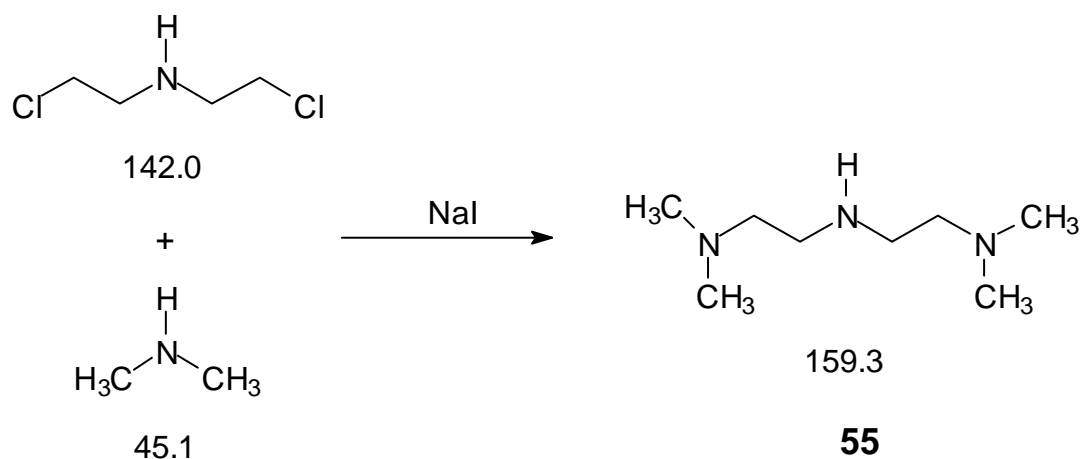


Abb. 40:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **54** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.3.2 Synthese von Bis-(2-dimethylaminoethyl)-amin **55**



Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein farbloses Öl, das sehr luftempfindlich ist. KUPCHAN *et. al.*<sup>[119]</sup> beschrieben eine Synthese ausgehend aus Bis-(2-chlorethyl)-amin und einer 22proz. wässrigen Diethylamin-Lösung bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit 5 M NaOH versetzt und mit  $K_2CO_3$  gesättigt. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe einer neutralen  $Al_2O_3$ -Säule gereinigt. Die angegebene Ausbeute beträgt 21 %.

Bei der hier entwickelten Variante wurden die Reaktanden mit katalytischen Mengen an NaI zusätzlich versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 48 h gerührt und anschließend 6 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das Amin wurde mit Hilfe von KOH freigesetzt, über fein zermörserterem KOH getrocknet und destillativ gereinigt. Die gaschromatographische Analyse ergab eine Reinheit von 99.9 % bezogen auf die Flächenprozent. Die Ausbeuten bei diesen Versuchen bewegten sich im Bereich von 33 – 35 %, was eine Verbesserung gegenüber dem Literaturwert<sup>[119]</sup> von 21 % bedeutet.

Nach der Leuckart-Wallach-Variante entstand auch in diesen Versuchen eine Mischung von Reaktionsprodukten, die nur schwer bzw. gar nicht von einander zu trennen waren.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum spiegelt durch seine drei Signale die Symmetrie des Moleküls wider. Zwei Triplets bei 2.55 und bei 2.31 ppm zeigen ein typisches AA'BB'-Muster. Das ins tieffeldverschobene Signal wird den Methylengruppen in unmittelbarer Nachbarschaft der tert. Aminofunktionen zugeordnet. Das Triplet bei 2.33 – 2.30 gehört dann den Methylengruppen um die sek. Aminofunktion. Schließlich gehört das Singulett bei 2.06 ppm den zwölf Methyl-H-Atomen im Molekül.

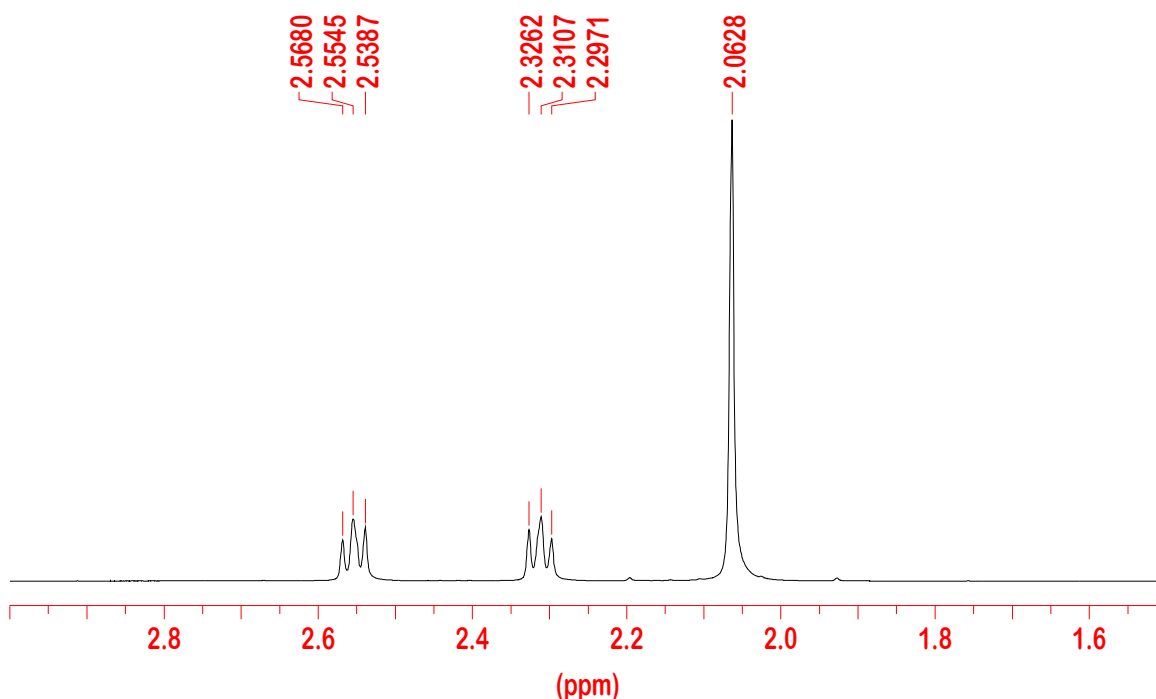


Abb. 41:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **55** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt wie erwartet drei Signale. Das Signal bei 60.1 ppm gehört den Methylen-C-Atomen in Nachbarschaft zu den tert. Aminofunktionen. Das Signal bei 48.5 ppm ist den Methylen-C-Atomen um die sek. Aminofunktion zuzuordnen. Das dritte Signal bei 46.9 ppm gehört den vier Methyl-Substituenten im Molekül.

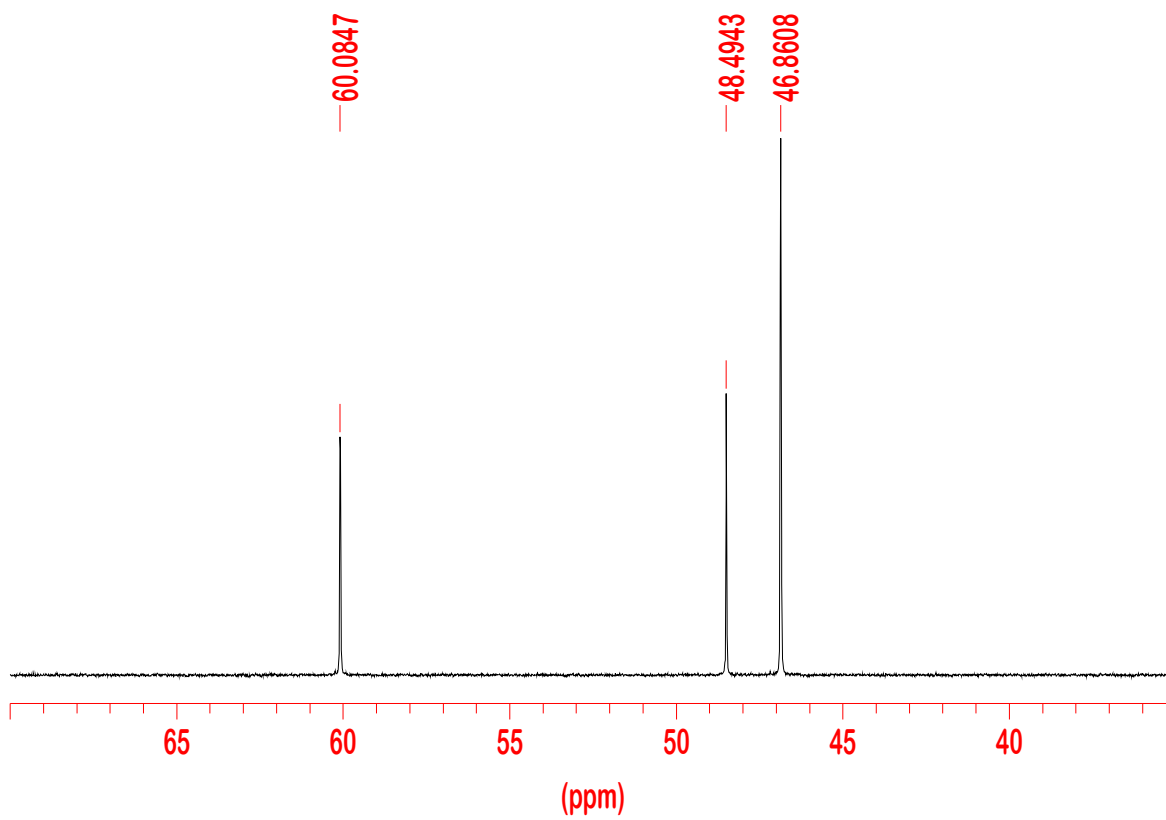


Abb. 42:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **55** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

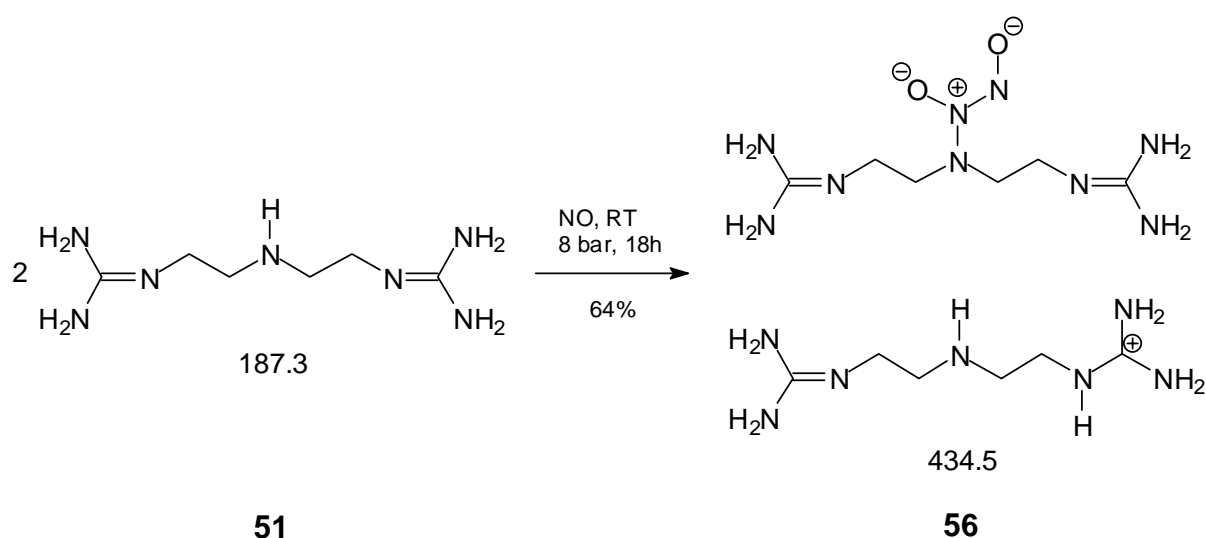
### 3.4 Synthese der Guanidin-NONOate

Es sind eine Reihe von NONOaten bekannt, die sich aus Aminen und Polyaminen<sup>[49, 51-55, 57, 60]</sup> synthetisieren lassen. Die Synthese und Verhalten von geschützten NONOaten wird ebenfalls ausführlich in der Literatur<sup>[62, 68]</sup> beschrieben (s. Kap 1.2.6). Es sind lipophile NONOate<sup>[73]</sup> bekannt, die mit sperrigen Gruppen am Gerüst substituiert sind. Die Existenz und Untersuchung von NONOaten, die am Grundgerüst substituiert sind und der Einfluss der Substituenten auf das Verhalten der NONOate ist anhand von wenigen Arbeiten in der Literatur<sup>[57, 115]</sup> diskutiert.

Die Darstellung von Guanidin-NONOaten war eines der Hauptziele dieser Arbeit. Der Einfluss der Guanidin-Gruppe auf das Verhalten der resultierenden NONOate sollte untersucht werden. Die Guanidin-Gruppe ist eine biologisch relevante Funktion, die einen stark basischen Charakter besitzt.

Die allgemeine Vorschrift für Autoklavenversuche zur NONOat-Synthese wurde überarbeitet. In der Literatur werden die Umsetzungen von sek. Aminen mit Stickstoffmonoxid meistens in aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril, THF oder Diethylether durchgeführt. Es wurde in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt, dass Synthesen auch in protischen Lösungsmitteln, wie Alkoholen möglich sind. Die Rührgeschwindigkeit scheint dabei ein wichtiger Faktor für die Umsetzung zu sein: je schneller gerührt wird, desto höher wird die Tendenz zur Bildung von ölartigen Substanzen, niedrige Umdrehungsgeschwindigkeiten ( $\sim 120 \text{ min}^{-1}$ ) sind für die Bildung eines kristallinen Feststoffes unbedingt notwendig. Ein weiterer wichtiger Faktor, wie es bei den Umsetzungen im Glasautoklaven festzustellen war, ist der Druck. Es sind Drücke von mind. 3 bar erforderlich, damit die Umsetzung im Reaktor stattfinden kann. Anhand des Druckprotokolls, kann die Reaktionsdauer der jeweiligen Umsetzung bestimmt werden. Die empfindlichsten Schritte sind das Befüllen und Entleeren des Reaktors. Ein rasches Arbeiten bei diesen Schritten verhindert die Zersetzung der Produkte, die je nach NONOat am Verschwinden des Niederschlags bemerkbar ist.

### 3.4.1 Umsetzung von Bis-(2-guanidinethyl)-amin mit Stickstoffmonoxid



Die Synthese dieses Moleküls stellte eine Herausforderung dar, da die Vorstufe, das freie Guanidin, sehr luftempfindlich bzw. hygroskopisch ist, das NONOat selbst verhielt sich ebenfalls empfindlich gegenüber Luft. Ein weiteres Problem war die unzureichende Löslichkeit des Eduktes in aprotischen Lösungsmitteln, wie Acetonitril (~ 100 mg in 50 mL Acetonitril) und THF, was die Synthese in einem geeigneten Maßstab erschwerte.

Synthesen von NONOaten in protischen Lösungsmitteln wurden bis heute nicht in der Literatur erwähnt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erfolgreich Synthesen in polar protischen Lösungsmitteln wie Isopropanol oder Methanol durchgeführt werden.

Erste Ansätze wurden mit dem in Isopropanol gelösten freien Guanidin **51** durchgeführt. Der Gehalt an freiem Guanidin wurde mit Hilfe von quantitativen NMR-Analysen mit 1,4-Dioxan als externem Standard ermittelt. Dieser Lösung wurde Acetonitril zugegeben, dabei beobachtete man am Anfang eine Trübung, die jedoch bei weiterer vorsichtiger Zugabe wieder verschwand. Diese Lösung wurde nach der allgemeinen Vorschrift mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 – 7000 hPa 18 – 24 h umgesetzt. Bei der Öffnung des Autoklaven konnte die Bildung eines schwach gelben Niederschlags, der sich

an der Luft unter Bildung eines braunen Öles zersetzt, beobachtet werden. Der Niederschlag wurde in einen Stickstoffkolben überführt und sofort gekühlt. NMR-Analysen der getrockneten Substanz zeigten die Bildung des intermolekular stabilisierten Salzes **56**, daneben wurden aber auch Signale des Isopropanols gefunden. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, um das aus der isolierten Verbindung schwer zu entfernende Isopropanol zu eliminieren. Diese Versuche waren nicht von Erfolg gekrönt.

Für die NMR-Analysen wurde der Feststoff in 3 – 5 M NaOD/D<sub>2</sub>O gelöst. Unter diesen Bedingungen kann nicht mehr von der oben gezeigten Zusammensetzung **56** geredet werden. Der im Feststoff als Kation fungierende Guanidinium-Anteil sollte unter diesen stark alkalischen Bedingungen (pH 14.6) als freies Guanidin vorliegen. Der Diazeniumdiolat-Anteil sollte aber weiterhin als Anion mit den ebenfalls deprotonierten Guanidin-Gruppen anwesend sein.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 43) zeigt insgesamt sechs Signalgruppen. Zwei Signale gehören dem Diazeniumdiolat-Anteil, weitere zwei dem nun als freies Guanidin vorhandenen Anteil und die restlichen zwei Signale wurden dem Isopropanol zugeordnet.

Ein typisches AA'BB'-Muster, vertreten durch zwei Signale bei 2.75 und 2.69 ppm ist im Spektrum vorhanden. Diese Signale werden den Ethylengruppen des Diazeniumdiolat-Anteils im Molekül zugewiesen. Für die Identifizierung und eindeutige Zuordnung dieser Signale wurde das unter gleichen Bedingungen aufgenommene Spektrum des intramolekular stabilisierten Salzes **57** zur Hilfe genommen. Dieses Spektrum wird später diskutiert.

Der unter diesen Bedingungen als freies Guanidin vorhandene Anteil ist näherungsweise durch zwei Triplets vertreten, bei 2.79 und 2.35 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.3 Hz. Das erste Signal wird den vier Methylen-H-Atomen in Nachbarschaft zu den Guanidin-Resten zugeordnet, während das zweite Signal den Methylengruppen um das sek. Amino-N-Atom zugewiesen wird. Vergleicht man diese Werte mit denen des freien Guanidins in D<sub>2</sub>O (stark alkalische Lösung pH > 14) und den Werten des Guanidiniumsulfats in D<sub>2</sub>O, so kann man den Befund untermauern, dass der Guanidin-Anteil im Molekül unter den stark alkalischen Bedingungen tatsächlich als freies Guanidin vorliegen muss.

Die Signale des freien Guanidins **51** in D<sub>2</sub>O (stark alkalische Lösung) sind bei 2.90 und 2.44 ppm mit <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von ebenfalls 6.3 Hz (6.35 und 6.30 Hz jeweils) (s. Abb. 33), während die Signale des Sulfatsalzes **38** in D<sub>2</sub>O, Bedingungen, unter denen das Guanidin als Guanidinium-Kation vorhanden ist, bei 3.19 und 2.68 ppm mit <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 5.9 und 6.0 Hz jeweils zu sehen sind (s. Abb. 21).

Bei 3.62 und 0.80 – 0.79 ppm sind die Signale des Isopropanols zu finden. Das Singulett bei ~ 1.5 ppm scheint von einer Verunreinigung zu stammen, da dieses Signal nicht konstant bei allen Messungen der Substanz auftaucht. Die weiteren Signale im Spektrum stammen möglicherweise von Hydrolyse-Produkten der Guanidin-Reste. Die mögliche Hydrolyse von Guanidinen wurde bereits in Kap. 2.1.1 diskutiert und wird durch die Literatur<sup>[93, 107]</sup> belegt.

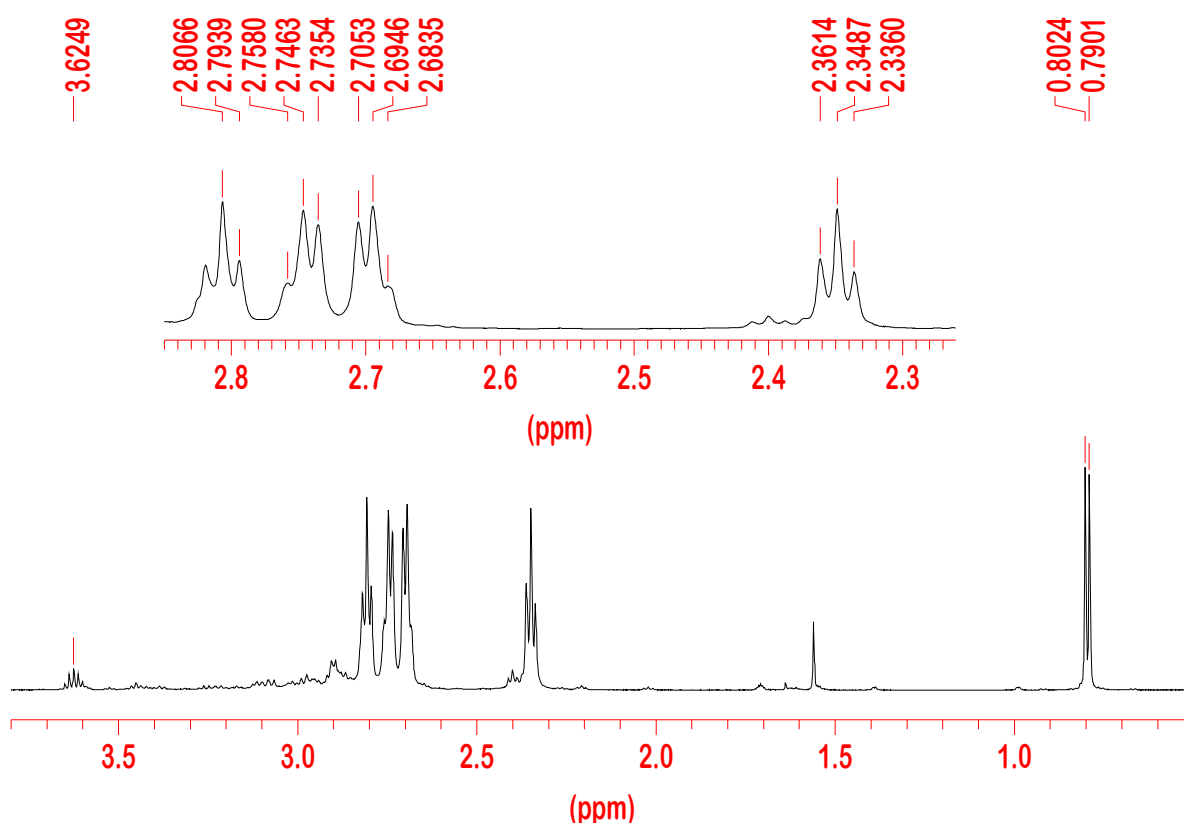


Abb. 43: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **56** in 3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 44) von **56** in 3.5 M NaOD/D<sub>2</sub>O zeigt insgesamt acht Signale. Bei chemischen Verschiebungen von 162.7 und 162.6 ppm sind zwei Signale vorhanden, die den vier Guanidin-C-Atomen zugeordnet werden. Im freien Guanidin **51** ist das Signal des Guanidin-C-Atoms bei 162.3 ppm, während das Signal für das gleiche C-Atom im intramolekular stabilisierten NONOat **57** bei 162.7 ppm zu finden ist. Eine eindeutige Unterscheidung der beiden Signale ist also in diesem Fall nicht möglich.

Die Signale des Guanidin-Anteils wurden mit Hilfe des Spektrums des freien Guanidins **51** (Abb. 34) zugeordnet. Das Signal bei 50.2 ppm gehört den Methylen-C-Atomen um das sek. Amino-N-Atom, während das Signal bei 43.6 ppm von den Methylen-C-Atomen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Guanidindgruppen stammt.

Die zwei verbleibenden Signale bei 55.5 und 41.5 ppm vertreten den Diazeniumdiolat-Anteil im Molekül. Die Zuordnung erfolgte unter der Annahme, dass durch den Einbau der Diazeniumdiolat-Gruppe ein größerer Einfluss auf die Methylengruppen in direkter Nachbarschaft zu der *N*-Diazeniumdiolat-Funktion ausgeübt werden sollte, als auf die Methylengruppen in unmittelbarer Nachbarschaft der Guanidin-Gruppen. Die Signale für die Methylen-C-Atome für das freie Guanidin befinden sich bei 50.4 und 43.8 ppm (s. Abb. 34). Im NONOat befinden sich die Signale bei 55.5 und 41.5 ppm. Die größte Änderung beobachtet man, wie erwartet bei den Methylen-C-Atomen mit einer chemischen Verschiebung von 55.5 ppm, diese sollten sich um das N-Atom befinden, das nun die Diazeniumdiolat-Funktion trägt. Das Signal bei 41.5 ppm ist demnach den Methylen-C-Atomen in Nachbarschaft zu den Guanidin-Gruppen zuzuordnen.

Die zwei übrigen Signale bei 66.4 und 26.6 ppm gehören dem Isopropanol.

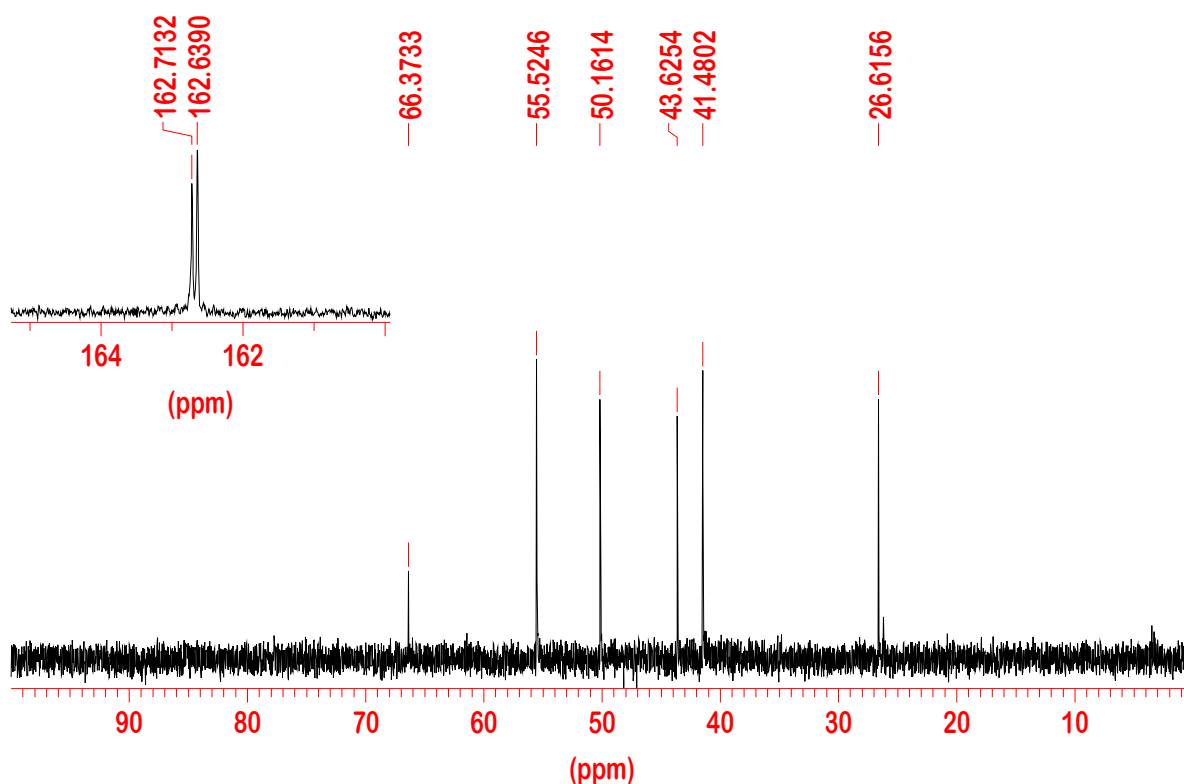


Abb. 44:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **56** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Für das intermolekular stabilisierte Salz zeigt das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$  sechs Signale (Abb. 45). Zwei dieser Signale gehören dem Guanidin-Anteil im Molekül und die restlichen vier dem Diazeniumdiolat-Anteil. Bei -350.2 ppm ist das Signal der sekundären Aminofunktion im Guanidin-Anteil vertreten. Bei -293.6 und -292.5 ppm sind zwei Signale für die zwölf Guanidin-N-Atome im Molekül anwesend. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen beiden Signalen ist nicht möglich, wengleich das intramolekular stabilisierte Salz **57** in NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$  ein Signal bei -293.1 ppm für die Guanidin-N-Atome zeigt. Ein Vergleich mit den  $^{15}\text{N}$ -Signalen des freien Guanidins ist in diesem Fall nicht möglich, da **51** sich während der Messung zersetzte und das Guanidinium-Sulfat **38** nicht ausreichend löslich in  $\text{D}_2\text{O}$  (benötigt werden in der Regel 150 – 200 mg Substanz / 1 mL  $\text{D}_2\text{O}$ ) war. Bei -256.9 ppm ist das Signal der Aminofunktion, die nun die Diazeniumdiolat-Gruppe trägt, zu finden.

Eine eindeutige Zuordnung der Signale für die Diazeniumdiolat-N-Atome wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal getroffen. In der Literatur<sup>[120]</sup> wurde bis heute nur ein Vertreter der *N*-Diazeniumdiolat-Familie  $^{15}\text{N}$ -NMR spekt-

roskopisch untersucht. Das Spektrum des als intermolekular stabilisierten NONOats des Diethylamins wurde in  $\text{CDCl}_3$  und nicht in NaOD bzw.  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen, Lösungsmittel, in denen die meisten NONOate löslich sind. Für diese Verbindung wurden die zwei NONOat-Signale wie folgt zugeordnet: bei  $-139.7$  ppm befindet sich das Signal des N-Atoms, welches an dem Amino-N-Atom des Diethylamins gebunden ist. Tieffeldverschoben und bei einer chemischen Verschiebung von  $27.6$  ppm befindet sich das Signal des anderen N-Atoms der Gruppe. Im Allgemeinen ist bei allen von SCHULTHEISS *et. al.* [120] untersuchten Verbindungen eine Tieffeld-Verschiebung des Signals des  $=\text{N-O}^-$ -Stickstoffatoms in sämtlichen untersuchten Verbindungen zu beobachten (s. Tab. 15).

Die Zuordnung wurde ausgehend von diesen Befunden und weiteren Literaturdaten<sup>[121, 122]</sup> für ähnliche Verbindungen, auf die hier synthetisierten NONOate übertragen, so dass im Fall von **56** das Signal bei  $-69.0$  ppm dem N-Atom gehört, welches direkt am Grundgerüst gebunden ist und das tieffeldverschobene Signal bei  $41.4$  ppm dem zweiten Diazeniumdiolat-N-Atom zugewiesen wird.

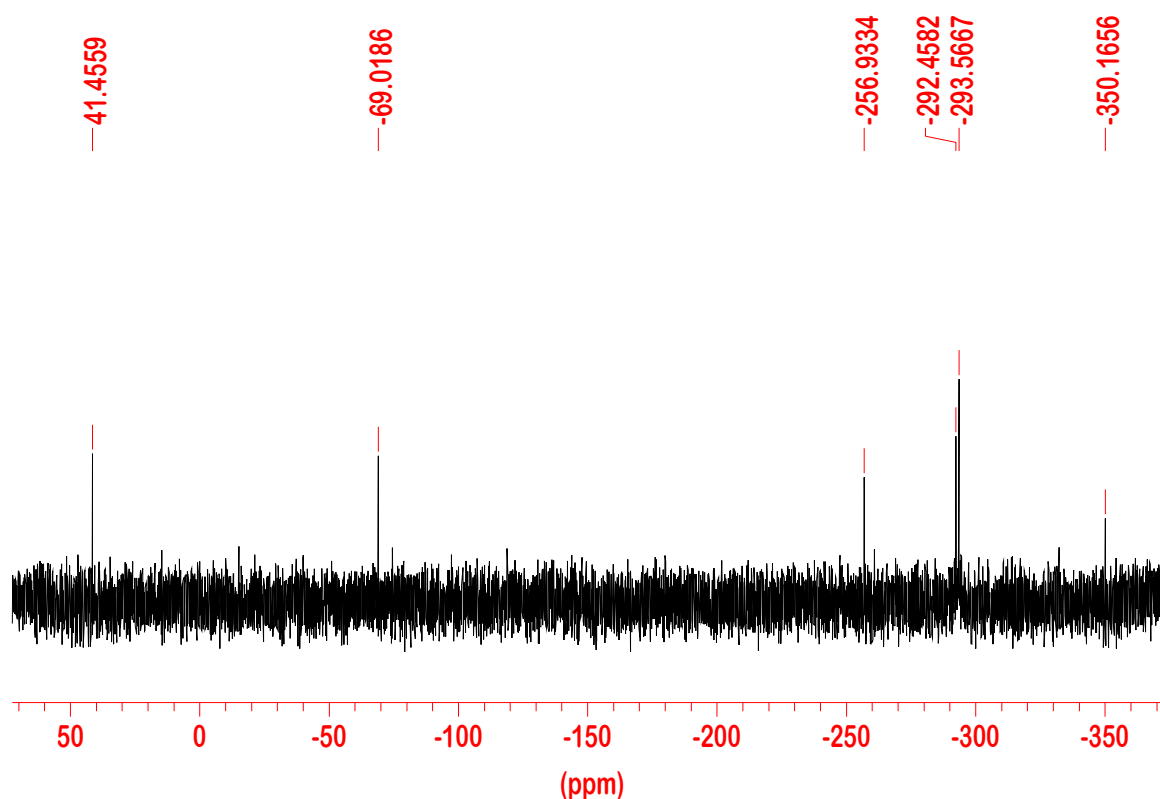
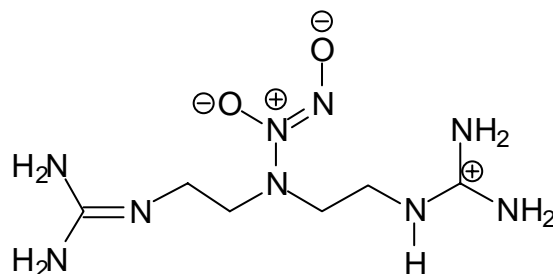


Abb. 45:  $^{15}\text{N}$ -Spektrum von **56** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.4.2 Darstellung des intramolekular stabilisierten NONOats 57



247.3

**57**

Zwei Ziele wurden mit dieser Syntheseoptimierung verfolgt: zum einen sollte Isopropanol entfernt werden, zum anderen sollte die Darstellung des intramolekular stabilisierten Salzes erarbeitet werden.

Zur Entfernung des Isopropanols wurden hauptsächlich zwei Strategien verwendet: die Optimierung der Reinigungsmethoden und die Entwicklung von Synthesebedingungen bzw. -Methoden, bei denen Isopropanol bereits bei der Umsetzung mit Stickstoffmonoxid nicht mehr anwesend sein sollte.

Das NONOat **56** war auch durch langes Abpumpen an der Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa und 72 h nicht von Isopropanol zu befreien. Beim Versetzen der Substanz mit Methanol wurde beobachtet, dass ein Teil des Feststoffes in Lösung ging, während ein bräunlicher Feststoff-Rest zurückblieb. Wenn man die Lösung einer Vorlage aus Acetonitril zutropfen ließ, konnte man die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachten. Der Niederschlag (Raumtemperatur, 80 – 90 Pa und 48 – 72 h) zeigte nach den NMR-Analysen, dass Isopropanol entfernt worden war. Es war aber auch eine Abnahme der Signalintensitäten des Guanidin-Gegenions in den Spektren festzustellen. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Operation gelang eine fast vollständige Entfernung des Guanidin-Anteils (Abb. 46).

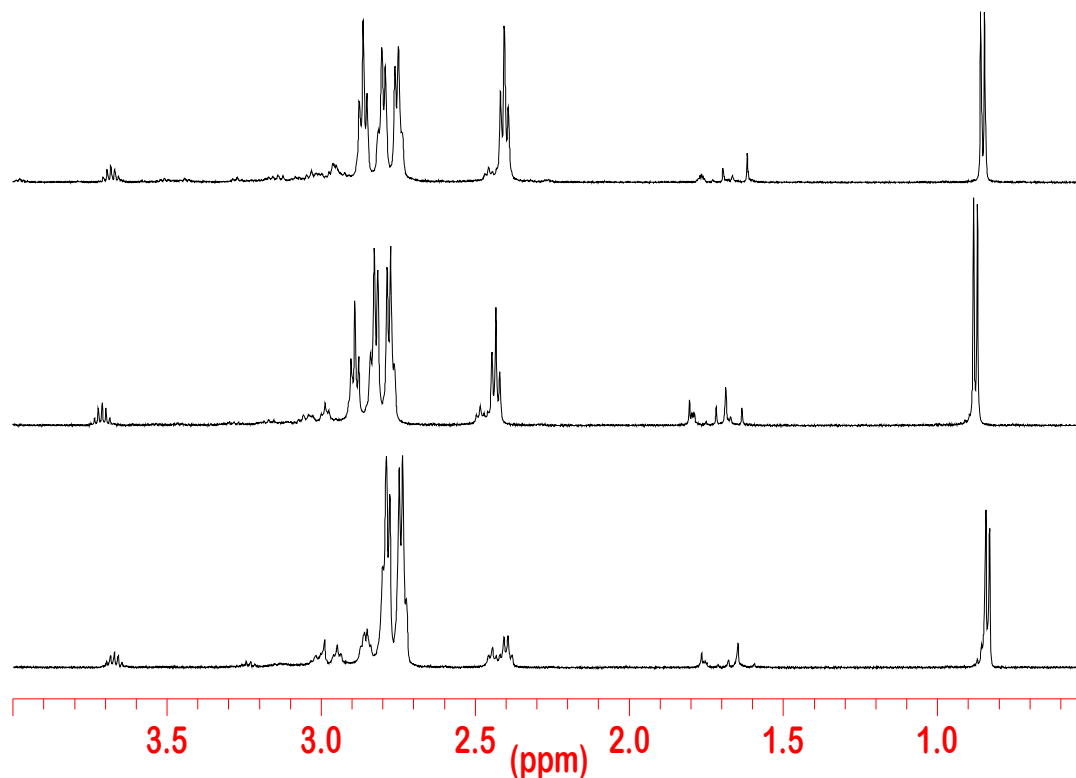


Abb. 46:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der unterschiedlichen Ansätze zur Reinigung des NONOats **56**. Das obere Spektrum stellt das intramolekular stabilisierte Salz. Beim unteren Spektrum ist eine Abnahme des Guanidin-Anteils zu beobachten.

Ließ man die methanolische Lösung einer Isopropanol-Vorlage zutropfen, so war ebenfalls die Bildung eines farblosen Niederschlages festzustellen. Die NMR-Spektren zeigten auch in diesem Fall eine Abnahme der Signalintensitäten für den Guanidin-Anteil. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass eine Umsetzung mit Stickstoffmonoxid in Isopropanol als Lösungsmittel möglich sein sollte.

Die erfolgreiche Synthese des intramolekular stabilisierten Salzes **57** wurde auf diese Weise bei Raumtemperatur und einem NO-Druck von 6000 – 7000 hPa 24 h im Autoklaven durchgeführt. Beim Öffnen des Reaktors wurde die Bildung eines farblosen Niederschlages festgestellt. Nach der Isolierung und Entfernung von Lösungsmittelresten wurde eine farblose, fein pulvrige Substanz erhalten. Die Spektren des Rohprodukts zeigen hauptsächlich die Bildung von **57**, es sind noch Reste an Guanidin vorhanden, die aber durch mehrfaches Waschen mit kaltem Isopropanol und Diethylether entfernt werden konnten. Die Bestäti-

gung der Bildung von **57** lieferte die Elementaranalyse. Diese Umsetzung wurde mehrmals wiederholt, dabei konnte die Ausbeute von anfänglichen 30 auf 79 % verbessert werden, indem kleinere Ansätze (600 – 800 mg Guanidin in 75 mL Isopropanol) und längere Reaktionszeiten (48 – 72 h) verwendet wurden.

Mit dieser Synthese konnte also zum ersten Mal gezeigt werden, dass Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid auch in polaren protischen Lösungsmitteln ohne Zugabe von Alkali-Alkoholaten möglich sind. Wenn möglich sollte man aber auf die Verwendung von Ethanol verzichten, da unter stark alkalischen Bedingungen das Ethanolat-Ion gemäß einem TRAUBE-Abbau mit Stickstoffmonoxid (s. Gl. 5) reagieren kann.

Das in 3.5 M NaOD/D<sub>2</sub>O aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 47) zeigt zwei Signale für die Ethylengruppen im Molekül mit einem typischen AA'BB'-Muster bei 2.74 und 2.69 ppm. Die Signale des noch vorhandenen Guanidin-Anteils sind bei 2.81 und bei 2.35 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.4 Hz jeweils.

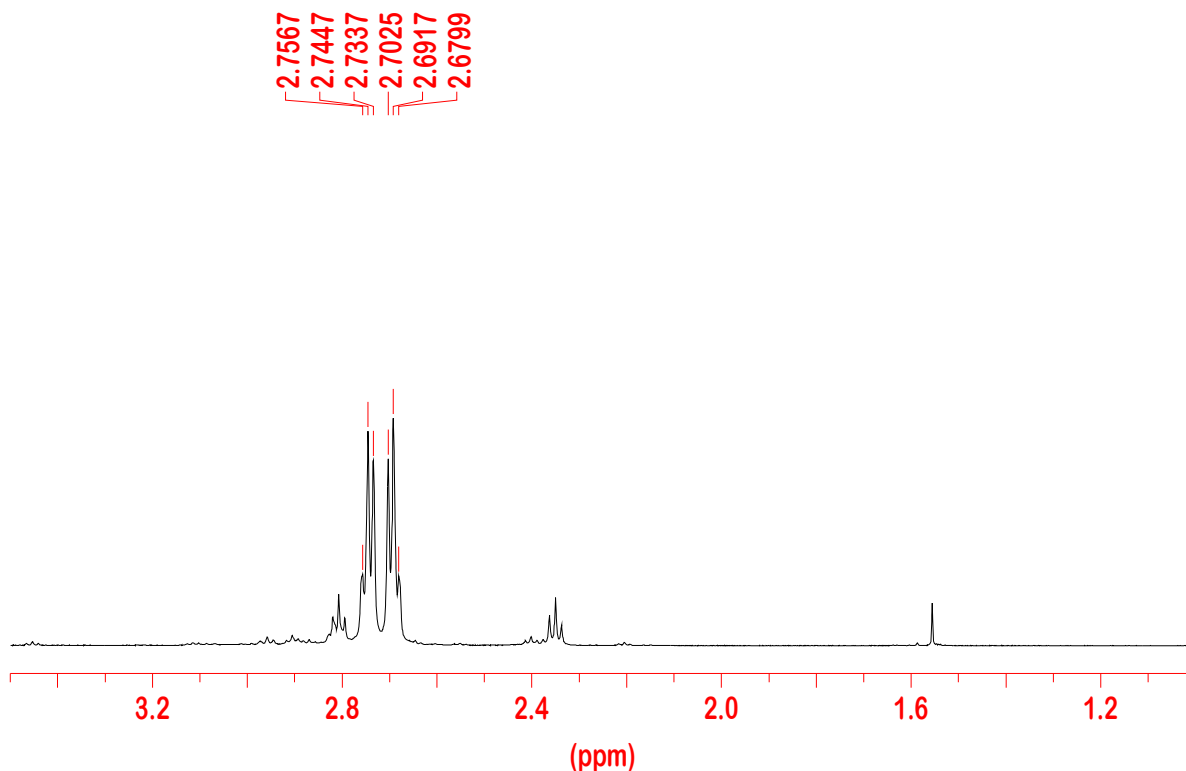


Abb. 47: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **57** in 3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 48) sind drei Signale vorhanden. Bei 162.7 ppm befindet sich das Signal des Guanidin-C-Atoms, während bei 55.5 und 41.4 ppm die Signale der Methylen-C-Atome vorhanden sind. Das erste Signal wird analog zu **56** den Methylen-C-Atomen um das Diazeniumdiolat tragende Amino-N-Atom zugeordnet, das zweite Signal stammt von den Methylen-C-Atomen neben den Guanidin-Gruppen.

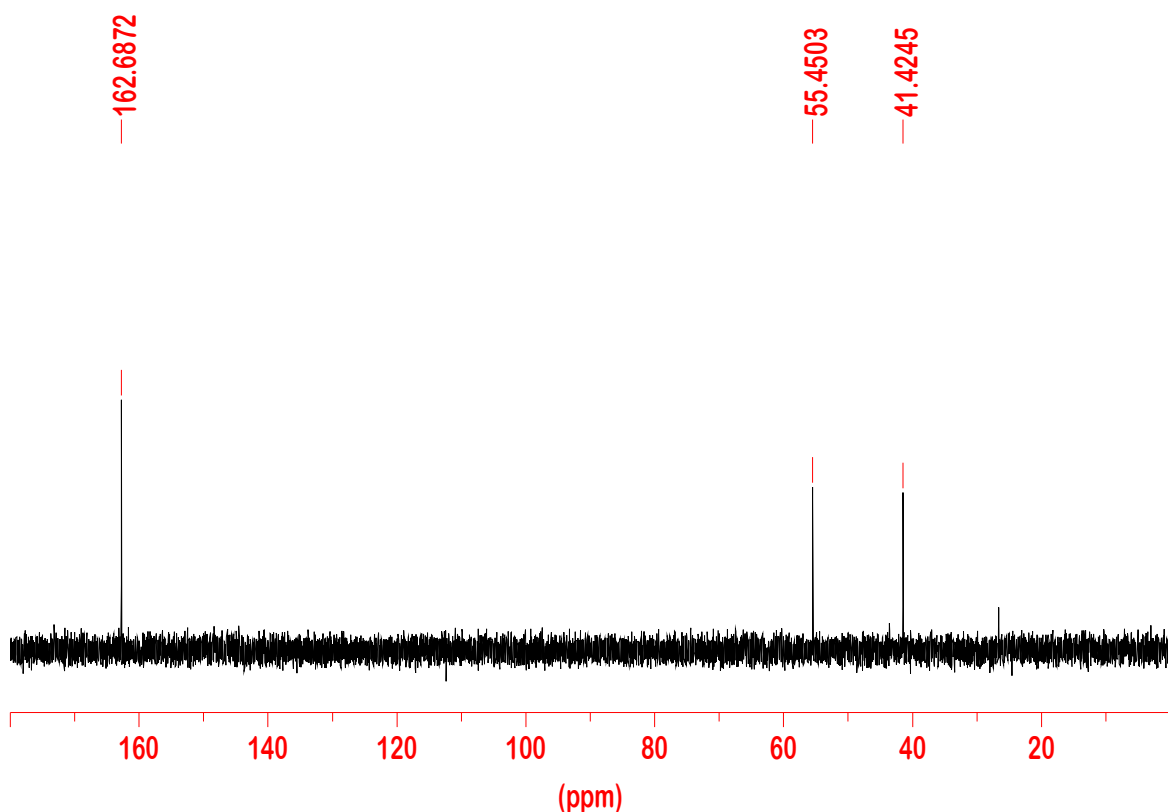


Abb. 48:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **57** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Unter gleichen Bedingungen aufgenommen, zeigt das  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektrum vier Signale. Bei -293.1 ppm und für sechs Atome gültig ist das Signal der Guanidin-N-Atome vorhanden. Unter diesen stark alkalischen Bedingungen sind die Stickstoffatome<sup>[102]</sup> nicht von einander unterscheidbar. Das Signal bei -257.0 ppm gehört dem tert. N-Atom, das die funktionelle Diazeniumdiolat-Gruppe trägt. Die zwei verbleibenden Signale gehören dem Diazeniumdiolat-Rest. Die Zuordnung wurde analog zu dem intermolekular stabilisierten Salz **56** getroffen:

das Signal bei -69.0 ppm gehört dem N-Atom der Diazeniumdiolat-Gruppe, welches mit dem tert. N-Atom des Grundgerüsts verbunden ist. Bei 41.3 ppm ist das Signal des anderen N-Atoms anwesend.

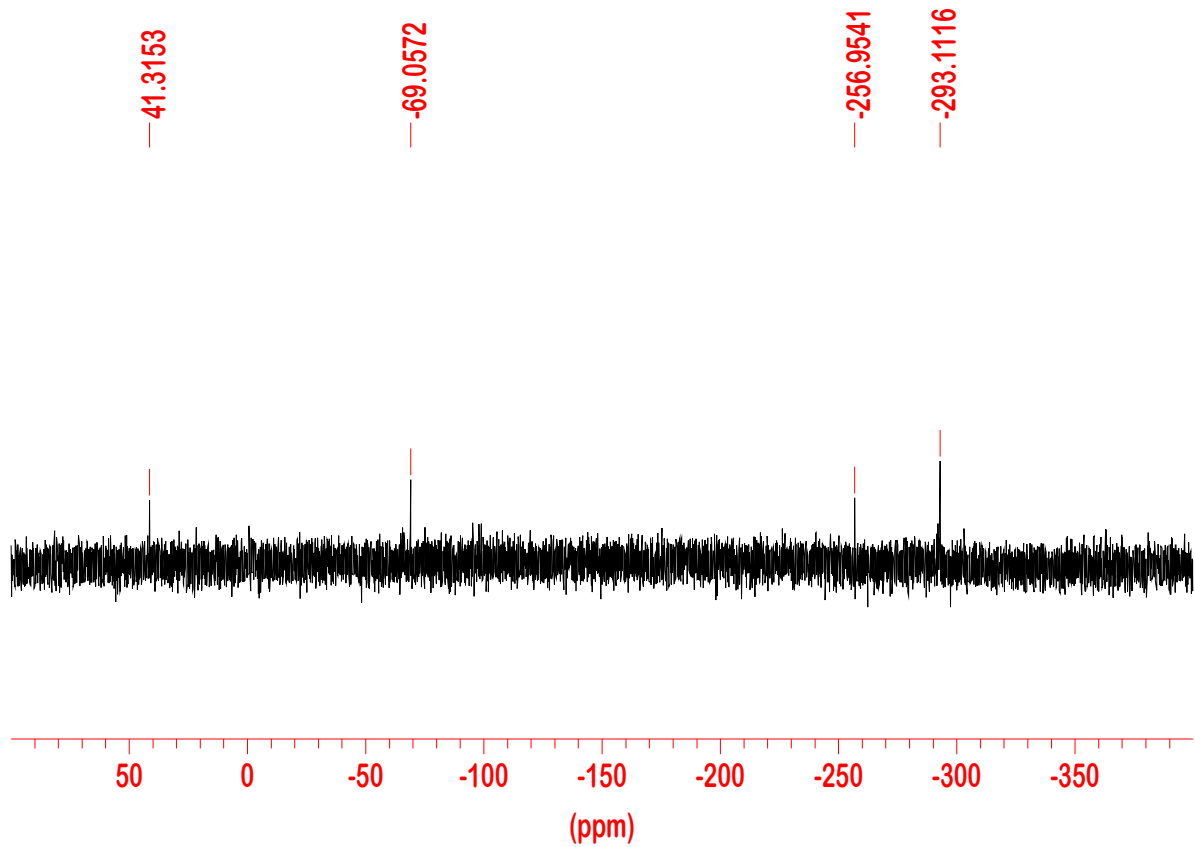
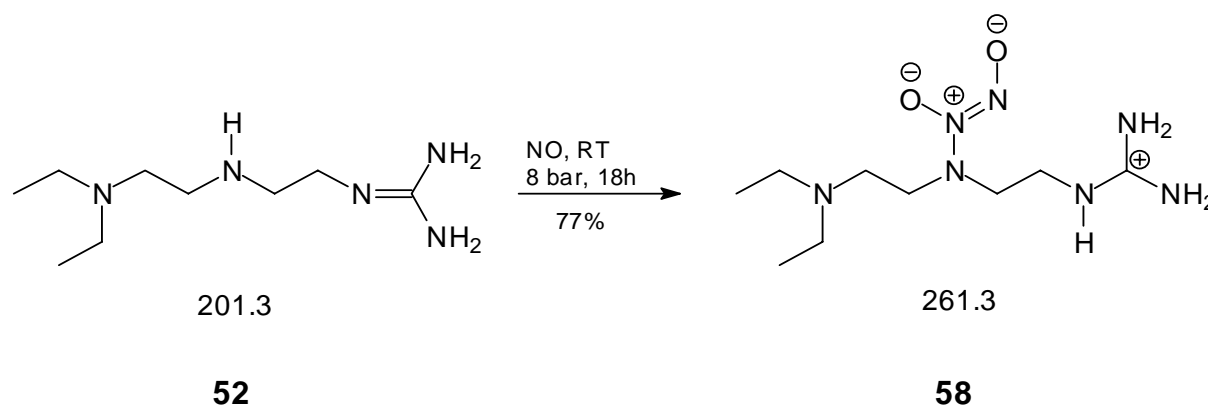


Abb. 49:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **57** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.4.3 Synthese von 1-[(2-Diethylaminoethyl)-(2-guanidiniummethyl)-amino]-diazen-1-ium-1,2-diolat **58**



Die Vorstufe, das freie Guanidin **52** ist gut in Acetonitril löslich (3 - 4 g in 75 mL Acetonitril), so dass in diesem Fall der Zusatz von Isopropanol oder Methanol für die Umsetzung im Autoklaven mit Stickstoffmonoxid nach der allgemeinen Vorschrift zur NONOat-Synthese nicht notwendig war. Erhalten wurde interessanterweise das intramolekular stabilisierte Salz. Bei der Verbindung **58** handelt es sich um einen farblosen Feststoff, der nicht unzersetzt schmilzt. Die Verbindung ist im Vergleich zu **57** stabiler gegenüber Luft, sie zersetzt sich nur langsam und erst nach 24 h unter Bildung eines braunen Öles.

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden NaOD-Lösungen in D<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 2 - 4 M verwendet. Unter diesen Bedingungen sollte das NONOat als Anion vorliegen mit der deprotonierten Guanidin-Gruppe. Das in 3.5 M NaOD/D<sub>2</sub>O aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 50) zeigt hauptsächlich 4 Signalgruppen. Ein Multiplett bei 3.11 - 3.09 ppm, dessen Integrationswert vier Protonen entspricht, wird den beiden Methylengruppen um das diazeniumdiolattragende N-Atom zugewiesen. Daneben befindet sich ein Triplet bei 3.02 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.4 Hz, dieses wird den Methylen-Protonen in Nachbarschaft zu der Guanidin-Gruppe zugeordnet. Ein Quartett bei 2.46 ppm <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.3 Hz wird den vier Methyl-Protonen der Ethyl-Substituenten im Molekül zugeordnet. Ein weiteres Triplet befindet sich daneben bei 2.42 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten

von 7.4 Hz stammt von den Methylen-Protonen, die sich neben dem Amino-N-Atom befinden, das die zwei Ethyl-Substituenten trägt. Ein letztes Triplett bei 0.92 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz gehört den sechs Methylprotonen im Molekül. Es sind weitere Signale im Spektrum vorhanden, die Verunreinigungen, nicht umgesetztes Guanidin bzw. Hydrolyseprodukte<sup>[93, 94]</sup> des Moleküls darstellen könnten.

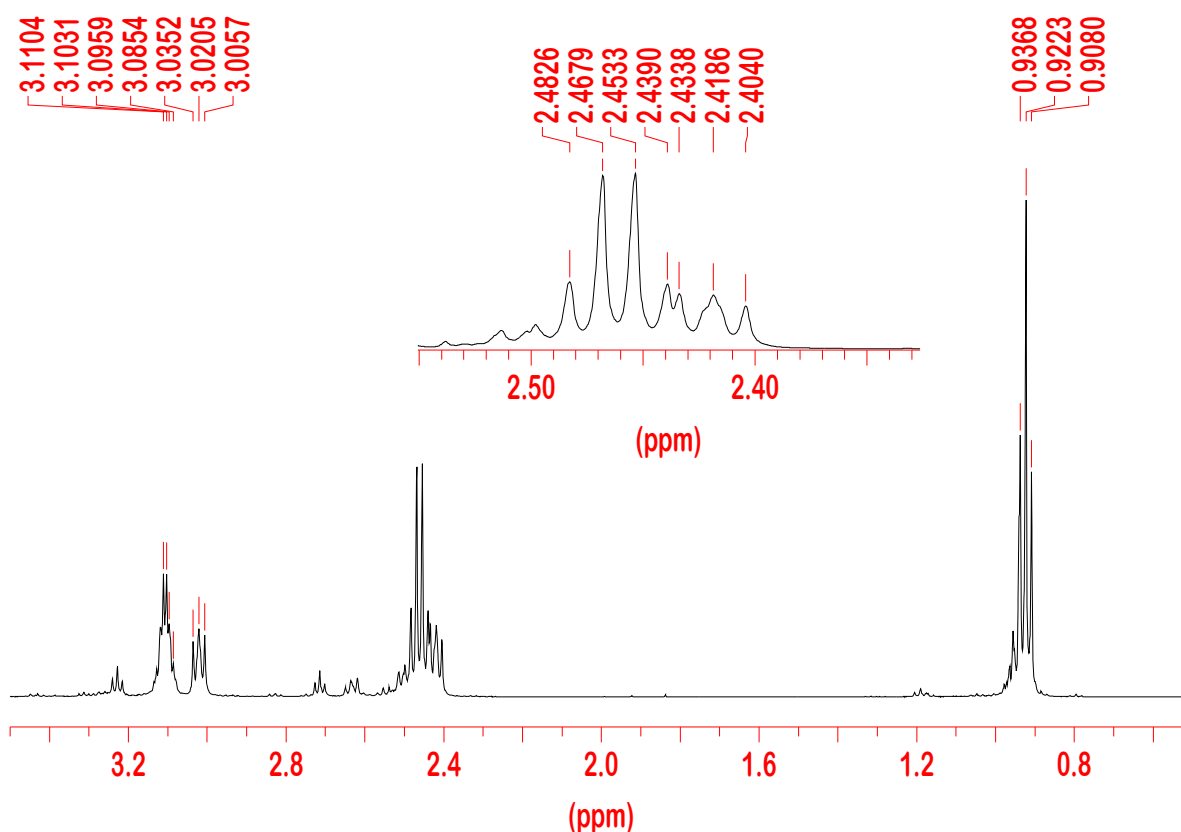


Abb. 50:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **58** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 51) zeigt sieben Signale. Bei 160.0 ppm befindet sich das Signal des Guanidin-C-Atoms. Für die Zuordnung der weiteren Signale wurde das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum vom Guanidinium-Sulfat **40** (Abb. 24) in  $\text{D}_2\text{O}$  zur Hilfe genommen. Bei einer chemischen Verschiebung von 55.1 und um 1.5 ppm tieffeldverschoben befindet sich das Signal der Methylen-Protonen in unmittelbarer Nachbarschaft des tert. Amin-N-Atoms, das die zwei Ethyl-Substituenten trägt. Ebenfalls tieffeldverschoben (3.8 ppm) bei 53.4 ppm befin-

det sich das Signal der Methylengruppe neben dem NONOat-tragenden Amino-N-Atom zwischen diesem und der Guanidin-Gruppe.

Ein weiteres Signal bei 51.0 ppm, um 3.1 ppm tieffeldverschoben wird dem Methylen-C-Atom, das sich neben dem NONOat-tragenden Amino-N-Atom befindet, zwischen diesem und dem mit zwei Ethylgruppen substituierten tert. Amino-N-Atom zugeordnet. Die Lage des Signals bei 49.4 ppm (49.4 ppm in **40**) bleibt unverändert und wird den Methylen-C-Atomen der Ethyl-Substituenten zugeordnet.

Bei 41.2 ppm (43.4 ppm in **40**), hochfeldverschoben im Vergleich zum Guanidinium-Sulfat, findet sich das Signal, das vom Methylen-C-Atom neben der Guanidin-Gruppe (deprotoniert im NONOat) stammt. Das letzte Signal bei 13.0 ändert seine Lage nur wenig im Vergleich zu **40** (12.8 ppm) und wird den beiden im Molekül vorhandenen Methyl-C-Atomen zugeordnet.

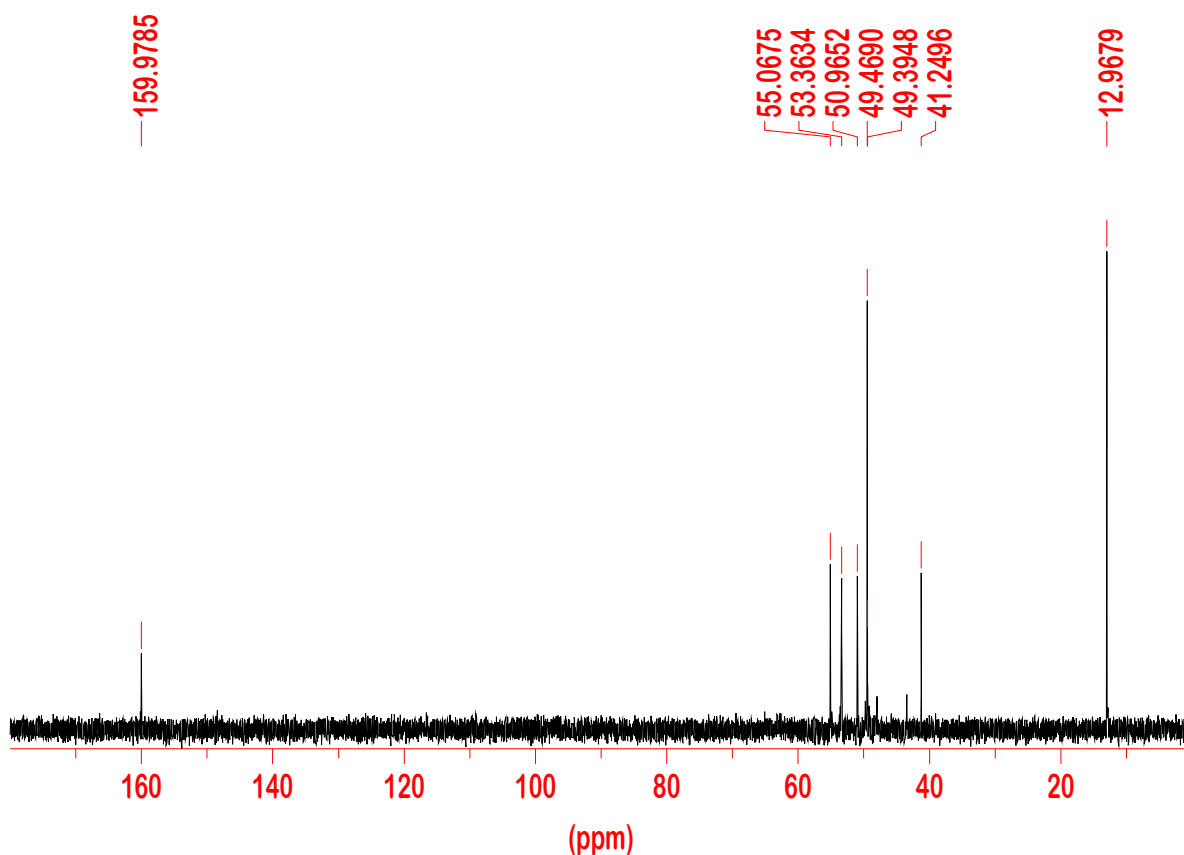


Abb. 51:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **58** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum, das in 3.5 M NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung aufgenommen wurde, sind fünf Signale anwesend. Bei -337.7 ppm befindet sich das Signal des tert. Amin-N-Atoms, welches die zwei Ethyl-Substituenten trägt. Die Guanidin-N-Atome befinden sich bei -294.1 ppm und sind nicht voneinander unterscheidbar. Bei -255.7 ppm ist das Signal des Amin-N-Atoms, das die Diazeniumdiolat-Gruppe trägt, zu beobachten. Die restlichen zwei Signale bei -69.9 und 41.0 ppm gehören den beiden Diazeniumdiolat-N-Atomen, wobei das erste dem N-Atom gehört, das am Gerüst gebunden ist und das zweite bei 41.0 ppm dem anderen N-Atom der Diazeniumdiolat-Gruppe zuzuordnen ist.

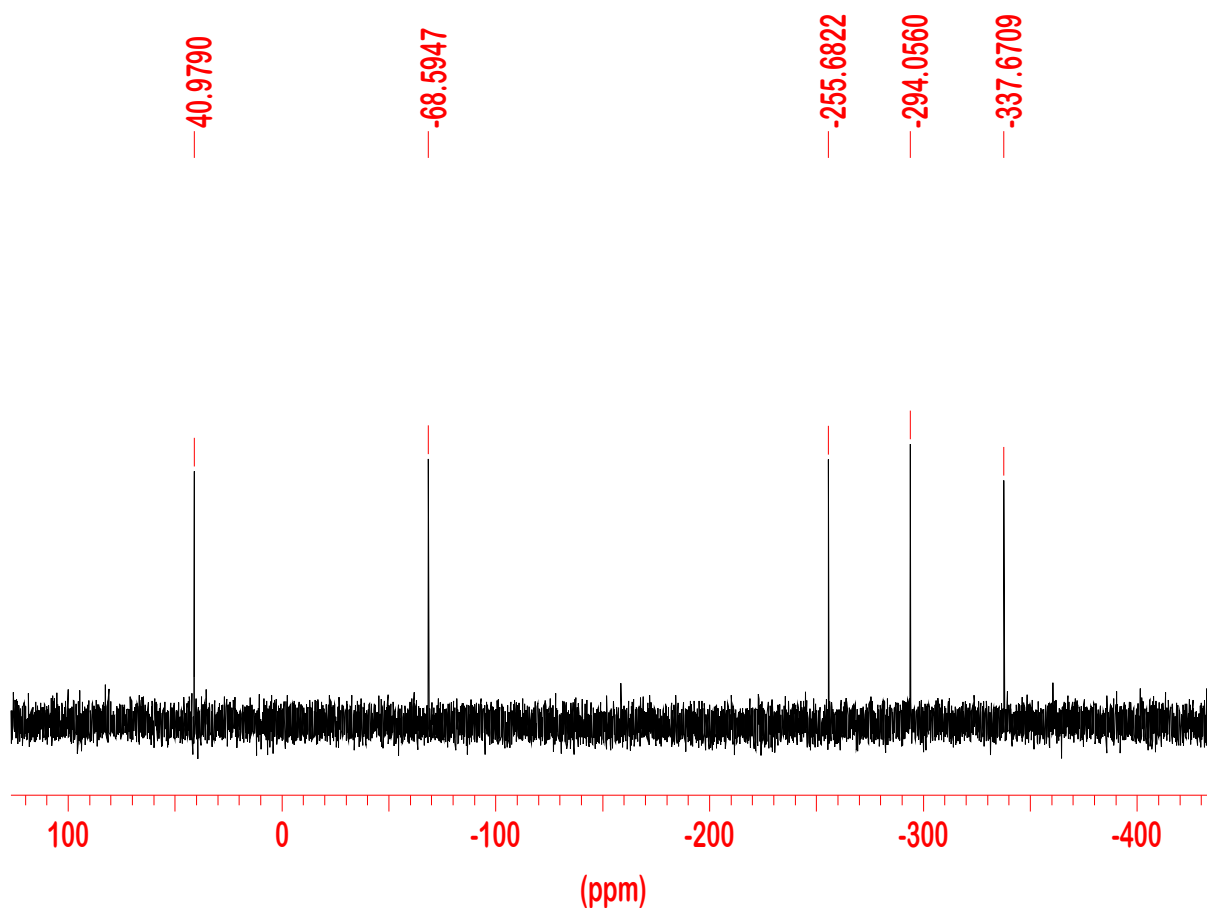
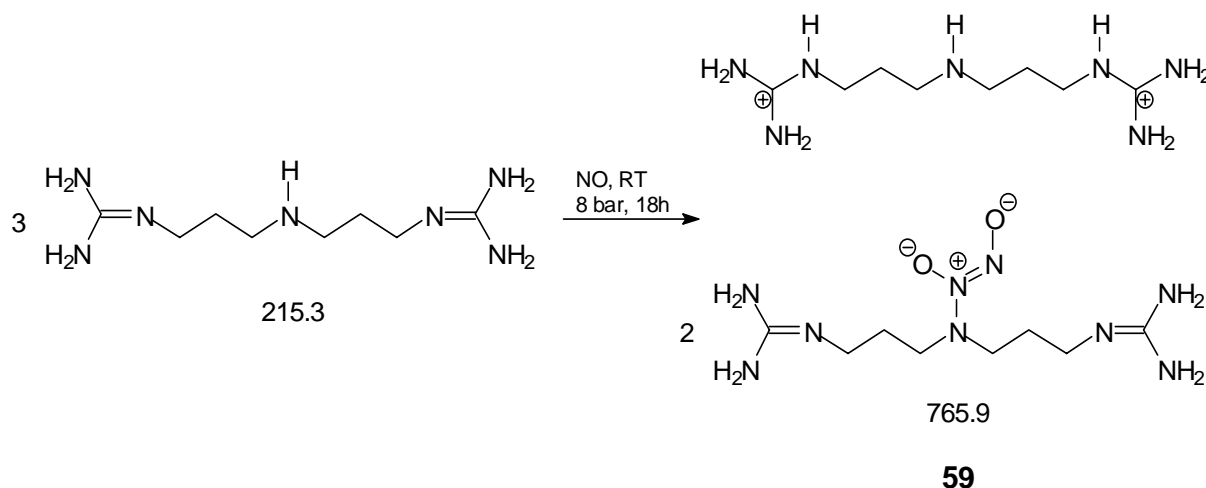


Abb. 52:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **58** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.4.4 Synthese von Bis-(3-guanidinpropyl)-*N*-diazoniumdiolat **59**



Die Synthese dieses Moleküls wurde in einer Acetonitril/Methanol-Mischung im Verhältnis 12 : 1 nach der allg. Vorschrift zur NONOat-Synthese durchgeführt. Es entstand ein voluminöser farbloser Niederschlag, der isoliert und mit Isopropanol und Diethylether gewaschen wurde. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten wurde die Substanz an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 48 h angeschlossen.

Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen farblosen Feststoff, der an Luft bei Raumtemperatur keine merkliche Zersetzung innerhalb von 72 h zeigt. Die Aufbewahrung erfolgt dennoch in einem Stickstoffkolben unter Argon im Tiefkühlfach. Die Elementaranalyse der Verbindung deutete auf eine andere Zusammensetzung, als die des intramolekular stabilisierten Salzes.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 53), aufgenommen in 3.5 M NaOD/D<sub>2</sub>O, konnte die oben gezeigte Zusammensetzung bestätigt werden. Das NONOat-Anion und das Guanidin-Gegenion, als freies Guanidin in 3.5 M NaOD, sind im Verhältnis 2 : 1 im isolierten Feststoff vertreten. Ein intramolekular stabilisiertes Salz, wie im Fall von **58**, wurde nicht gebildet. In den Spektren sind sowohl die Signale des Diazoniumdiolat- als auch die des Guanidin-Restes gemäß Struktur **59** vorhanden. Für eine übersichtlichere Diskussion der Spektren werden die Anteile getrennt voneinander behandelt. Für das NONOat sind folgende Signale vorhanden: bei 1.49 ppm findet sich ein Quintett mit einer  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten von

6.9 Hz, welches vier Protonen entspricht und den Methylen-Protonen in der Mitte der Propylen-Ketten zugeordnet wird. Das Triplet bei 2.89 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.0 Hz wird den vier Methylen-Protonen zugeschrieben, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Diazeniumdiolat tragenden N-Atom befinden. Ein weiteres Triplet bei 3.07 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.0 Hz wird den 4 Methylen-Protonen zugeordnet, die sich neben der Guanidin-Gruppe aufhalten.

Für den Guanidin-Anteil werden folgende Signale beobachtet: ein Quintett bei 1.62 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz und vier Protonen entsprechend wird den Methylengruppen im Molekül in der Mitte der Propylen-Ketten zugeordnet. Ein Triplet bei 2.52 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.4 Hz wird den vier Methylen-Protonen zugeordnet, die sich um das sek. Amino-N-Atom befinden. Ein letztes Triplet bei 3.04 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz wird den vier Methylen-Protonen neben den Guanidin-Gruppen zugewiesen.

Kleinere Signale von Verunreinigungen treten im Bereich von 2.0 – 1.7 und bei 3.2 – 3.1 ppm auf. Diese Verunreinigungen entstehen sehr wahrscheinlich während des Befüllens und Entleerens des Autoklaven, da in diesen Schritten eine Arbeit unter Schutzgas nicht möglich war.

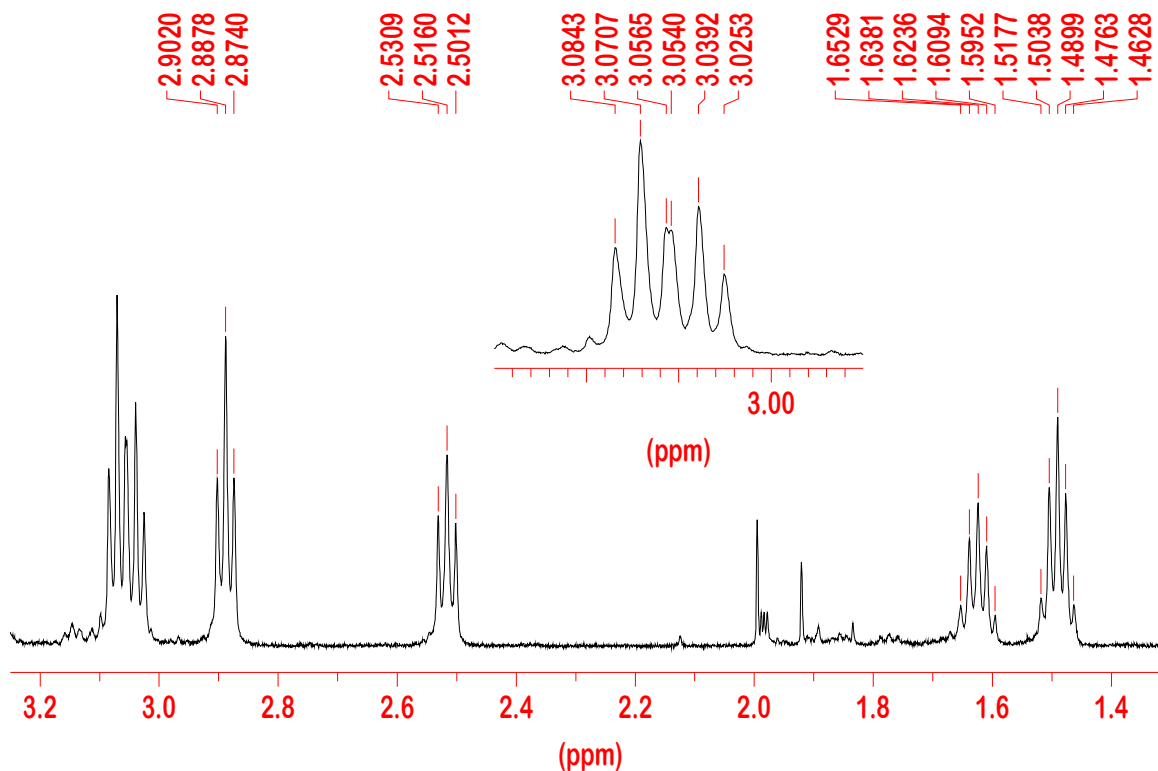


Abb. 53:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **59** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C}$ -spektrum (Abb. 54) wird in analoger Weise erklärt. Für das NO-Oat sind folgende Signale verantwortlich: bei 28.6 ppm ist das Signal der beiden Methylen-C-Atome in der Mitte der Propylen-Ketten. Bei 39.0 ppm befindet sich das Signal der beiden Methylen-C-Atome, die am Diazoniumdiolat tragenden N-Atom gebunden sind. Ein weiteres Signal bei 51.3 ppm gehört den verbleibenden Methylen-C-Atomen neben den Guanidin-Gruppen. Das Signal für die Guanidin-C-Atome ist bei einer chemischen Verschiebung von 160.1 ppm anzutreffen.

Für den Guanidin-Anteil sind folgende Signale im Spektrum zu sehen: bei 24.1 ppm das Signal für die Methylen-C-Atome der Mitte der Propylen-Ketten. Bei 39.5 ppm das Signal für die Methylen-C-Atome am sek. Amino-N-Atom. Ein weiteres Signal bei 46.1 ppm wird den Methylen-C-Atomen neben den Guanidin-Gruppen zugeordnet. Schließlich ist das Signal der Guanidin-C-Atome bei 160.0 ppm zu finden.

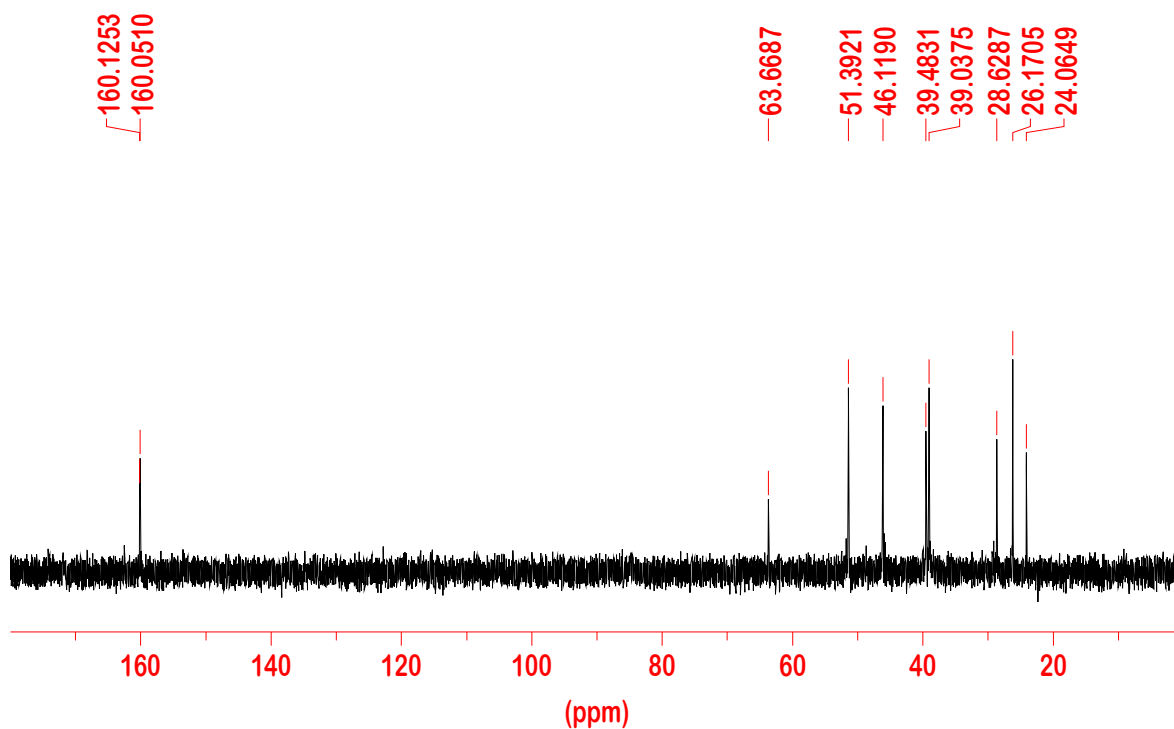


Abb. 54:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **59** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (Abb. 55) sind ebenfalls die Signale für beide Teil-Moleküle erkennbar. Für das NONOat treten folgende Signale auf: bei -290.8 ppm ist das Signal der Guanidin-N-Atome, während bei -250.4 ppm das Signal für das Diazeniumdiolat tragende N-Atom zu finden ist. Die Zuordnung der Signale der Diazeniumdiolat-Gruppe wird analog zu den Verbindungen **56**, **57** und **58** getroffen. Bei -67.3 ist das Signal des N-Atoms, das am Amin-N-Atom des Gerüsts gebunden ist. Bei 42.6 ppm befindet sich das Signal des anderen N-Atoms.

Für den Guanidin-Anteil finden sich zwei Signale: bei -341.0 ppm das Signal der sek. Amino-Gruppe und bei -281.8 das der Guanidin-N-Atome.

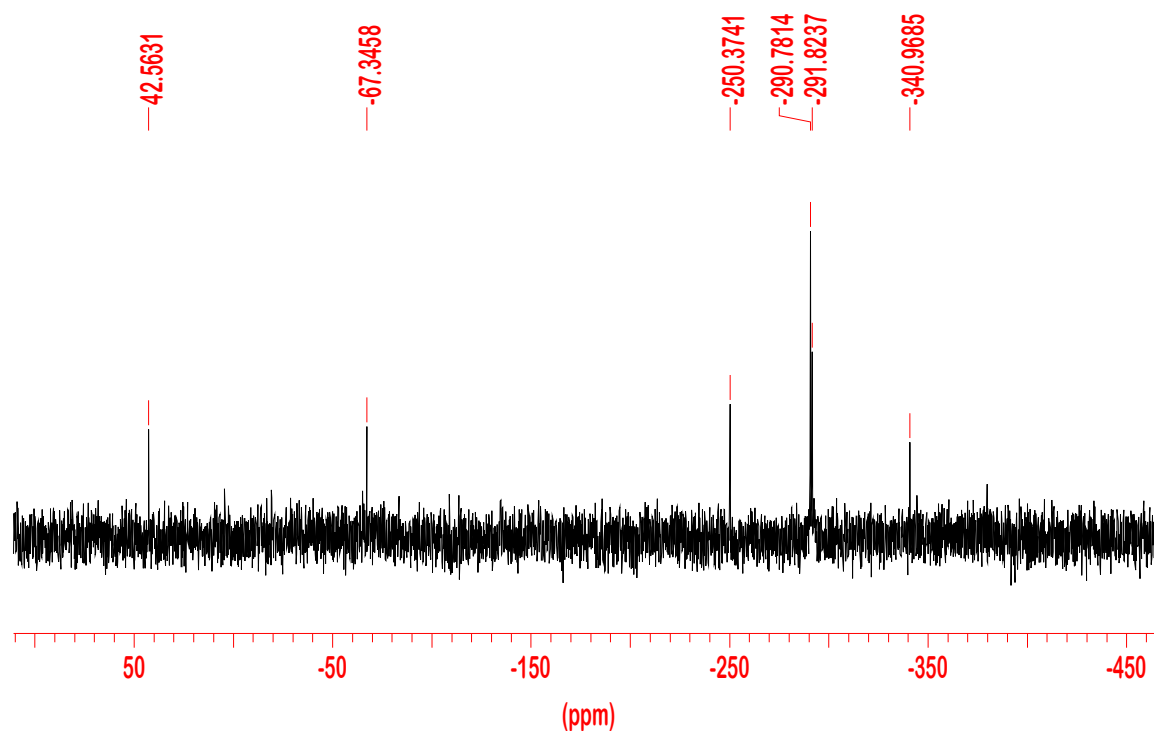
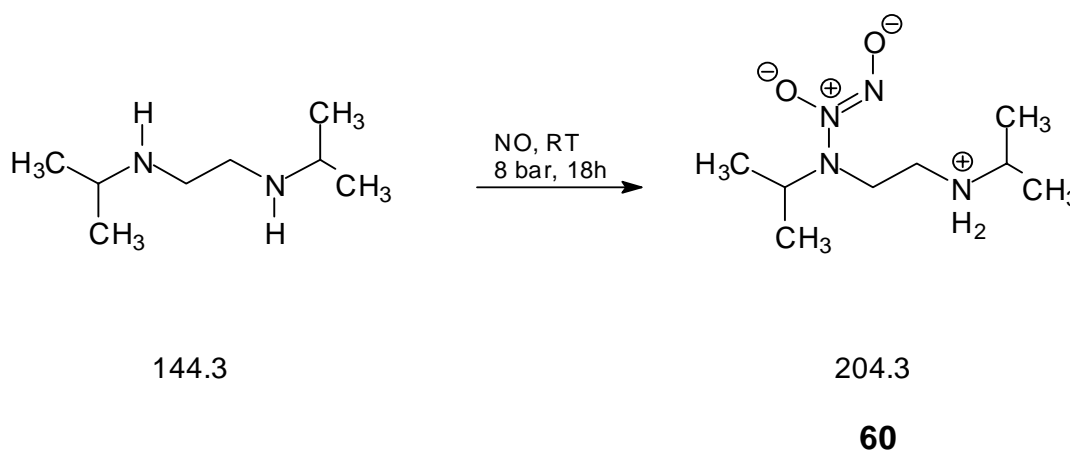


Abb. 55:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **59** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Bei den Synthesen der Guanidin-NONOate bleibt festzuhalten, dass **57** und **58** als intramolekular stabilisierte Salze isoliert werden konnten. Verbindung **56** liegt in einem 1 : 1 NONOat-Guanidin-Verhältnis, während **59** in einem NONOat-Guanidin-Verhältnis von 2 : 1 vorliegt. Während der Umsetzung der letzten beiden Verbindungen scheint es günstiger zu sein, das durch den Einbau der Diazoniumdiolat-Gruppe freigewordene Proton an ein anderes Guanidin-Molekül zu übertragen als es selbst zu behalten. Auffällig ist der Zusammenhang zwischen der Löslichkeit des Guanidins bzw. des NONOats und der Bildung von inter- oder intramolekular stabilisiertem Salz. **57** konnte in Isopropanol synthetisiert werden, in diesem Lösungsmittel ist das Guanidin gut löslich und bleibt zum größten Teil in Lösung, während das NONOat nicht bzw. unzureichend löslich ist und ausfällt. **59** wurde in einer Acetonitril/Methanol-Mischung (12 : 1) dargestellt. In dieser Mischung war das freie Guanidin gerade noch löslich. Es entstand ein intermolekular stabilisiertes Salz im Verhältnis NONOat : Guanidinium = 2 : 1. Der Guanidin-Anteil liegt doppelt protoniert vor. Verbindung **58** wurde in Acetonitril dargestellt und liegt als intramolekular stabilisiertes Salz vor.

### 3.5 Synthesen von neuen NONOaten auf Diamin- und Triaminbasis

#### 3.5.1 Umsetzung von *N,N'*-Diisopropylethylendiamin mit Stickstoffmonoxid



Das Amin wurde vor der Umsetzung über fein gemörsertem KOH getrocknet und anschließend fraktionierend destilliert. Die Reinheit des Eduktes betrug laut GC 99.9 %, bezogen auf die Flächenprozent. Bei der Umsetzung desamins in Acetonitril mit NO nach der allgemeinen Vorschrift zur NONOat-Synthese entsteht ein farbloser Niederschlag. Die Rohausbeute betrug 19 %. Nach der Reinigung konnte man eine elementaranalysenreine Verbindung in einer Ausbeute von 10 % isolieren. Eine Syntheseoptimierung wurde in diesem Fall nicht betrieben.

Bei dieser Substanz handelt es sich um einen farblosen, fein pulvrigen Feststoff, der in einem Stickstoffkolben, unter Argon und bei -20 °C aufbewahrt werden kann. Die Elementaranalyse bestätigte die Bildung des intramolekular stabilisierten Salzes.

Die NMR-Spektren wurden in einer 3.5 M NaOD/D<sub>2</sub>O-Lösung aufgenommen. Für die eindeutige Zuordnung der Signale wurden die Spektren desamins zur Hilfe genommen. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 56) sind vier Hauptsignale erkennbar: ein Dublett bei 1.06 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.2 Hz,

welches sechs Protonen entspricht und den beiden Methyl-Gruppen der Isopropyl-Gruppe am Ammoniumstickstoff (in NaOD/D<sub>2</sub>O deprotoniert) entsprechen. Ein weiteres Dublett für sechs Protonen, ein wenig tieffeldverschoben, befindet sich bei 1.25 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.6 Hz und stammt von den sechs Methylprotonen der Isopropyl-Gruppe am Diazeniumdiolat tragenden N-Atom. Bei 2.94 ppm ist ein Multipllett, welches zwei Protonen entspricht und den Methylen-Protonen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der als Gegenion fungierenden Aminofunktion aufhalten, zugeschrieben wird. Das vierte und letzte Signal befindet sich bei 3.30 ppm, entspricht vier Protonen und wird sowohl den beiden Methin-Protonen im Molekül, als auch den restlichen Methylen-Protonen am Diazeniumdiolat tragenden Amino-N-Atom zugeordnet. Signale kleinerer Intensitäten bei 1.15 und 1.41 ppm deuten auf die Anwesenheit einer Isomerenform des NONOats hin, bzw. auf die Bildung von Zersetzungsprodukten.

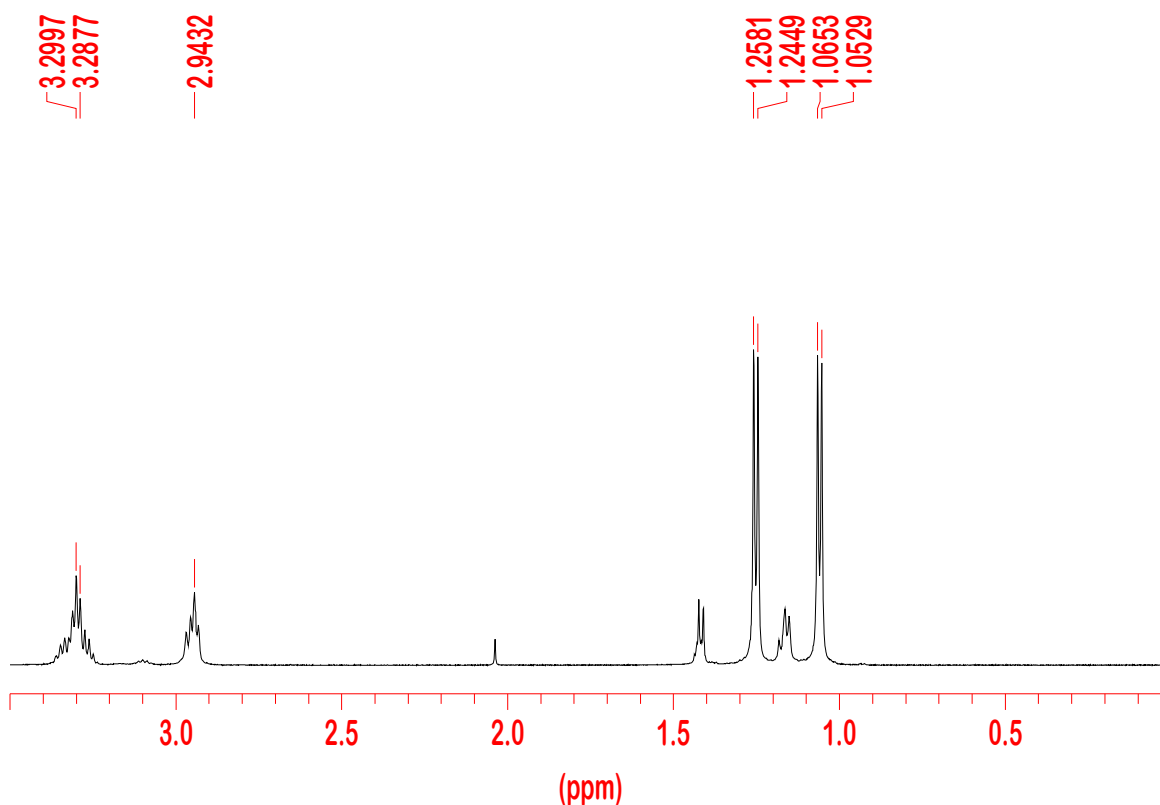


Abb. 56: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **60** in 3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O.

Im <sup>13</sup>C-Spektrum (Abb. 57) sind sechs Signale vertreten. Bei 18.4 ppm befindet sich das Signal der zwei Methyl-C-Atome, die sich auf der Seite der als

Gegenion fungierenden Amino-Gruppe befinden. Auf der anderen Seite, am Diazoniumdiolat tragenden Amin-N-Atom gebunden, befindet sich die zweite Isopropyl-Gruppe, deren zwei Methyl-C-Atome eine chemische Verschiebung von 19.3 aufweisen. Bei 41.4 ppm ist das Signal des tert. C-Atoms, das am als Gegenion fungierenden N-Atom gebunden ist. Das Signal des anderen tert. C-Atoms befindet sich bei 45.8 ppm. Das Methylen-C-Atom neben der im Feststoff protonierten Amino-Gruppe besitzt eine chemische Verschiebung von 50.6 ppm; etwas weiter tieffeldverschoben findet sich das Signal für das andere Methylen-C-Atom, nämlich bei 54.0 ppm.

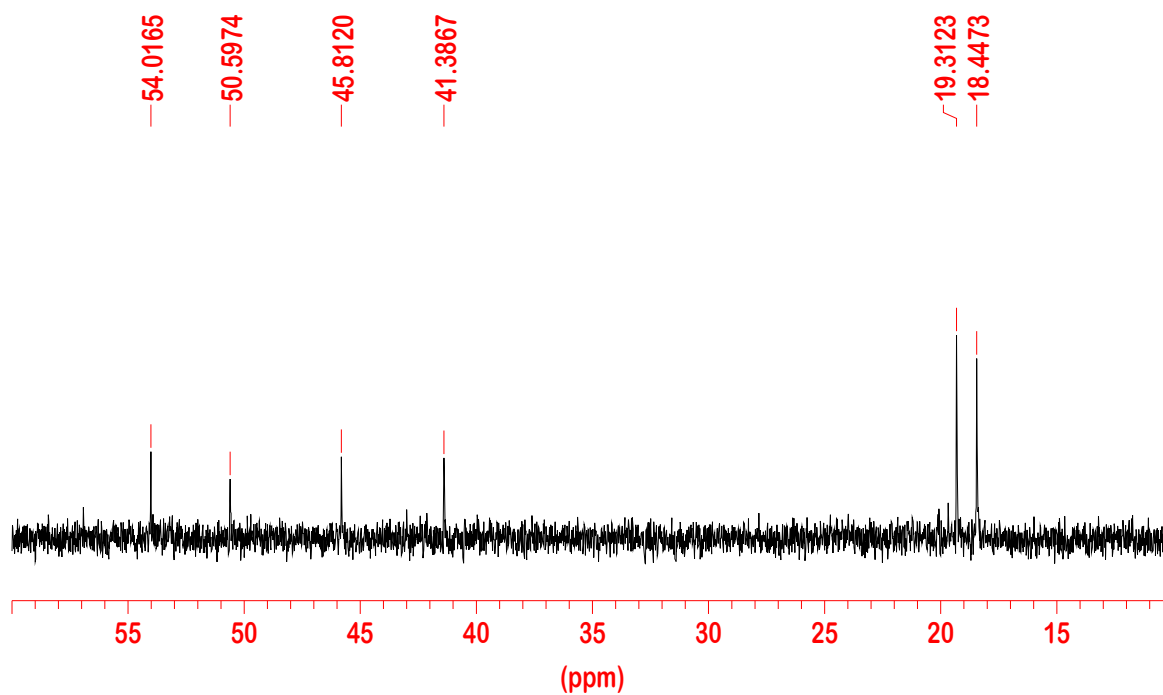
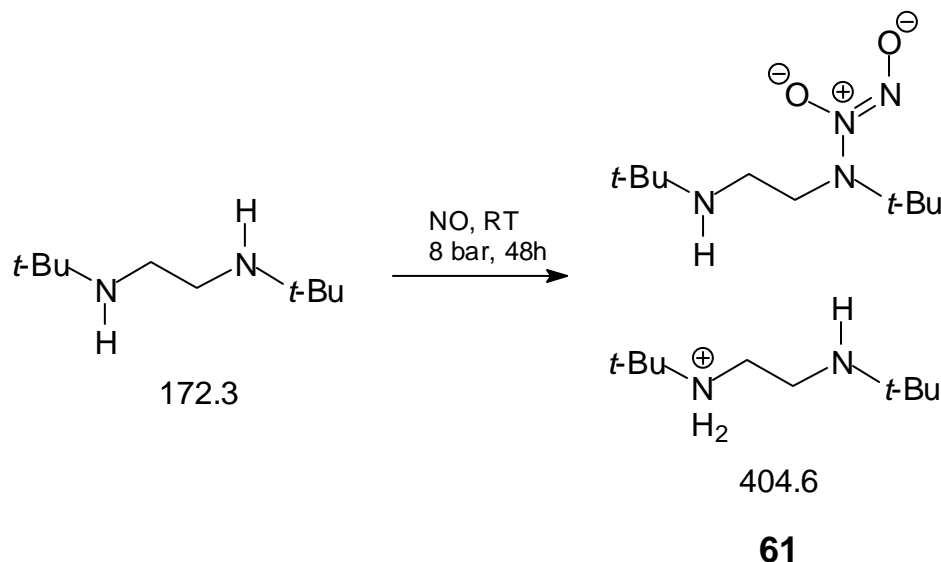


Abb. 57:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **60** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.5.2 Umsetzung von *N,N'*-Di-*t*-butylethylendiamin mit Stickstoffmonoxid



Das Amin wurde vor der Umsetzung mit Stickstoffmonoxid gereinigt. Bei der Öffnung des Autoklaven konnte die Bildung eines farblosen Niederschlages festgestellt werden. Die isolierte, gereinigte und getrocknete Substanz ist ein farbloser Feststoff, der unter Argon bei -20 °C im Tiefkühlfach aufbewahrt wird.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse deuten auf die Bildung eines Gemisches aus inter- und intramolekular stabilisiertem NONOat. Für die NMR-Analysen wurde in Analogie zu den anderen NONOaten eine 3.5 M NaOD-Lösung in D<sub>2</sub>O angefertigt. Die Signale für das NONOat-Anion und für das Ammonium-Gegenion, in NaOD als Amin vorliegend, werden hier zum besseren Verständnis getrennt voneinander beschrieben. Die Zuordnung wurde mit Hilfe der Spektren für das Amin getroffen.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 58) liegen die Signale des Diazeniumdiolats bei 0.78 ppm für neun Methyl-Protonen auf der unsubstituierten Seite, während bei 0.92 ppm das Signal für die neun Methyl-Protonen auf der anderen, der Diazeniumdiolat substituierte Seite vorhanden sind. Bei 2.17 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 5.6 Hz und zwei Protonen vertretend ist das Triplett der Methylen-Protonen des Grundgerüsts auf der unsubstituierten Seite des Moleküls. Bei 2.89 ppm ist ein breites Signal vorhanden, welches den Methylen-

Protonen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Diazeniumdiolat tragenden N-Atoms befinden, zugeordnet wird.

Für das Gegenion als freies Amin vorliegend sind zwei Signale vorhanden. Bei 0.82 ppm und 18 Protonen entsprechend, ist das Signal für die 6 Methyl-Gruppen im Molekül zu beobachten. Das weitere Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 2.34 ppm gehört den vier Methylen-Protonen im Molekül. Wie es den Intensitäten und auch den Integrationswerten zu entnehmen ist, ist der Anteil an NONOat-Anion höher als der desamins. Die Verbindung liegt demnach als eine Mischung von inter- und intramolekular stabilisiertes Salz vor. Der Anteil an intermolekular stabilisiertes Salz beträgt ~ 80 %, während der Anteil an intramolekular stabilisiertem Salz ~ 20 % beträgt.

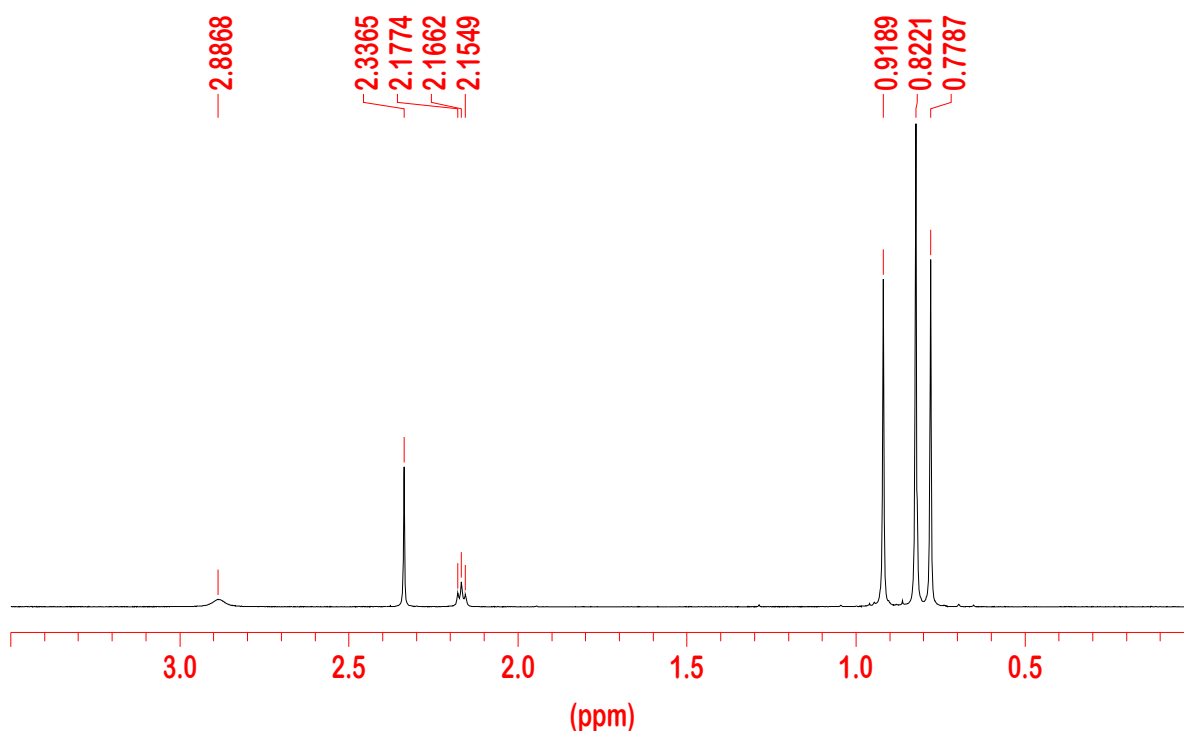


Abb. 58:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **61** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 59) zeigt neun Signale insgesamt. Analog zu der Diskussion des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums werden auch hier das Diazeniumdiolat- und das Ammonium-Rest als freies Amin vorliegend getrennt voneinander behandelt.

Bei 26.0 ppm ist das Signal der drei Methyl-C-Atome der t-Butyl-Gruppe, die sich am Diazoniumdiolat tragenden N-Atom befinden. Die anderen drei Methyl-C-Atome entsprechen dem Signal bei 27.4 ppm. Bei 37.7 ppm ist das Signal des vierfach substituierten C-Atoms der t-Butyl-Gruppe, die sich an der unsubstituierten Seite des Moleküls befindet. Bei 44.2 ppm findet sich das Signal des vierfach substituierten C-Atoms der anderen t-Butyl-Gruppe, die an der Seite des Diazoniumdiolat substituierten Amins gebunden ist. Bei 49.7 ppm ist das Signal des Methylen-C-Atoms neben der unsubstituierten Amino-Gruppe, während bei 58.3 und tieffeldverschoben das Signal des Methylen-C-Atoms neben des Diazoniumdiolat tragenden N-Atoms vertreten ist.

Die Signale des Ammonium-Gegenions, das unter diesen Messbedingungen als Amin vorliegt, werden wie folgt zugeordnet: bei 27.3 ppm und für sechs C-Atome gültig ist das Signal der sechs Methyl-C-Atome zu finden, während bei 41.6 ppm das Signal der zwei vierfach substituierten C-Atome vorhanden ist. Schließlich sind die zwei Methylen-C-Atome mit einem Signal bei 49.5 ppm vertreten.

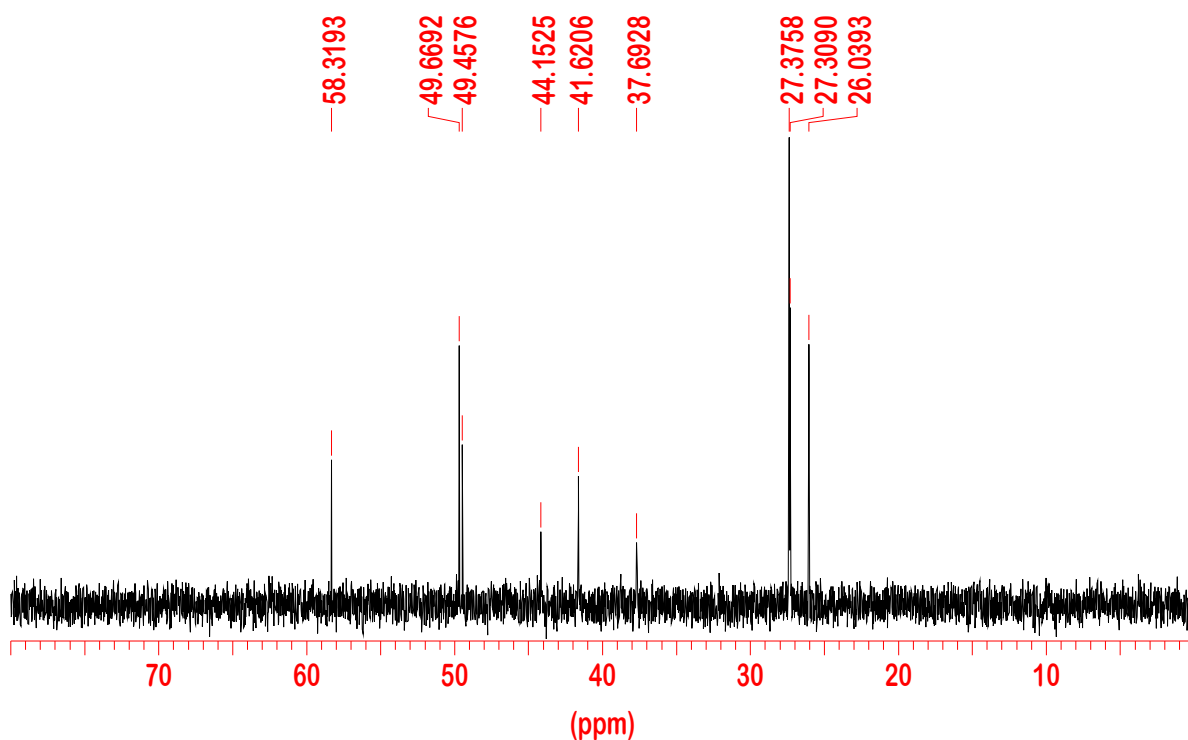
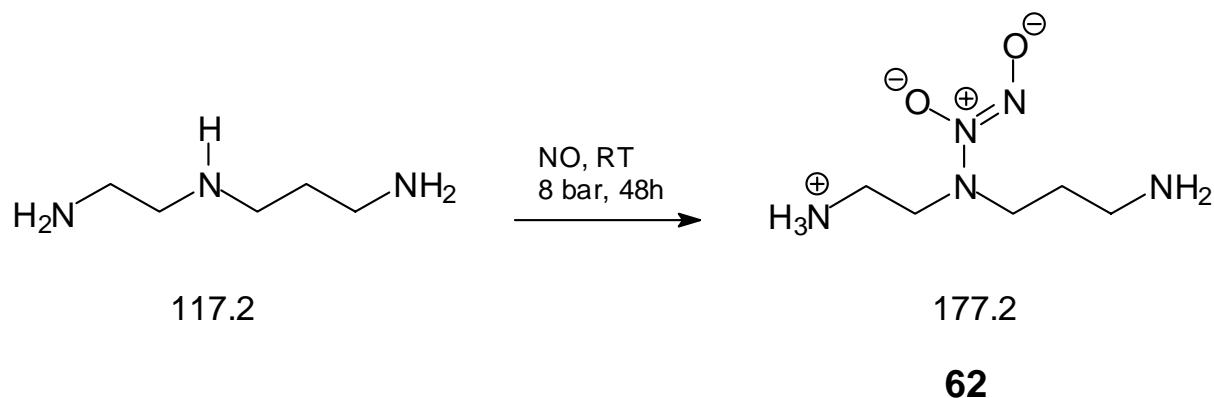


Abb. 59:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von **61** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.5.3 Umsetzung von *N*-(2-Aminoethyl)-propylamin mit Stickstoffmonoxid



Die Synthese des NONOats **62** ist in der Literatur nicht beschrieben. Das Ausgangsamin wurde vor der Umsetzung mit Stickstoffmonoxid nach der allgemeinen Vorschrift zur NONOat-Synthese gereinigt. Die Reaktion fand in einer THF/Acetonitril-Mischung (8 : 5) bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 – 8000 hPa 18 h statt. Bei der Öffnung des Reaktors konnte die Bildung eines schwach rosafarbenen kristallinen Niederschlages festgestellt werden. Die isolierte, gereinigte und von Lösungsmittelresten befreite Substanz ist ein farbloser Feststoff, der unter Argon bei -20 °C aufbewahrt wird.

Für die NMR-Analysen wurde eine 4 M NaOD-Lösung in D<sub>2</sub>O verwendet. Unter diesen Bedingungen sollte das NONOat als Anion vorliegen. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 60) zeigt die Bildung einer Mischung aus inter- und intramolekular stabilisiertem NONOat. Der Anteil des im Feststoff als Gegenion fungierenden Amins ist jedoch gering. Die Zuordnung der Signale für das NONOat erfolgte durch Vergleich der <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten. Ein Multiplett bei 2.75 – 2.71 ppm mit einem Integrationswert vier Protonen entsprechend wird als eine Überlagerung von zwei Triplets interpretiert. Diese zwei Triplets können dennoch voneinander unterschieden werden. Bei 2.74 ppm und mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 6.2 Hz findet sich das Signal der Methylenprotonen der Ethylengruppe, die sich neben dem NONOat-tragenden N-Atom aufhalten. Bei 2.72 ppm mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.3 Hz ist das Signal der Methylengruppe

der Propylenkette am NONOat-tragenden N-Atom vorhanden. Ein weiteres Triplet ist bei 2.41 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.1 Hz zu sehen. Dieses wird den Methylen-Protonen der Propylenkette, die sich neben der prim. Aminofunktion befinden, zugeordnet.

Bei 2.33 ppm findet sich ein Triplet mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 6.2 Hz, welches der anderen Methylengruppe der Ethylen-Einheit zugeordnet wird.

Zuletzt befindet sich ein Quintett bei 1.24 ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 7.2 Hz. Dieses Signal wird den Methylenprotonen in der Mitte der Propylenkette zugewiesen. Die weiteren Signale geringer Konzentration werden dem Amin zugewiesen, das im Feststoff als Gegenion fungiert. Dieser Befund erklärt auch die Abweichungen in der Elementaranalyse (s. Exp. Teil). Der intramolekulare Charakter des NONOats überwiegt jedoch.

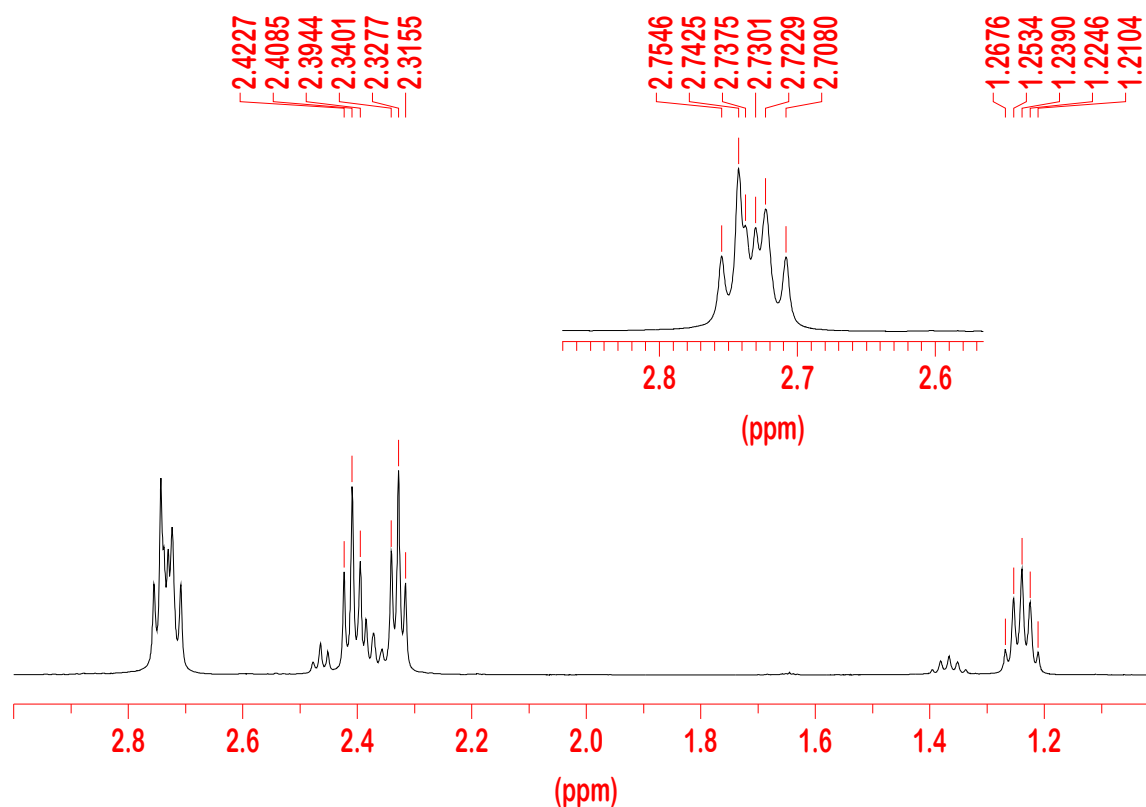


Abb. 60:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **62** in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 61) sind hauptsächlich fünf Signale vorhanden. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe des C-H-Korrelationspektrums getroffen. Bei 29.1 ppm ist das Signal des Methylen-C-Atoms in der Mitte der Propylenkette zu finden. Das Signal bei 37.6 ppm wird dem Methylen-C-Atom der Ethylen-Einheit, das sich neben dem prim. N-Atom befindet, zugeordnet. Das Signal des Methylen-C-Atoms der Propylenkette, das am prim. N-Atom gebunden ist, ist bei 38.4 ppm zu beobachten. Bei einer chemischen Verschiebung von 51.7 ppm ist das Signal des Methylen-C-Atoms der Ethylen-Einheit zu treffen, welches sich neben dem NONOat-tragenden N-Atom befindet. Schließlich findet sich bei 55.9 ppm das Signal des Methylen-C-Atoms der Propylenkette, das am NONOat-tragenden N-Atom gebunden ist. Die Signale kleinerer Intensitäten werden dem Amin zugeordnet.

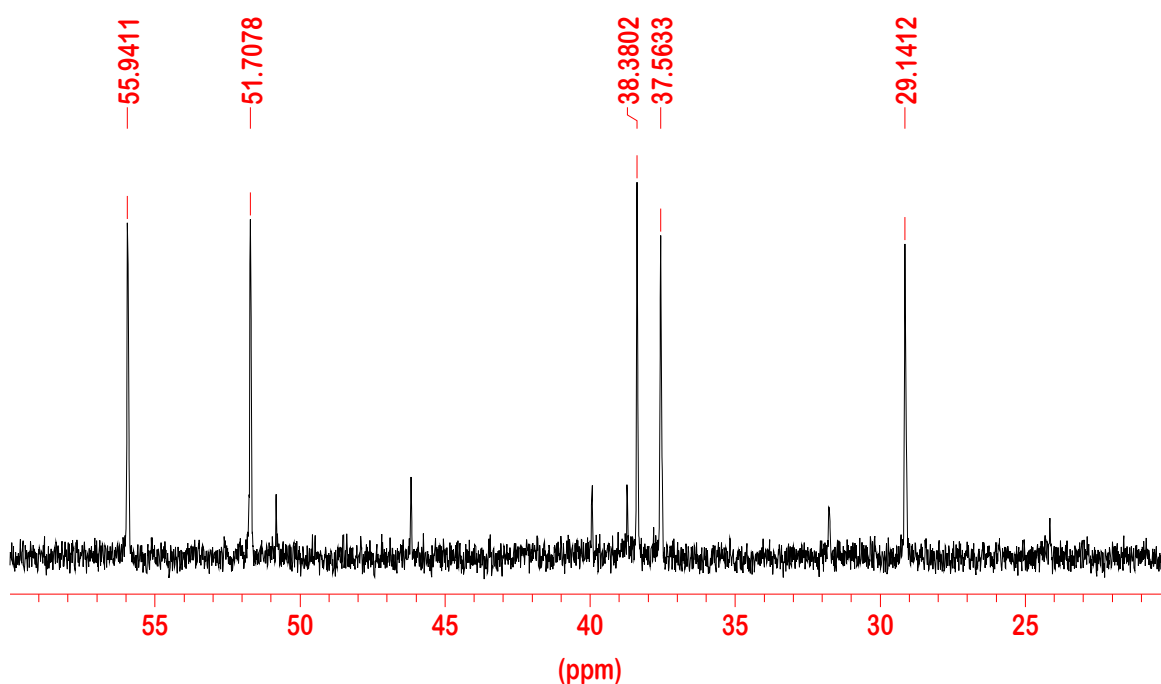


Abb. 61:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **62** in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (Abb. 62) der Verbindung zeigt fünf Signale. Die Zuordnung dieser Signale wurde mit Hilfe des  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrums des DETANO **67** und der Verbindung **66** getroffen. Bei -362.1 ppm findet sich das Signal des prim. Amin-N-Atoms, das an der Ethylen-Gruppe gebunden ist, während bei -357.5 ppm das Signal des anderen prim. N-Atoms, das an der Propylenkette ge-

bunden ist, befindet. Das Signal bei -252.9 ppm wird dem N-Atom, das die Diazoniumdiolat-Gruppe trägt, zugeordnet. Die Signale der NONOat-Gruppe sind wie folgt zu zuordnen: das Signal bei -67.1 ppm dem N-Atom, das am Gerüst gebunden ist, während Hochfeld verschoben bei 41.9 ppm das Signal des anderen N-Atoms zu finden ist.

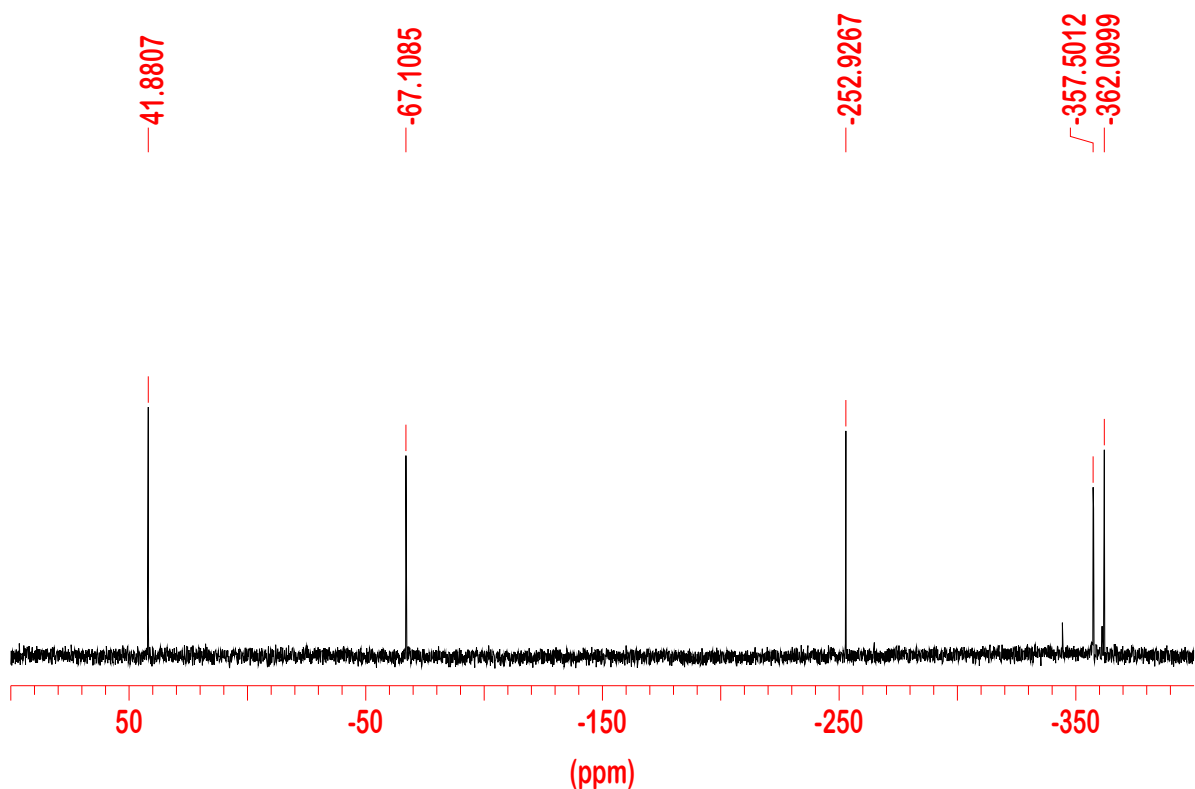
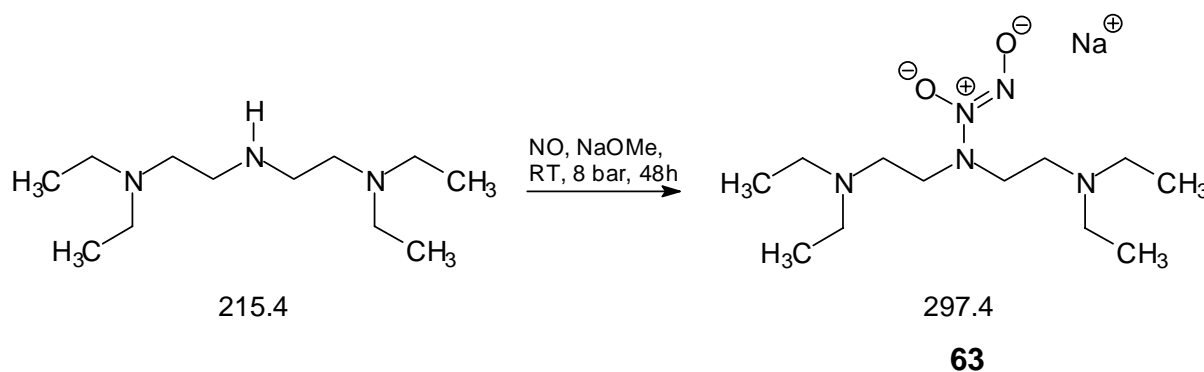


Abb. 62:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **62** in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 3.5.4 Umsetzungen von 54 und 55 mit Stickstoffmonoxid

Es wurde versucht, aus den substituierten Diethylentriaminen **54** und **55** entsprechende NONOate zu synthetisieren. Umsetzungen nach der Hochdruckmethode (Kap. 1.2.4) bei Raumtemperatur in Lösungsmittel wie Acetonitril, THF, Diethylether oder Isopropanol wurden durchgeführt, ebenfalls wurde die Niederdruck-Variante zur Darstellung von NONOaten bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Diethylether als Lösungsmittel angewandt.

### 3.5.5 Umsetzung von *N,N,N',N'*-Tetraethyldiethylentriamin **54** mit Stickstoffmonoxid



Für die erfolgreiche Umsetzung von **54** mit Stickstoffmonoxid wurde die Hochdruck-Variante mit Zugabe von NaOMe als Base verwendet. Die Reaktion fand im Autoklaven bei Raumtemperatur und einem Druck von 7000 hPa 48 h statt. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus THF und Methanol verwendet. Bei der Öffnung des Reaktors konnte die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachtet werden. Die von Lösungsmittel befreite Substanz ist farblos und feinpulvrig.

Für die NMR-Analysen wurde eine 4 M NaOD/D<sub>2</sub>O-Lösung verwendet. Unter diesen Bedingungen sollte **63** deprotoniert vorliegen. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnten Natriumformiat (aus Methanol) und Natriumnitrit als Nebenprodukte dieser Synthese eindeutig identifiziert werden. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 63) sind drei Signalgruppen vorhanden. Bei einer chemischen Verschiebung von 2.76 ppm findet sich ein Triplet mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.6 Hz vier Protonen entsprechend, welches den Methylenprotonen um das NONOat-tragende Stickstoffatom gehört. Bei 2.22 ppm ist ein Quartett mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.2 Hz vorhanden, welches acht Protonen entspricht und den Methylenprotonen der Ethyl-Substituenten im Molekül zugeordnet wird. Bei 2.17 ppm ist ein weiteres Triplet mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.6 Hz zu finden. Dieses Signal wird den restlichen vier Methylenprotonen der Ethylenketten zugewiesen. Schließlich ist bei 0.69 ppm ein Triplet mit einer <sup>3</sup>J-Kopplungskonstanten von 7.2 Hz zu beobachten, welches zwölf Protonen entspricht und den Methylgruppen im Molekül zugeordnet wird.

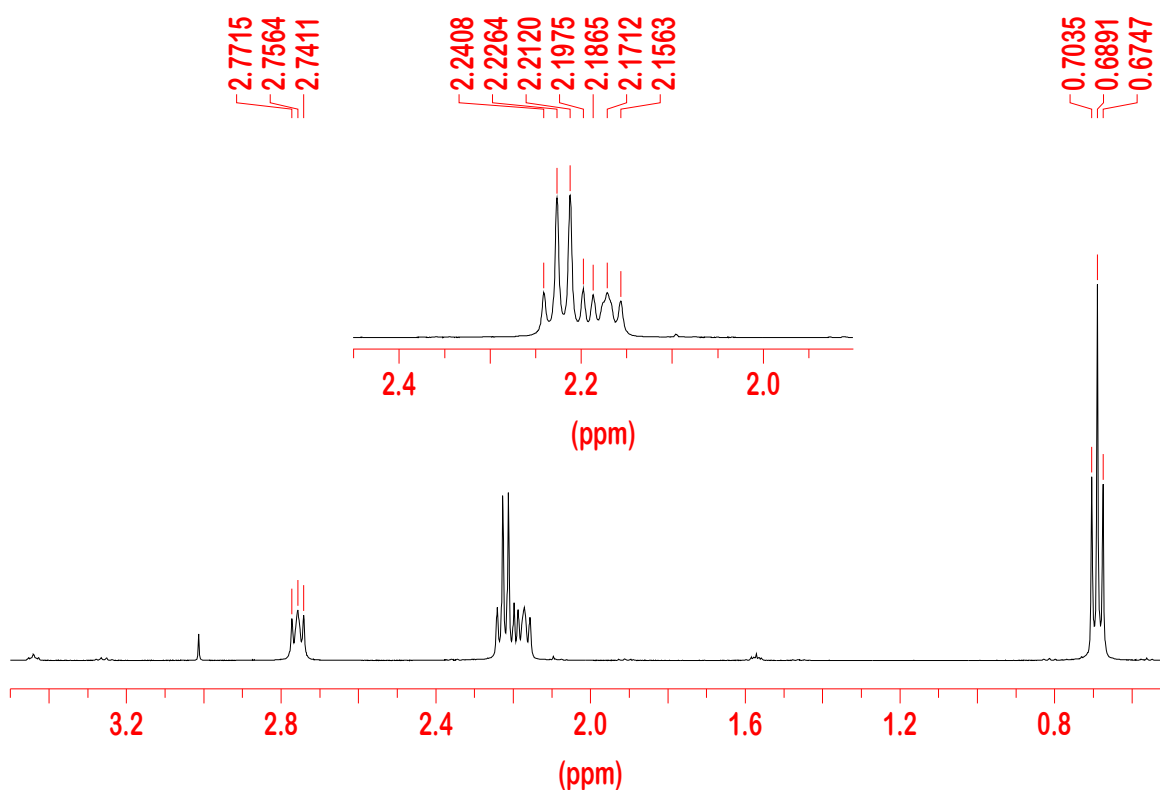


Abb. 63: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **63** in 4 M NaOD in D<sub>2</sub>O.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 64) sind vier Signale vertreten, die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von Korrelationsspektren und durch Vergleich mit den Spektren des zugrunde liegenden Amins **54** (Abb. 39) durchgeführt. Das Signal bei 50.4 ppm (50.9 ppm in Amin **54**) wird den Methylen-C-Atomen in Nachbarschaft zu dem mit zwei Ethylgruppen substituierten Stickstoffatom, das Signal bei 47.9 ppm (45.5 ppm in **54**) ist tieffeldverschoben gegenüber dem Amin und wird den Methylen-C-Atome um das NONOat-tragende Stickstoffatom zugewiesen. Das Signal bei 46.5 ppm (46.7 ppm in **54**) ist den Methylen-C-Atomen der Ethyl-Substituenten zu zuordnen, während das Signal bei 10.3 ppm (10.3 ppm in **54**) von den vier Methyl-C-Atomen im Molekül stammt.

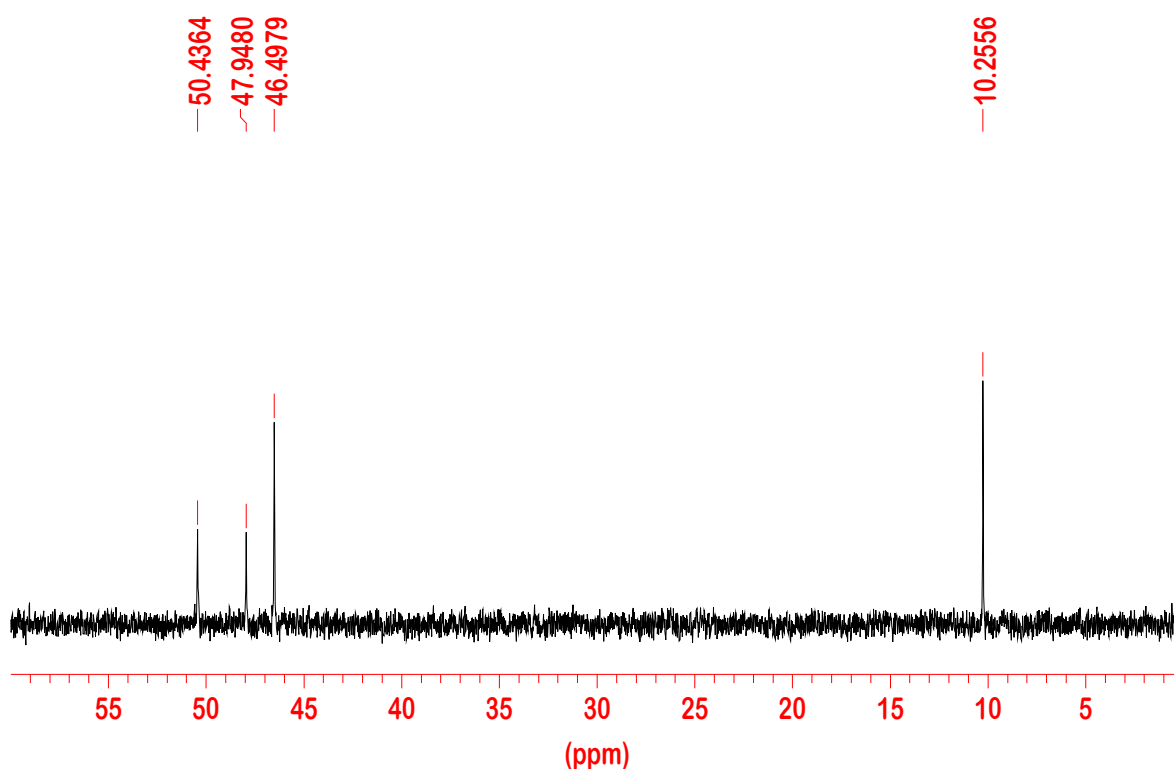


Abb. 64:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **63** in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (Abb. 65) zeigt vier Signale für die Verbindung **63**. Die mit zwei Ethylgruppen substituierten Stickstoffatome des Gerüsts sind durch ein Signal bei -336.2 ppm vertreten, während das Signal des NONOat-tragenden

Stickstoffatoms bei -253.1 ppm zu finden ist. In Analogie zu den bereits beschriebenen NONOate werden die Signale bei -66.8 und 41.9 ppm zugeordnet: das erste gehört dem N-Atom der diazeniumdiolat-Gruppe, welches am tert. N-Atom des Grundgerüsts gebunden ist, während das zweite dem verbleibenden N-Atom zugewiesen wird. Nicht mit abgebildet ist das Signal des Nitrit-Anteils, das bei einer chemischen Verschiebung von 229.3 ppm in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwerten von 228.0 ppm<sup>[123]</sup> bzw. 232.1 ppm<sup>[124]</sup> (D<sub>2</sub>O/Aceton).

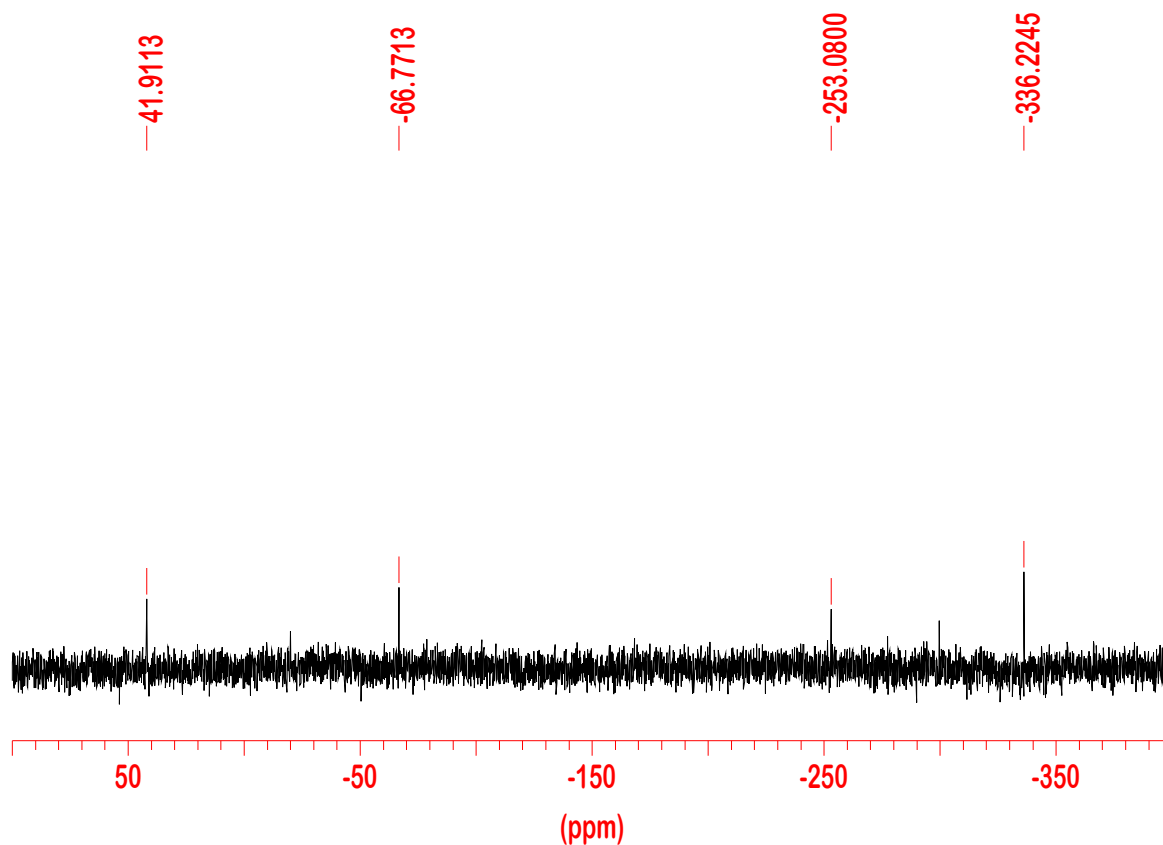
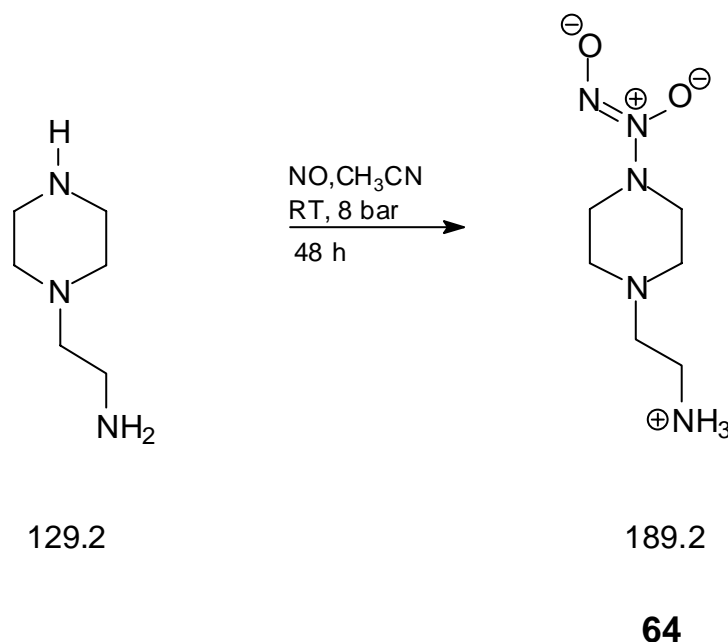


Abb. 65: <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum von **63** in 4 M NaOD in D<sub>2</sub>O.

### 3.6 Literaturbekannte NONOate

#### 3.6.1 Synthese von 1-(2-Aminoethyl)-piperazin-*N*-diazoniumdiolat **64**<sup>[57]</sup>



Die Synthese von 1-(2-Aminoethyl)-piperazindiazoniumdiolat **64** erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift für den Umgang mit Stickstoffmonoxid und ist im experimentellen Teil beschrieben. Die Ausbeute konnte gegenüber der in der Literatur<sup>[57]</sup> angegebenen erheblich verbessert werden, von 38 % auf 88 %. Es handelt sich um eine feste, farblose Verbindung, die nicht unzersetzt schmilzt. Das NONOat ist nur in Wasser oder Puffer löslich und lässt sich durch Umkristallisation nicht weiter reinigen.

Die Verbindung ist hygroskopisch und sauerstoffempfindlich. In alkalischer Lösung (pH > 12), erweist sie sich als relativ stabil. Allerdings wurde beobachtet, dass sich weniger stark basische Lösungen ([NaOD] ~ 0.01 mol/L) leichter unter Gasentwicklung zersetzen als höher konzentrierte ([NaOD] = 2 – 4 mol/L). NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden unter Bedingungen hoher Basen-Konzentration durchgeführt.

Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (Abb. 66), aufgenommen in 0.1 M NaOD in D<sub>2</sub>O, ist durch drei Signalgruppen der Intensitätsverhältnisse 2 : 6 : 4 gekennzeichnet. Da zwei Gruppen von jeweils vier Protonen gleiche chemische Verschiebungen zeigen sollten, auf Grund der Symmetrie des Moleküls, muss das Signal der rela-

tiven Intensität sechs Protonen eine Überlagerung von vier und zwei Protonen sein. Den Protonen der chemischen Verschiebung  $\delta = 2.97$  ppm mit einer  $^3J$ -Kopplungskonstanten von 5.1 Hz wird die Position neben dem Stickstoffatom zugewiesen, das die NONOat-Gruppe trägt, den Protonen neben dem anderen Stickstoffatom des Ringes kommen dann Signale im Bereich  $\delta = 2.45 - 2.55$  ppm zu. Die restlichen Signale bei 2.31 ppm mit einer chemischen Verschiebung von 7.4 Hz werden den Protonen der Ethylaminogruppe zugeordnet.

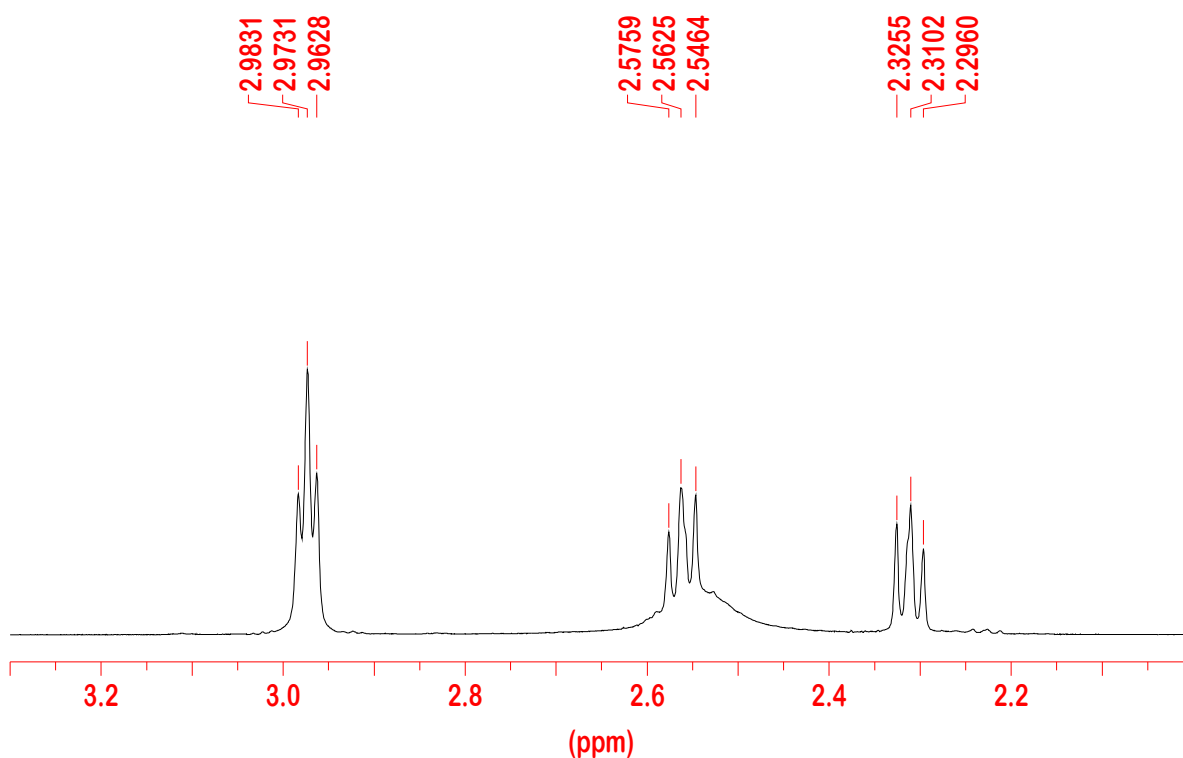


Abb. 66:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **64** in 0.01M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum (Abb. 67) zeigt die aufgrund der Symmetrie erwarteten vier Signale. Bei 40.1 ppm ist das Signal des Methyl-C-Atoms der Ethylaminogruppe am Ende der Kette. Bei 53.6 ppm ist das Signal der Methylen-C-Atome im Ring neben dem Ethylaminsubstituierten N-Atom. Bei 54.1 ppm ist das Signal der Methylen-C-Atome im Ring neben dem N-Atom, das die NONOat-Gruppe trägt, zu finden. Ein letztes Signal bei 61.9 ppm wird dem Methylen-C-Atom der Ethylgruppe, das am N-Atom des Ringes gebunden ist, zugeordnet.

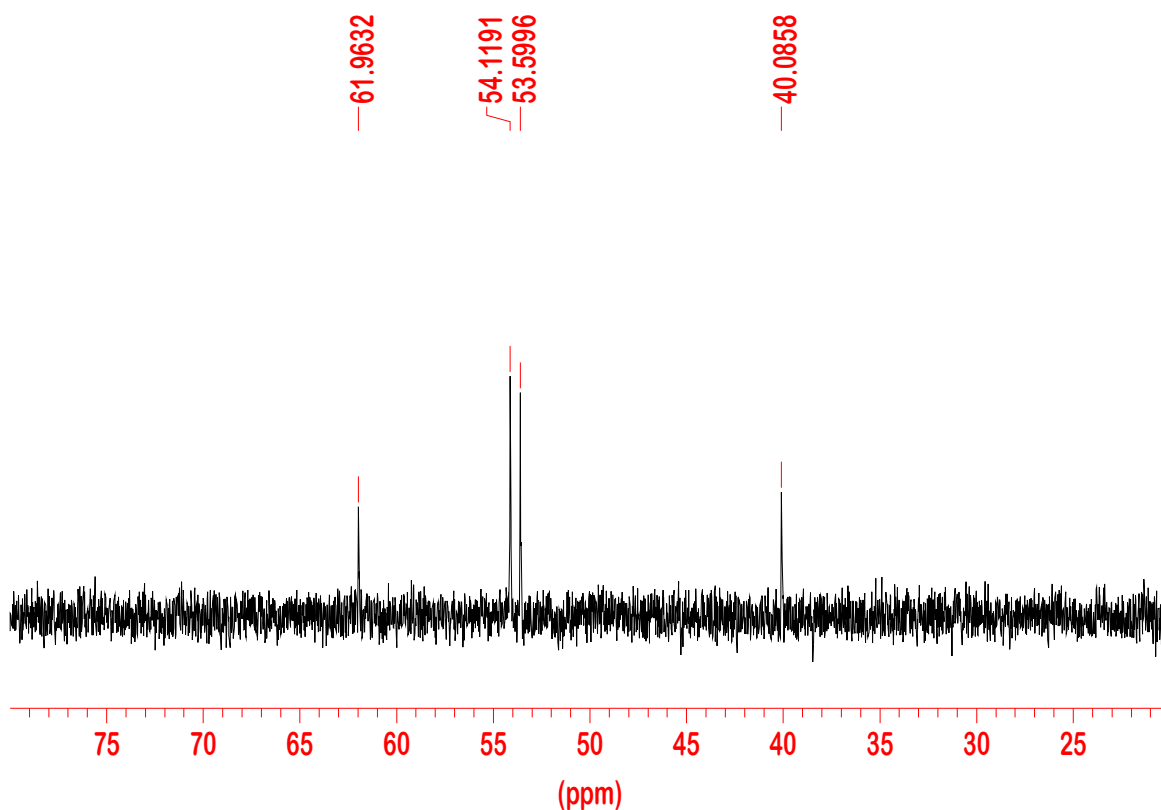


Abb. 67:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **64** in 0.01M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (Abb. 68) in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$  zeigt fünf Signale. Bei -361.2 ppm ist das Signal des Ethylamino-N-Atoms am Ende der Kette zu finden. Das Signal bei -336.6 ppm stammt vom ethylaminosubstituierten N-Atom des Ringes. Bei -253.5 ppm findet sich das Signal des Stickstoffatoms im Ring, das die NONOat-Gruppe trägt. Weiter im Tieffeld bei -60.8 ppm befindet sich das Signal des N-Atoms der Diazeniumdiolat-Gruppe, das am N-Atom des Ringes gebunden ist, während das Signal bei 36.6 ppm dem anderen N-Atom derselben Gruppe zugeordnet wird.

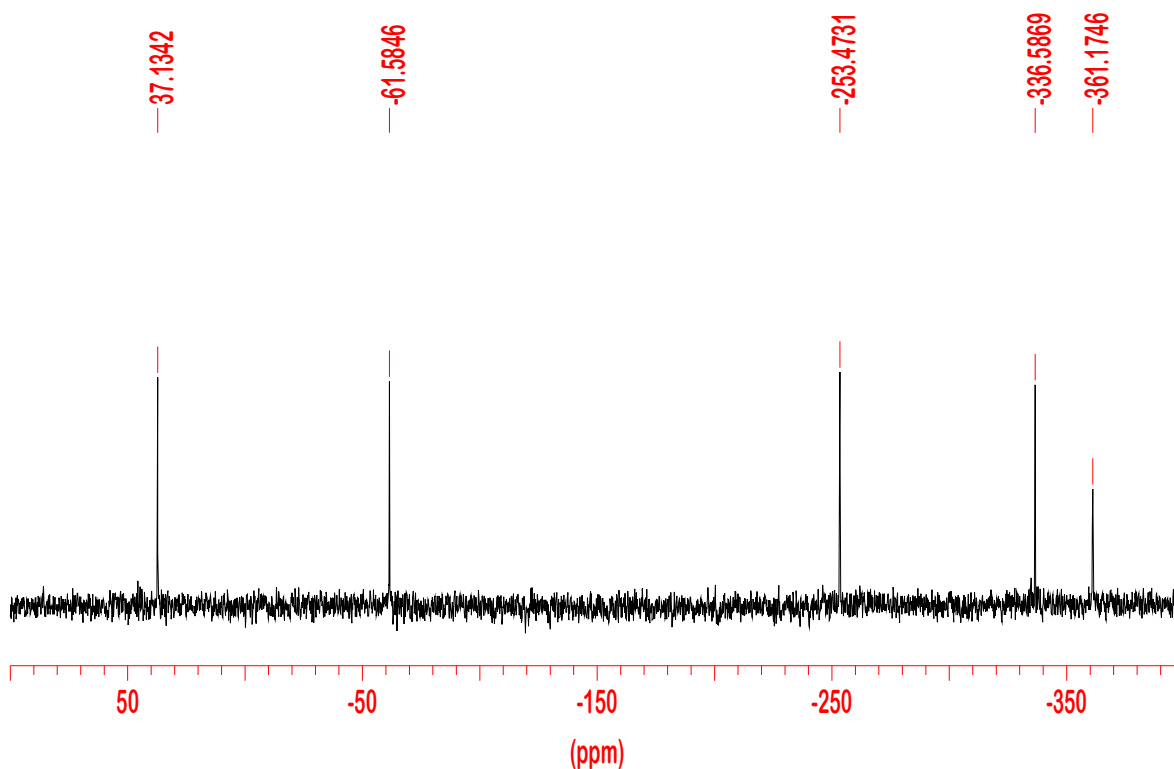


Abb. 68:  $^{15}\text{N}$ -Spektrum von **64** in 4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Ein  $^{15}\text{N}$ -CP/MAS Spektrum (Abb. 69) weist fünf Signale auf, eine Zahl, die aufgrund der Struktur erwartet wird. Das Signal bei -347.7 wird dem Ethylamino-N-Atom zugeordnet, während das Signal bei -333.5 ppm vom ethylaminosubstituierten N-Atom im Ring stammt. Das N-Atom, das die Diazoniumdiolat-Gruppe trägt ist bei -251.2 ppm zu beobachten. Zwei Signale sind von der Diazoniumdiolat-Gruppe anwesend, bei -57.1 ppm das Signal des N-Atoms, das am Ring gebunden ist und bei 53.7 ppm das Signal des anderen N-Atoms der NONOat-Gruppe.

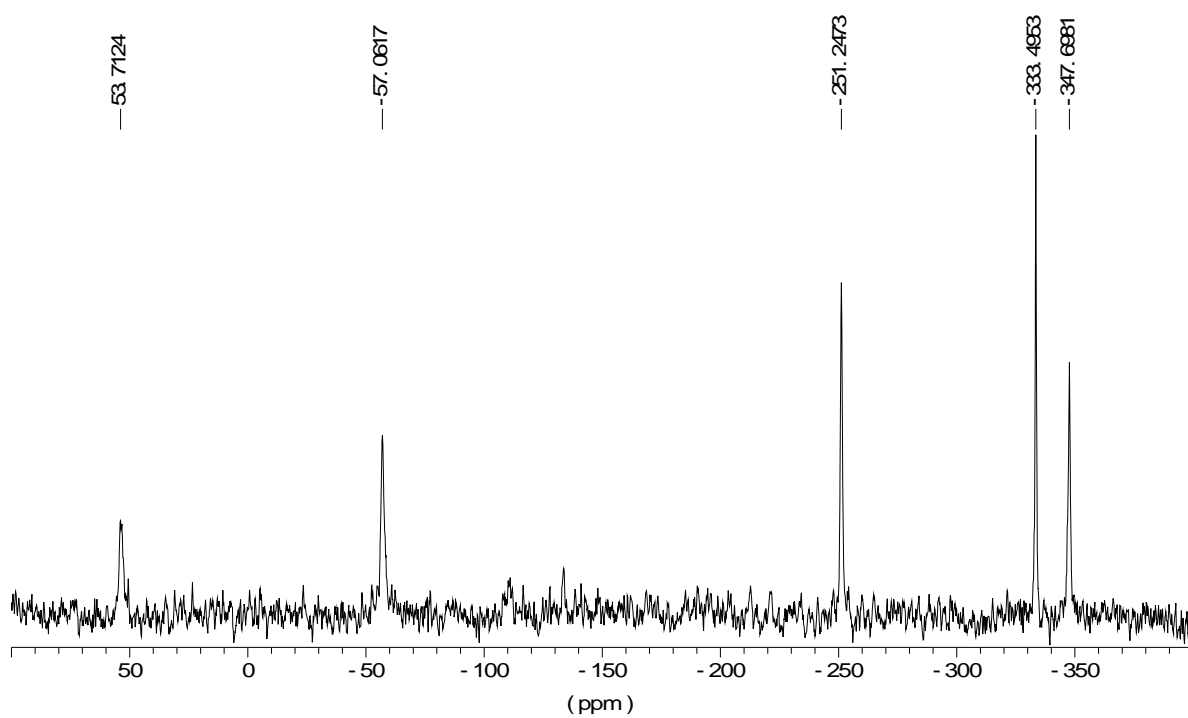
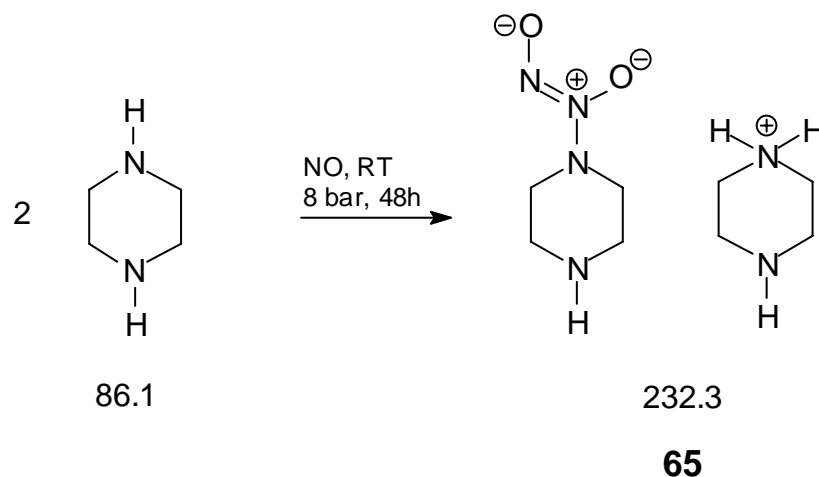


Abb. 69:  $^{15}\text{N}$ -CP/MAS-Festkörper-NMR-Spektrum von **64**; Rotationsfrequenz (MAS): 5.0 kHz; Referenz: Ammoniumnitrat.

### 3.6.2 Synthese von Piperazin-*N*-diazoniumdiolat **65**<sup>[125]</sup>



Piperazin wurde nach der allgemeinen Methode mit Stickstoffmonoxid umgesetzt. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der abgetrennt, gewaschen und von Lösungsmittelresten befreit wurde. Die Elementaranalyse spricht für die Bildung des intermolekular stabilisierten Salzes. Die Abweichungen in der Elementaranalyse könnten durch ein Gemisch aus inter- und intramolekular stabilisiertem NONOat erklärt werden.

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in 3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O (Abb. 70) unterstützt die intermolekulare Zusammensetzung für das NONOat **65**. Es werden drei Signale beobachtet, ein Singulett bei  $\delta = 2.70$  ppm und zwei Triplets bei  $\delta = 2.96$  und 3.08 ppm mit  $^3J = 5.0$  Hz. Die Intensität des Singuletts ist doppelt so hoch wie die der Summe der Intensitäten der beiden Triplets. Bei dieser Zusammensetzung wird für das deprotonierte Kation (Piperazin) ein Singulett für acht Protonen erwartet, da die Stickstoffatome aufgrund des stark basischen Milieus nicht protoniert sind. Das Anion dagegen sollte unterschiedliche chemische Verschiebungen für die CH<sub>2</sub>-Gruppen neben dem Stickstoffatom mit der Diazoniumdiolat-Gruppe und für die CH<sub>2</sub>-Gruppen neben dem zweiten Stickstoffatom des Piperazins zeigen.

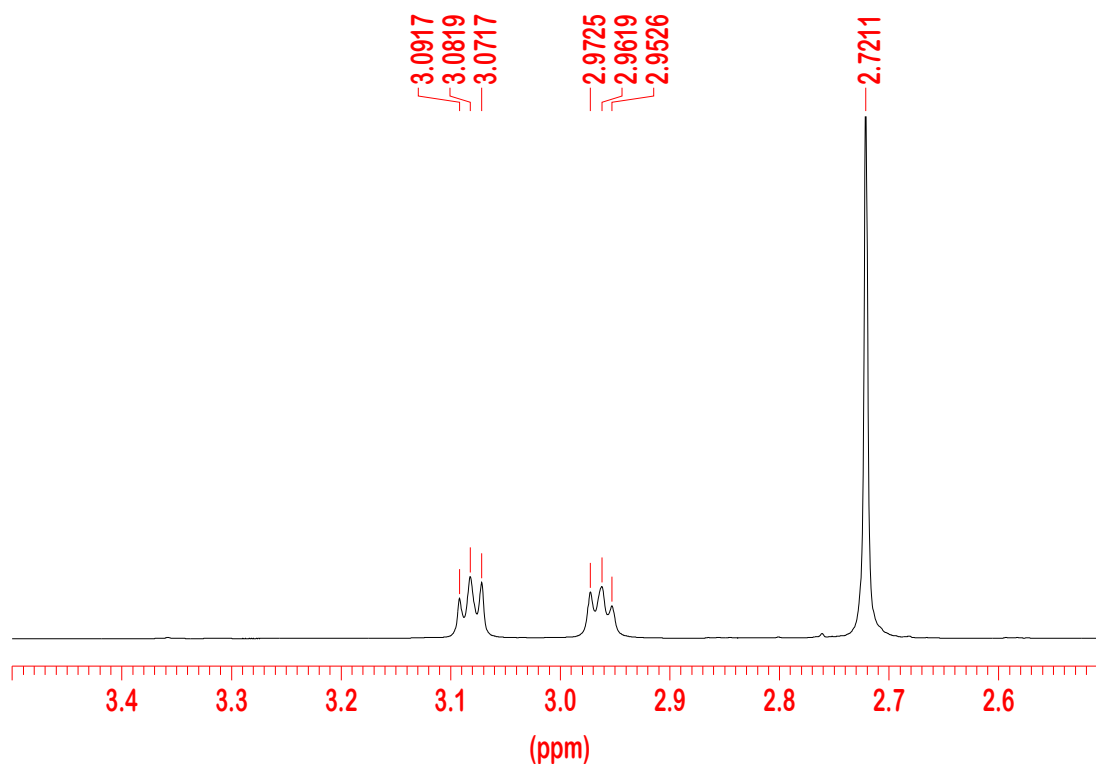


Abb. 70:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **65** in 0.01 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Dieser Interpretation folgt auch das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 71) mit seinen drei Signalen für unterschiedliche Kohlenstoffatome. Für den Piperazin-Anteil wird ein Signal bei 47.6 ppm beobachtet. Bei 54.9 und 46.4 ppm sind die Signale des NONOat-Anteils zu finden. Das tieffeldverschobene Signal bei 54.9 ppm stammt von den Methylen-C-Atomen neben dem NONOat-tragenden Stickstoffatom, während das Signal bei 46.4 ppm den C-Atomen neben dem zweiten Stickstoffatom im NONOat-Molekül zugeordnet werden.

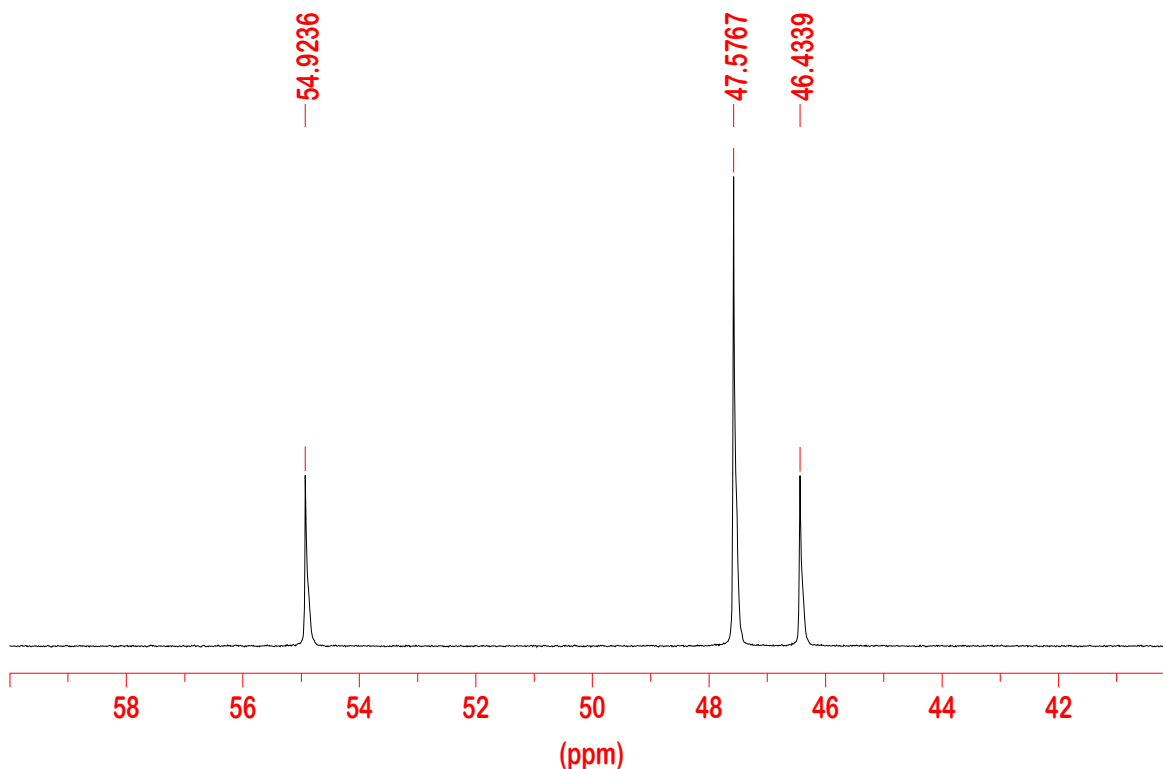


Abb. 71:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **65** in 0.01 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

In 3.5 M NaOD ist **65** so stabil, dass ein  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (Abb. 72) aufgenommen werden konnte. Es werden fünf Signale erwartet und auch beobachtet. Das Piperazin-Anteil wird durch ein Signal bei  $-346.6$  ppm vertreten, während die restlichen vier Signale dem NONOat-Anteil im Molekül gehören. Bei  $-349.2$  ppm findet sich das Signal des unsubstituierten Stickstoffatoms im Ring, während das Signal bei  $-253.5$  ppm vom NONOat-tragenden Stickstoffatom stammt. Bei  $-60.8$  und  $36.6$  ppm finden sich die Signale der Diazeniumdiolat-Gruppe: das Erste wird dem Stickstoffatom, das am Stickstoffatom des Ringes gebunden ist, zugewiesen. Das Zweite wird dem verbleibenden N-Atom zugeordnet.

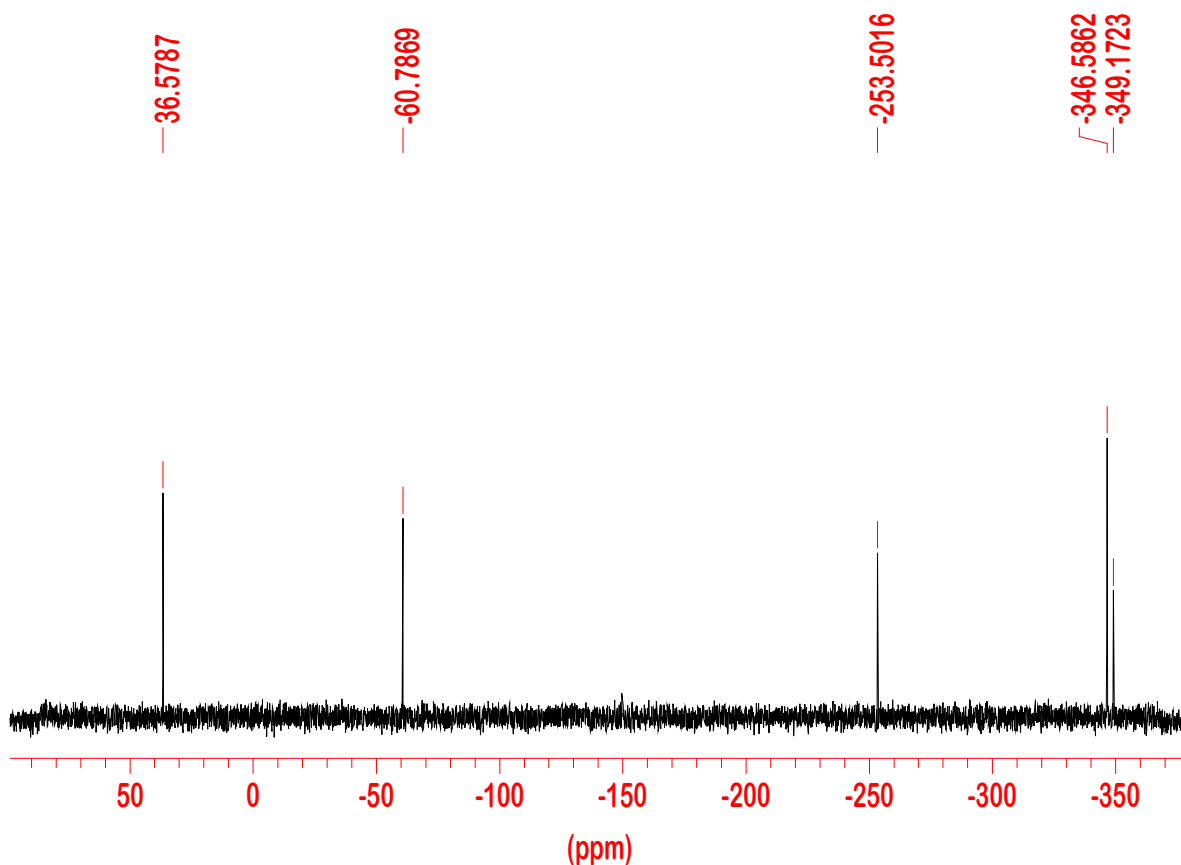


Abb. 72:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **65** in 3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Von der Verbindung wurde ebenfalls ein  $^{15}\text{N}$ -Festkörper CP/MAS Spektrum (Abb. 73) aufgenommen. Statt der fünf Signale in Lösung treten vier auf. Dies ist bedingt durch die geringere Auflösung, die die Signale bei  $-349.2$  und  $-346.6$  ppm zusammenfallen lässt. Die chemischen Verschiebungen in Lösung und im Festkörper sind etwas unterschiedlich, ohne dass sich daraus Schlussfolgerungen ziehen lassen. Ein Unterschied besteht allerdings zwischen Festkörper und stark alkalischer  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung. In der alkalischen Lösung dürfte kein N-Atom protoniert sein, während im Festkörper ein Ammoniumstickstoff vorhanden sein muss.

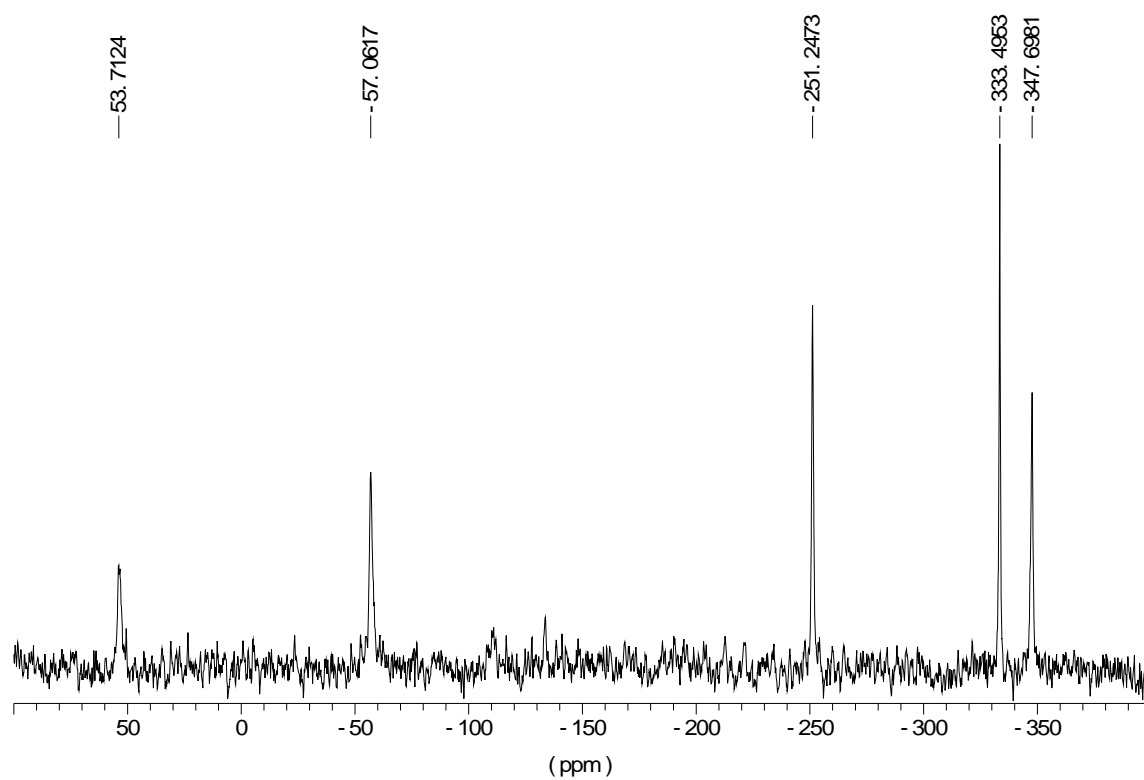
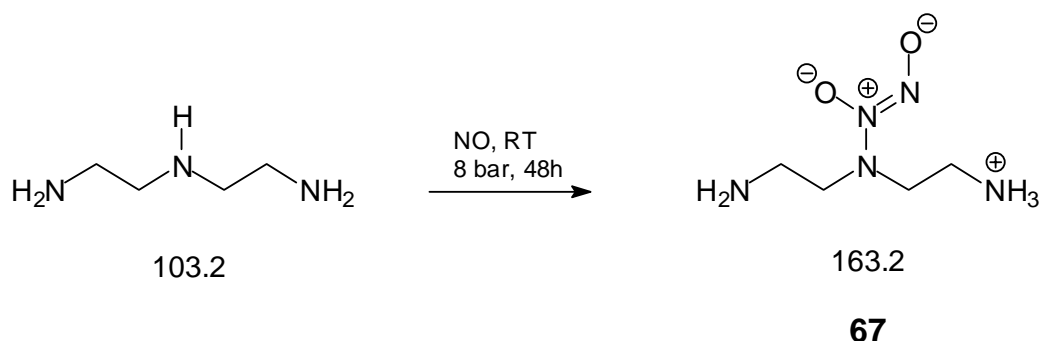
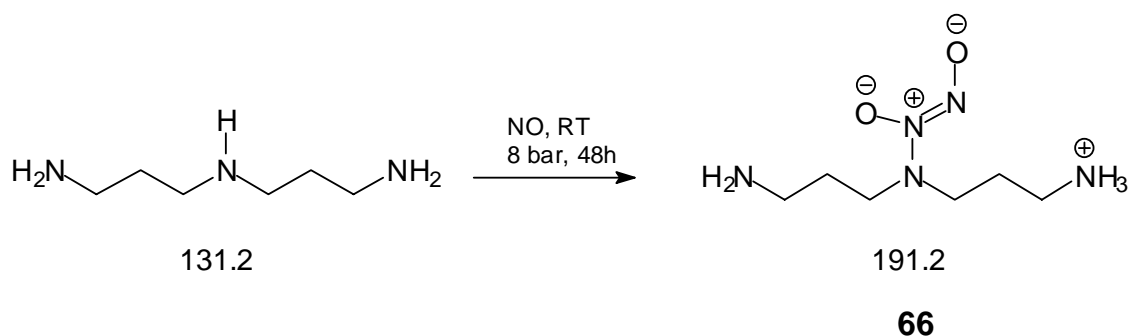


Abb. 73:  $^{15}\text{N}$ -CP/MAS-Festkörper-NMR-Spektrum von **65**; Rotationsfrequenz (MAS): 5.0 kHz; Referenz: Ammoniumnitrat.

### 3.6.3 Weitere synthetisierte (literaturbekannte) NONOate



Für die Studien in dieser Arbeit wurden ausgehend aus Bis-(3-amino-propyl)-amin und Diethylentriamin die literaturbekannten NONOate **66** (Ausbeute: 77 %, Lit.<sup>[57]</sup> 94 %) und **67** (Ausbeute: 80 %, Lit.<sup>[57]</sup> 90 %) synthetisiert. Die Umsetzungen erfolgten nach der allg. Vorschrift zur NONOat-Synthese in Acetonitril als Lösungsmittel. In beiden Fällen war bei der Öffnung des Reaktors, die Bildung eines farblosen Niederschlages festzustellen. Die isolierten Feststoffe sind farblos und werden unter Argon bei -20 °C aufbewahrt. Diese Synthesen wurden nicht optimiert. Im Fall von **67** waren noch Reste von nicht umgesetztem Amin vorhanden, diese Reste wurden durch mehrmaliges Digerieren des Feststoffs (30 min, Acetonitril) entfernt. Die Abbildungen der NMR-Spektren befinden sich im Experimentellen Teil. Zur eindeutigen Identifizierung der Signale wurden die NMR-Spektren der Ausgangsamine verwendet.

### 3.7 UV-Spektroskopische Untersuchungen zum Zerfall der NONOate

Der Zerfall der NONOate wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt.<sup>[57, 61, 77, 126]</sup> Wie bereits in Kap. 1.2.5 erwähnt, besitzen NONOate (*N*-Diazeniumdiolate) eine charakteristische Absorptionsbande bei einer Wellenlänge von 246 – 253 nm. Diese Bande beschreibt wahrscheinlich einen  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang. Dabei zeigt weder das HOMO noch das LUMO des Diazeniumdiolat-Fragments eine starke Wechselwirkung mit den Orbitalen des Grundgerüsts.

Die Messungen zur Bestimmung der maximalen Absorptionswellenlänge  $\lambda_{\max}$  und des dazugehörigen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  wurden im alkalischen Medium (0.01 M NaOH) durchgeführt. Die Konzentration der NONOat-Maßlösungen beträgt in der Regel 1 mM. Für die Messungen werden 250 bzw. 300  $\mu\text{L}$  abgenommen und jeweils, entweder auf 2500 oder 3000  $\mu\text{L}$  mit einer 0.01 M NaOH-Lösung aufgefüllt.

In wässrigen, auf pH 7.0 – 7.4 gepufferten Lösungen, ist eine Abnahme der Intensität der Bande zu beobachten. Die Abnahme dieser Bande wird in der Literatur in Verbindung mit der NO-Freisetzung gebracht. Sie ist von der Protonenkonzentration (pH-Wert der Pufferlösung) und von der Temperatur abhängig. Je höher die Protonenkonzentration ist, desto schneller erfolgt die Abnahme der Intensität dieser Bande. Über die zeitliche Verfolgung der Abnahme der Absorption bei der maximalen Wellenlänge ( $\lambda_{\max} \sim 246 - 253 \text{ nm}$ ) kann die Kinetik des Zerfalls gemessen werden. Sie lässt sich mit einer Kinetik 1. Ordnung beschreiben:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k \cdot [A]$$

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k \cdot t$$

Übertragen auf das Lambert-Beersche Gesetz lauten die Gleichungen:

$$\ln \frac{E}{E_0} = -k \cdot t$$

$$\ln \frac{E - E_\infty}{E_0 - E_\infty} = -k \cdot t$$

Für die Halbwertszeit folgt daraus:  $t_{1/2} = \ln 2/k$

Die kinetischen Messungen wurden unter physiologischen Bedingungen, d. h. in Phosphatpufferlösung ( $\text{pH} = 7.36 \pm 0.03$ ) und bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C oder bei  $22.0 \pm 2.0$  °C gemäß der allg. Vorschrift zur UV- und Fluoreszenzmessungen (s. Kap. 5.8.1) durchgeführt. Die Auswertung der Daten lieferte den Wert für den Extinktionskoeffizienten, die Geschwindigkeitskonstante  $k$  und daraus resultierend den Wert für die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der jeweiligen Verbindung

In Tab. 1 sind die Werte der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen aufgelistet. Mit Ausnahme der Verbindungen **64** und **65**, die bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C gemessen wurden, erfolgten die kinetischen Messungen unter physiologischen Bedingungen ( $\text{pH} = 7.36$  und  $37.0 \pm 0.1$  °C).

Tab. 1: Experimentell ermittelte Werte für den Zerfall der synthetisierten N-Diazeniumdiolate unter physiologischen Bedingungen ( $\text{pH} = 7.36$  und  $37.0 \pm 0.1$  °C) mit Ausnahme von **64** und **65**, die bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C gemessen wurden.

Verbindung	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$\epsilon$ [L·mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
<b>57</b>	$253.0 \pm 0.5$	$6500 \pm 50$	$(2.89 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	$399 \pm 2$
<b>58</b>	$251.0 \pm 0.5$	$7380 \pm 10$	$(1.72 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$	$670 \pm 10$
<b>59</b>	$251.0 \pm 1.0$	$9350 \pm 50$	$(1.83 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	$63.3 \pm 1.8$
<b>60</b>	$250.0 \pm 0.5$	$8110 \pm 10$	$(6.28 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	$183.4 \pm 0.8$
<b>61</b>	$251.0 \pm 0.5$	$8670 \pm 50$	$(1.54 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	$75.0 \pm 1.0$
<b>62</b>	$250.0 \pm 0.5$	$8300 \pm 50$	$(2.56 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	$450 \pm 2$
<b>63</b>	$250.0 \pm 0.5$	$5360 \pm 50$	$(1.97 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	$585 \pm 2$
<b>64</b>	$246.0 \pm 0.5$	$5810 \pm 10$	$(1.62 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$	$7.1 \pm 0.2$
Lit. <sup>[57]</sup>	k. A.*	$5800 \pm 20$	$2.31 \cdot 10^{-3}$	5.0
<b>65</b>	$250.0 \pm 0.5$	$7800 \pm 40$	$(1.10 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$	$10.5 \pm 0.3$
Lit. <sup>[125]</sup>	252	7850	$2.20 \cdot 10^{-3}$	5.3 (37 °C)
<b>66</b>	$249.0 \pm 0.5$	$8050 \pm 50$	$(9.37 \pm 0.37) \cdot 10^{-5}$	$123.3 \pm 5.0$
Lit. <sup>[57]</sup>	252	7860	$1.39 \cdot 10^{-4}$	83
<b>67</b>	$250.0 \pm 0.5$	$7600 \pm 40$	$(0.98 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	$1180 \pm 20$
Lit. <sup>[57, 127]</sup>	252	7640	$0.96 \cdot 10^{-5}$	1200

\* k. A. = keine Angabe

Literaturbekannt sind die Verbindungen **64** – **67**.<sup>[57, 125, 127]</sup> Die NONOate **64** und **65** zeichnen sich durch eine hohe Geschwindigkeitskonstante bzw. kurze Halbwertszeit des Zerfalls bei pH 7.36 und 22 °C aus. Verbindung **66** hat bei pH 7.36 und 37 °C eine Halbwertszeit von 83 min bei einem Extinktionskoeffizienten von 7860 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bzw. 284 min gemessen in gleichem Puffer und bei einer Temperatur von 22 °C. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) ergaben für diese Verbindung einen Wert von 123.0 ± 5.0 min für die Halbwertszeit und 8050 ± 50 L·mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> für den Extinktionskoeffizienten.

Das langlebigste, wasserlösliche NONOat, das DETANO **67** besitzt eine Halbwertszeit von 3400 min<sup>[57]</sup> in Pufferlösung pH 7.4 bei 22 °C, unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4 und 37 °C) beträgt die Halbwertszeit 1200 min. Unsere Messungen ergaben unter gleichen Bedingungen einen Wert von 1180 ± 20 min. Der Grund für diese besondere Stabilität wird in der Literatur mit besonders stabilen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den terminalen Amin-Funktionen und der Diazeniumdiolat-Gruppe erklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von neuen NONOat-Verbindungen synthetisiert. Die Verbindungen **57**, **58** und **59** sind Vertreter einer neuen Verbindungsklasse, der Guanidin-NONOate. Durch den Einbau der Guanidin-Gruppe am Diethylentriamin-Grundgerüst konnten Moleküle geschaffen werden, die über zwei biologisch sehr interessante funktionelle Gruppen verfügen: die Guanidin- und die Diazeniumdiolat-Funktion. Guanidin-NONOate besitzen  $\lambda_{\max}$ -Werte von 253 nm (**57**), 251 nm (**58**) und 251 nm (**59**). Diese Werte unterscheiden sich nur wenig von den Werten der klassischen NONOate, die zwischen 246 – 250 nm absorbieren. Die Verbindung **58** besitzt einen Extinktionskoeffizienten von 7380 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda_{\max} = 251$  nm. Die Auswertung der kinetischen Daten ergab einen Wert von  $1.72 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls und daraus einen Wert von 670 min ( $\sim 11$  h) für die Halbwertszeit des Zerfalls bei pH 7.36 und 37 °C. Somit ist diese Verbindung das zweitstabilste, bekannte wasserlösliche NONOat überhaupt. Verbindung **57** besitzt einen molaren Extinktionskoeffizienten von 6500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda_{\max} = 253$  nm und eine Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls von  $k = 2.89 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} =$

400 min;  $\sim 6.7$  h). Dieses Molekül zeichnet sich durch die Anwesenheit von zwei Guanidingruppen am Diethylentriamin-Grundgerüst aus.

Die UV-Charakterisierung der Verbindung **59** ergibt einen Extinktionskoeffizienten von  $9350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei  $\lambda_{\text{max}} = 251 \text{ nm}$ . Die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls beträgt  $1.83 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 63 \text{ min}$ ) bei pH 7.36 und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Es wurden aber auch neue Verbindungen auf der Basis von Ethylendiamin als Grundgerüst synthetisiert. Verbindung **60** besitzt einen Isopropyl-Rest an jeder Seite des Ethylendiamin-Gerüsts. Die maximale Absorption liegt bei  $250 \text{ nm}$  mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $8110 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die kinetischen Messungen in Phosphatpufferlösung (pH 7.36 und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ergaben einen Wert von  $6.28 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls ( $t_{1/2} = 183 \text{ min}$ ;  $\sim 3 \text{ h}$ ). Messungen bei einer Temperatur von  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden nicht durchgeführt. Wenn man annimmt, dass die gemessene Halbwertszeit bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  6 bis 9 mal größer als die Halbwertszeit bei  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  ist,<sup>[57]</sup> kann man von einem Wert zwischen  $1100$  und  $1650 \text{ min}$  ausgehen. Die Synthese dieser bzw. ähnlicher NONOate wurde in der Literatur<sup>[57]</sup> als nicht möglich eingestuft.

Verbindung **61** trägt eine *t*-Butylgruppe an jeder Seite des Ethylendiamin-Grundgerüsts. Die UV-Charakterisierung ergab einen Wert von  $251 \text{ nm}$  für das Maximum der Absorption und einen Wert von  $8670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für den zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten. Die Auswertung der kinetischen Daten lieferte den Wert von  $1.54 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls und daraus  $75 \text{ min}$  für die Halbwertszeit, gemessen unter physiologischen Bedingungen.

Verbindung **62** ist eine neue Substanz. Das Ausgangsamin ist ein unsymmetrisches Triamin mit einer Ethylen- und einer Propylen-Gruppe um die sekundäre Aminofunktion. Der  $\lambda_{\text{max}}$ -Wert befindet sich bei  $250 \text{ nm}$  mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $5360 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Zerfallsdaten ergaben einen Wert von  $2.56 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante und daraus eine Halbwertszeit von  $450 \text{ min}$  ( $\sim 7.5 \text{ h}$ ).

Ebenfalls neu ist Verbindung **63**, die eine Absorptionswellenlänge für das Maximum von  $250 \text{ nm}$  und einen dazugehörigen Extinktionskoeffizienten von  $5360 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  besitzt. Die kinetischen Daten des Zerfalls ergaben nach Auswertung

einen Wert von  $1.97 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  für die Geschwindigkeitskonstante und 585 min ( $\sim 9.8 \text{ h}$ ) für die Halbwertszeit.

### 3.7.1 Diskussion der Ergebnisse

Die neuen NONOate auf Ethylendiamin- und Triamin-Basis (**68** und **69** mit  $n = n' = 2$  oder  $3$ ) besitzen Halbwertszeiten des Zerfalls in Phosphatpuffer (pH 7.36 und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), die zwischen den zwei bisher bekannten stabilsten NONOaten **66** und **67** liegen.

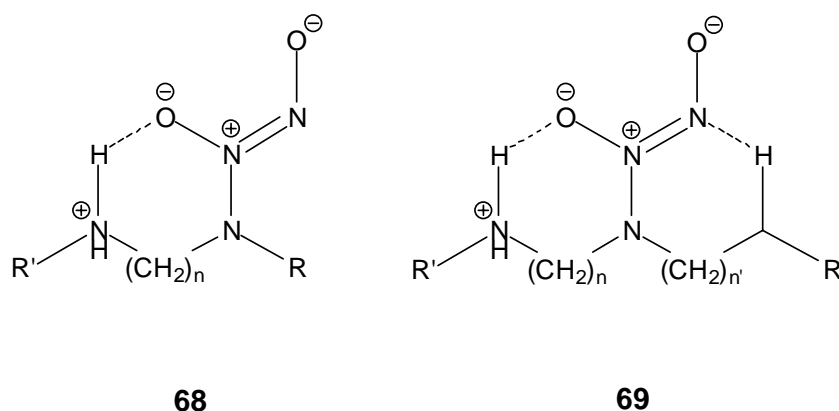


Abb. 74 stellt Verbindungen **57**, **58**, **62**, **63**, **66** und **67** mit ihren unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gemessenen Halbwertszeiten des Zerfalls gegenüber. Die neu dargestellten Verbindungen sind blau gekennzeichnet. Der Vergleich zwischen **62**, **66** und **67** zeigt, dass die zweite Ethylenamin-Gruppe in **67** einen stabilisierenden Einfluss ausübt. Der Abstand zwischen den terminalen Amino/Ammoniumfunktionen und der Diazoniumdiolat-Gruppe ist bei **67** günstig, so dass stabile Wasserstoffbrückenbindungen auf beiden Seiten entstehen können. Verbindung **62** besitzt nur auf einer Seite diesen optimalen Abstand. Ein weiterer Faktor ist statistischer Natur: unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sollte mindestens eine der terminalen Aminogruppen protoniert vorliegen. Im Fall von **67** gäbe es dann mindestens 5 Protonen, die zur Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stünden, während in **63** maximal zwei Protonen diese Aufgabe erfüllen könnten. Bei **62** wären e-

benfalls mindestens fünf Protonen vorhanden, von denen sich jedoch maximal drei im optimalen Abstand zur Diazeniumdiolat-Gruppe befinden würden. Im Guanidin-NONOat **57** könnten auf Grund des starken basischen Charakters zwei Protonen zu diesem Zweck dienen, die positive Ladung ist jedoch delocalisiert (Kap. 3.2). Bei Verbindung **58** ist die Situation ähnlich, zwei Protonen stünden hier zur Verfügung.

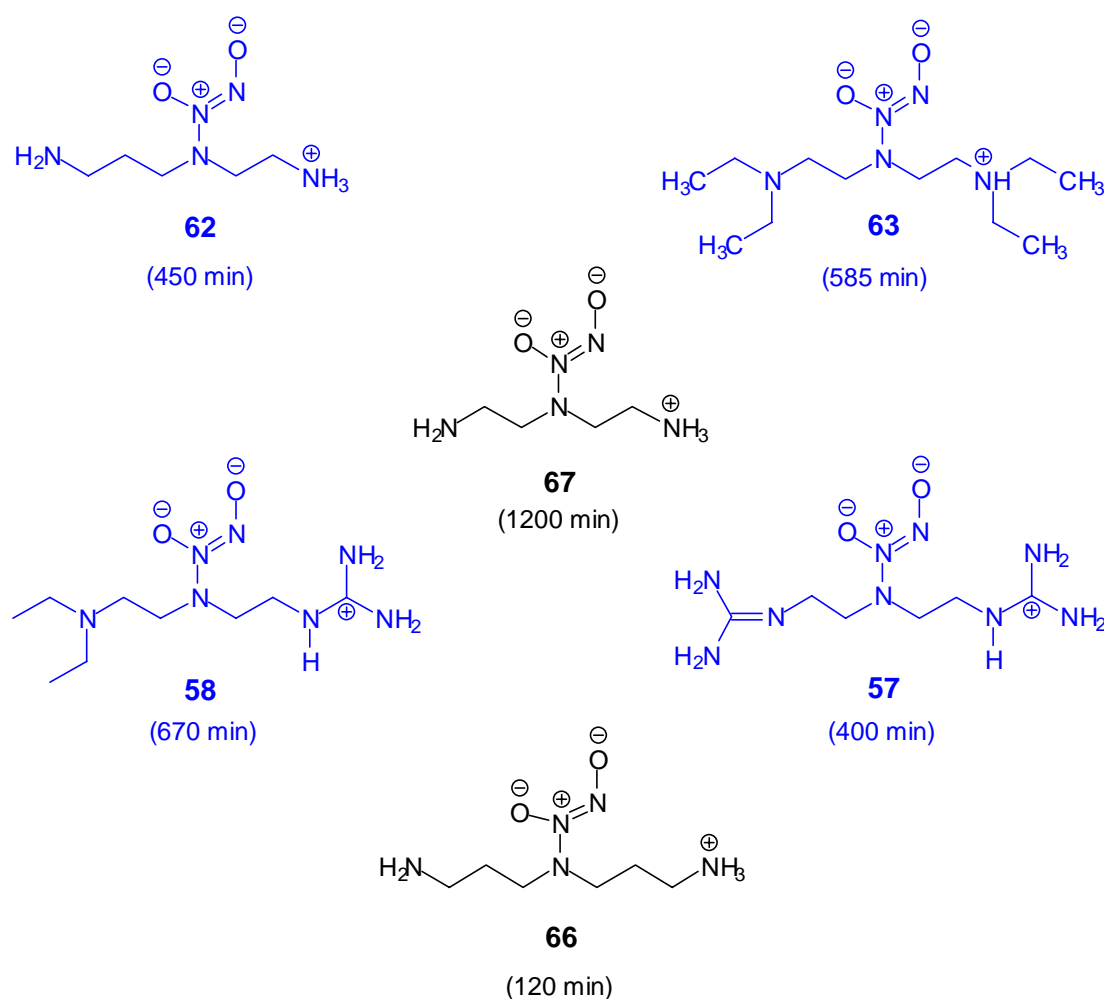


Abb. 74: Vergleich zwischen Verbindungen **57**, **58**, **62**, **63**, **66** und **67**. In Klammern befinden sich die unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) gemessenen Halbwertszeiten des Zerfalls.

In der Literatur werden NONOate mit einem Ethylen- und Propylen-Gerüst beschrieben, die mit geraden Alkylketten substituiert sind (Tab. 2): eine Verlängerung der Alkylsubstituenten führt zu einer Stabilisierung des NONOats in Pufferlösungen. Bei **61** und **62** (Abb. 75) handelt es sich um NONOate mit einem Ethylendiamin-Gerüst und verzweigten Seitenketten (*i*-Propyl- und *t*-Butyl-Gruppen). Der in der Literatur beschriebene Trend konnte nur teilweise bestätigt werden. Bei Verbindung **61** sind wahrscheinlich sterische Gründe für die geringere Stabilität in Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.36 und 37 °C) verantwortlich.

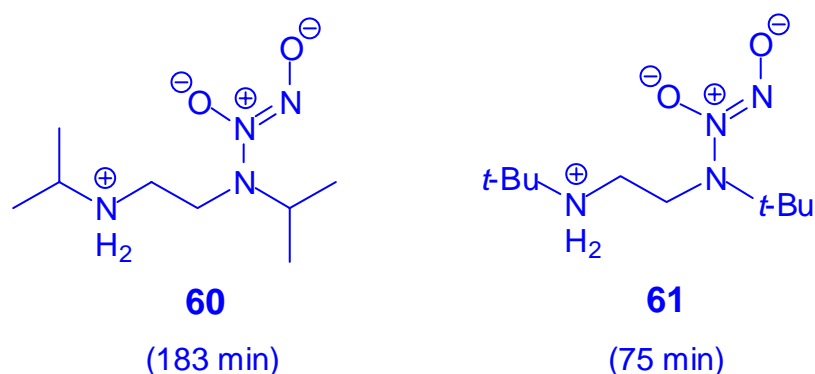
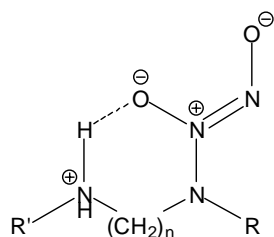


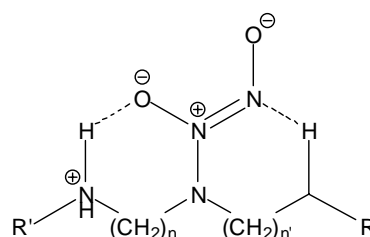
Abb. 75: Neue NONOate mit einem Ethylendiamin-Gerüst und mit verzweigten Seitenketten im Vergleich. In Klammern befinden sich die unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) gemessenen Halbwertszeiten des Zerfalls.

In Tab. 2 ist außerdem zu erkennen, dass sich die Halbwertszeiten der Verbindungen mit einem Ethylendiamin-Gerüst, bei denen  $R = R' = \text{Me}$  bzw.  $R = \text{Me}$  und  $R' = \text{H}$  (36. 1 und 40 min jeweils) ist, sowie die der Verbindungen mit  $R = R' = \text{Et}$  bzw.  $R = \text{Et}$  und  $R' = \text{H}$  (327 und 222 min jeweils) nur wenig von einander unterscheiden. Es wird ersichtlich, dass die Anwesenheit der Gruppe  $R'$  nur wenig Einfluss auf eine zusätzliche Stabilisierung des Teilchens in Lösung (pH 7.4 und 22 °C) ausübt. Erkennbar ist auch, dass eine Verlängerung der zentralen Alkylkette ( $n = 2$  bzw.  $3$ ) bei sonst gleich bleibenden strukturellen Merkmalen zu einer Destabilisierung der NONOate um den Faktor 3 – 5 führt.

Tab. 2: Tabellarische Übersicht zum Substituenteneinfluß einiger in der Literatur zitierten NONOate<sup>[57]</sup> auf Alkyldiamin- und Tri- bzw. Polyamin-Basis. Die Halbwertszeiten wurden in Phosphatpuffer (pH 7.4) bei  $22.0 \pm 2.0$  °C gemessen.



68



69

n	n'	R	R'	$t_{1/2}$
2	-	Me	H	40
3	-	Me	H	13.7
2	-	Me	Me	36.1
3	-	Me	Me	10.1
2	-	Et	H	333
2	-	Et	Et	327
3	-	Et	Et	71.8
2	-	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	(~ 500)
3	-	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	88.5
3	-	Pr	H	76.6
3	-	<i>i</i> -Pr	H	93.0
2	2	H	H	3400
3	3	H	H	284
3	4	H	H	165
3	4	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	230

### 3.7.2 Untersuchungen zum Zerfall von *N*-Diazeniumdiolaten in Abhängigkeit vom pH-Wert

Der Zerfall von NONOaten ist pH-abhängig und wird mit abnehmendem pH beschleunigt. Verbindungen **57** und **58** sind zwei Vertreter der neuen Familie der Guanidin-NONOate, die ausgesucht wurden, um diesen Effekt in einem pH-Bereich von 4 – 8 zu studieren. Diese Verbindungen zeichnen sich durch Halbwertszeiten von 400 und 670 min jeweils unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) aus.

Für die UV-Messungen wurden drei Pufferlösungen benutzt: ein Phosphat-, ein Acetat- und ein sog. McIlvaine-Puffer. Die Konzentrationen und Zusammensetzungen der Puffer für den gewünschten pH-Wert sind im experimentellen Teil (Kap. 5.8.2, Tab. 14) beschrieben. Die Pufferlösungen wurden in Gefäßen mit Bodenfritte 30 - 45 min mit Argon gespült. Da diese Lösungen nicht unendlich haltbar sind, ist eine frische Zubereitung empfehlenswert. Die kinetischen Daten wurden bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C ermittelt, aus diesem Grund ist eine Temperierung der Maßlösungen 20 - 30 min vor der Messung notwendig. Die untersuchten Verbindungen sind in Abb. 76 gezeigt.

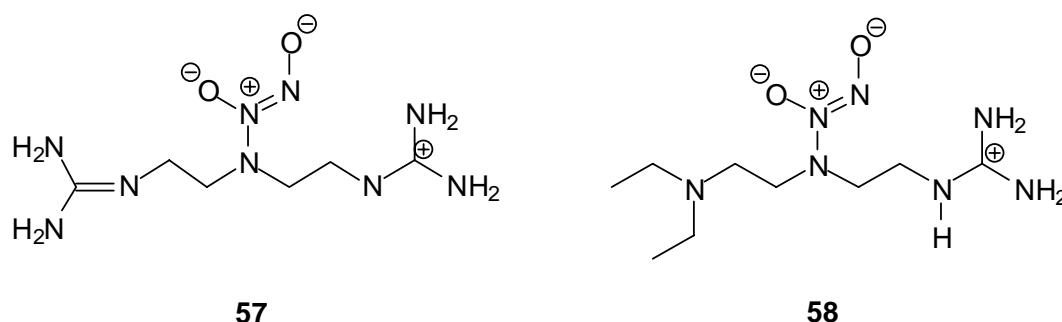


Abb. 76: Messungen der pH-Wert Abhängigkeit des Zerfalls von **57** und **58**.

Die Werte für die Geschwindigkeitskonstante und die Halbwertszeit des Zerfalles der Verbindung **57** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Temperatur

von  $37.0 \pm 0.1$  °C sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Daten wurden in einem pH - Bereich von 4.00 – 7.96 gemessen.

Tab. 3: *k*-Werte und Halbwertszeiten des Zerfalles in Puffer-Lösungen für die Verbindung **57** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei  $37.0 \pm 0.1$  °C.

pH	<i>k</i> [s <sup>-1</sup> ]	<i>t</i> <sub>1/2</sub> [min]
4.00	$(1.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	0.88
4.77	$(5.44 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	2.12
4.91	$(1.59 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	7.24
5.23	$(3.33 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	3.47
5.75	$(1.11 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	10.4
6.06	$(4.87 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	23.7
6.22	$(3.54 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	32.6
6.35	$(2.90 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	39.9
6.64	$(1.76 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	65.5
6.69	$(1.28 \pm 0.60) \cdot 10^{-4}$	90.3
6.92	$(9.10 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	127.0
7.00	$(6.16 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	187.5
7.08	$(5.66 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	204.0
7.36	$(2.89 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	399.0
7.46	$(2.50 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	462.1
7.63	$(2.23 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	517.3
7.96	$(1.23 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	936.0

Tab. 4 gibt die gemessenen *k*-Werte des Zerfalls für **58** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C wieder. Die Daten wurden in einem pH - Bereich von 3.99 – 7.36 gemessen.

Tab. 4:  $k$ -Werte und Halbwertszeiten für den Zerfall in Puffer-Lösungen von **58** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei  $37.0 \pm 0.1$  °C.

pH	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
3.99	$(8.05 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	1.44
4.33	$(3.90 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	2.96
4.58	$(2.74 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	4.21
4.77	$(1.86 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	6.22
5.23	$(8.20 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	14.1
5.46	$(5.55 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	20.8
5.61	$(4.08 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	28.3
5.83	$(1.86 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	62.2
5.92	$(1.50 \pm 0.60) \cdot 10^{-4}$	76.8
6.06	$(1.65 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	70.1
6.22	$(1.20 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	96.3
6.62	$(5.33 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	216.7
6.64	$(5.77 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	200.0
6.92	$(3.72 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	310.7
7.36	$(1.77 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	653

Abbildungen 77 und 78 zeigen die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  des Zerfalles vom pH-Wert bei  $37.0 \pm 0.1$  °C für **57** und **58** jeweils. Der Verlauf der Kurven zeigt, dass bei abnehmendem pH-Wert der Zerfall immer schneller wird.

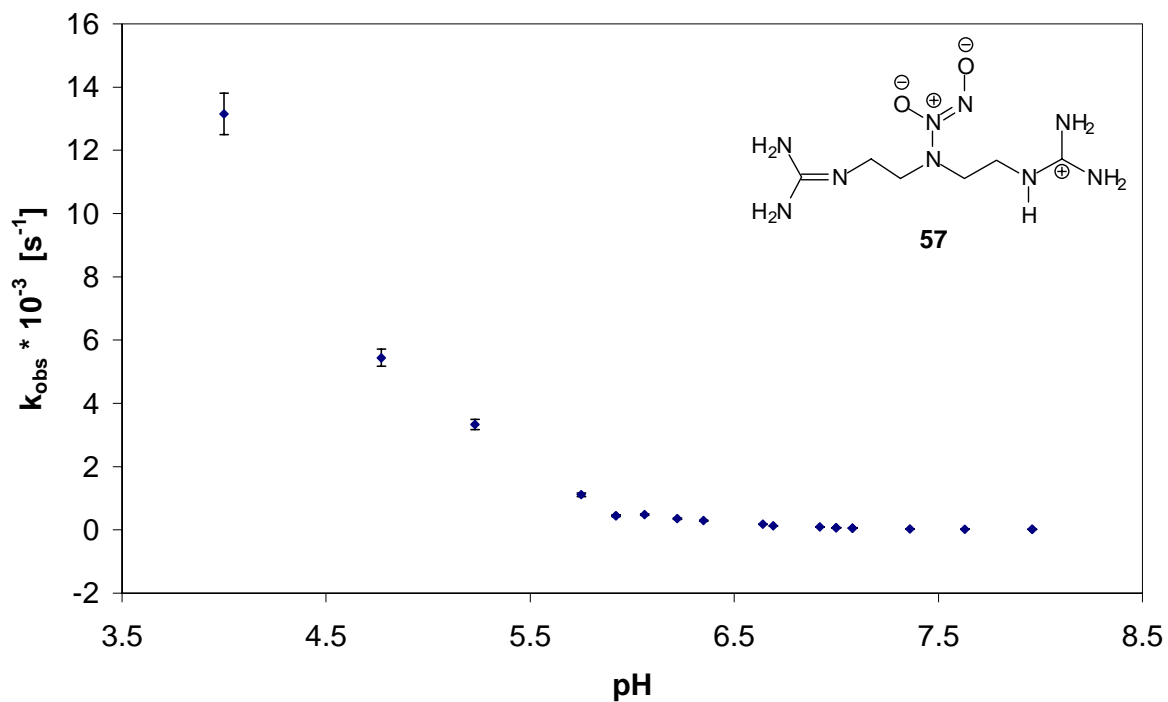


Abb. 77: Experimentell ermittelte Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  für den Zerfall der Verbindung **57** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C.

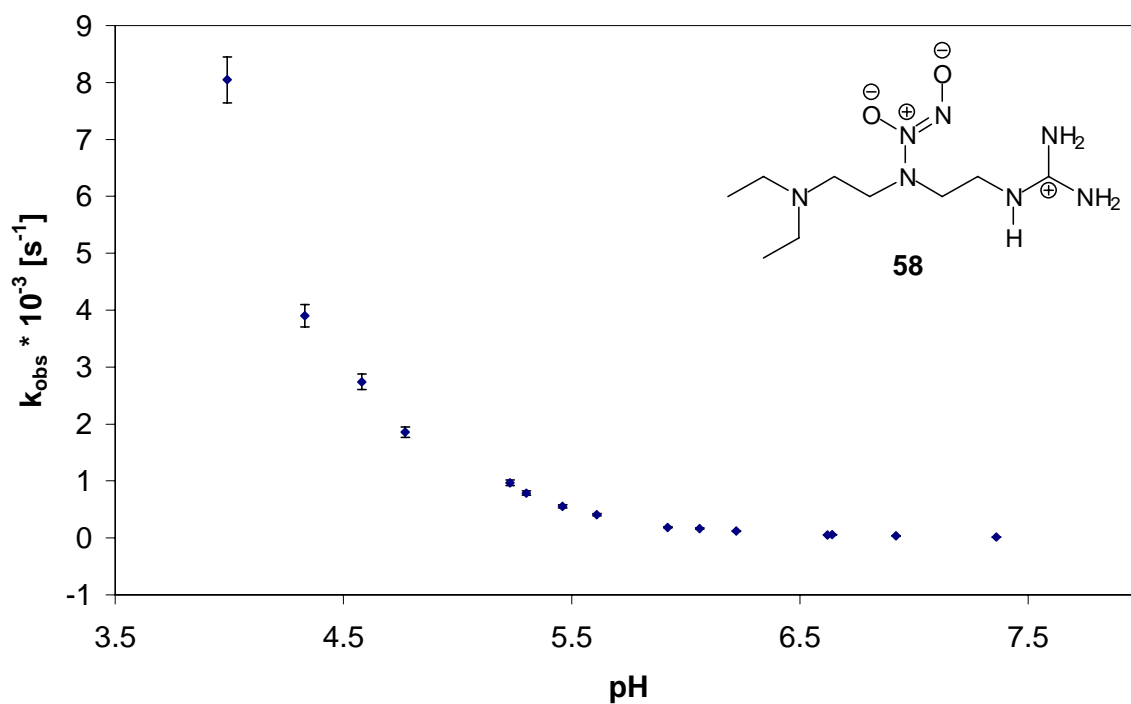
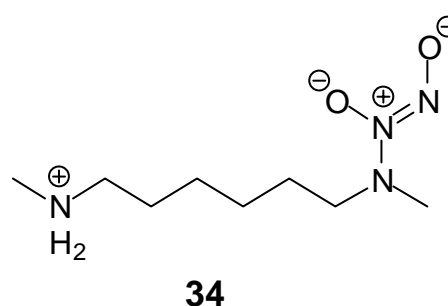
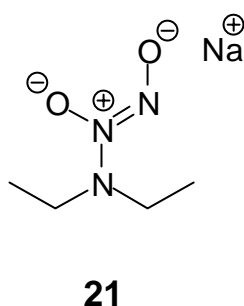


Abb. 78: Verlauf der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  für den Zerfall der Verbindung **58** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C.

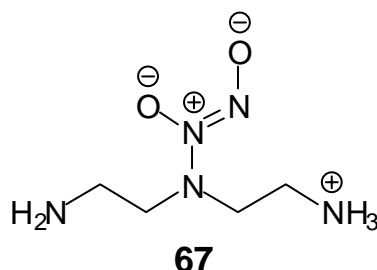
In der Literatur<sup>[77]</sup> wurde der Zerfall von unterschiedlichen literaturbekannteren NONOaten in Abhängigkeit vom pH-Wert ausführlich untersucht. Für die Verbindungen **21** und **34** wurde ein zweistufiger Mechanismus postuliert, bei dem der erste Schritt ein Protonierungs-Gleichgewicht des NONOats ist (Gl. 16). Der zweite Schritt besteht aus der Dissoziation der funktionellen Gruppe gefolgt von einem unimolekularen Zerfall, der zur NO-Freisetzung führt (Gl. 17).<sup>[77, 128]</sup> Für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante wurde ein von der Protonenkonzentration abhängiger Ausdruck formuliert (Gl. 18).



$$k_{obs} = k_{AH} [H^+] / ([H^+] + K_{AH}) \quad (18)$$

Der Zerfall von **21** in einem pH-Bereich von 5.2 – 8.0 und **34** im Bereich von 6.6 – 12.0 ergab in beiden Fällen einen linearen Zusammenhang zwischen dem Wert für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  und dem für die Protonenkonzentration der Pufferlösung über den gesamten pH-Bereich, der durch den Achsenschnittpunkt ging. Die Verwendung der linearisierten Form von Gl. 18 (d. h. durch Auftragung von  $1/k_{obs}$  gegen die Reziproke der Protonenkonzentration  $1/[H^+]$ ) lieferte schließlich die Gleichgewichtskonstante  $K_{AH}$ , bzw. den  $pK_{AH}$ -Wert und die Geschwindigkeitskonstante  $k_{AH}$  der beiden Verbindungen. Für

**21** wurde ein  $pK_{\text{AH}}$ -Wert von  $5.04 \pm 0.17$  und einen  $k_{\text{AH}}$ -Wert von  $(1.11 \pm 0.44) \text{ s}^{-1}$  erhalten, während für **34** ein  $pK_{\text{AH}}$ -Wert von  $5.88 \pm 0.35$  und ein  $k_{\text{AH}}$ -Wert von  $(0.518 \pm 0.392) \text{ s}^{-1}$  ermittelt wurden.



Die ungewöhnliche Stabilität von **67** unter physiologischen Bedingungen ( $t_{1/2} \sim 1200 \text{ min}$  in Phosphatpuffer pH 7.4 und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) erlaubte die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Zerfalls über einem breiten pH-Bereich (2.0 – 7.4) unter Verwendung von drei unterschiedlichen Pufferlösungen: eine Phosphat-, eine Acetat- und eine Glycin/HCl-Pufferlösung. Die gemessenen Daten zeigen, dass es zwei voneinander getrennte Zerfallswege gibt, die „säurekatalysiert“ sind. Der erste Zerfallsweg findet im pH-Bereich von 7.46 – 5.88 statt, während der zweite Weg im Bereich 5.04 – 2.04 durchlaufen wird. Beide Zerfallswege konnten durch Gl. 18 beschrieben werden, so dass aus der linearisierten Form dieser Gleichung die Werte  $k_{\text{AH1}} (2.75 \pm 1.51) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und  $pK_{\text{AH1}} 5.94 \pm 0.31$  für den ersten und  $k_{\text{AH2}} (3.33 \pm 3.10) \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  und  $pK_{\text{AH2}} 3.09 \pm 0.42$  für den zweiten Zerfallsweg ermittelt wurden.

In Analogie zu diesen Untersuchungen wurde nach einem mechanistischen Modell für den Zerfall in Pufferlösungen für die Guanidin NONOate **57** und **58** gesucht. Die erhaltenen Daten (Tab. 3 und Tab. 4) deuten stark darauf hin, dass der Zerfall von beiden Verbindungen bei  $37.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  nach dem durch die Gleichungen 16 und 17 postulierten Mechanismus abläuft.

Für Verbindung **57** zeigen die Auftragungen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  gegen die Protonenkonzentration  $[\text{H}^+]$  ( $y = 5.72 \cdot 10^{-4} x$ ,  $r^2 = 0.998$ , Abb. 79) und deren reziproken Werten gegeneinander, d. h.  $1/k_{\text{obs}}$  als Funktion von  $1/[\text{H}^+]$  ( $y = (1.48 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}x + (123.5 \pm 236.2)$ ,  $r^2 = 0.995$ , Abb. 80) im pH-Bereich 4.00 – 7.36 einen linearen Verlauf. Die lineare Regression der zweiten Auftragung liefert dann einen Wert von  $(8.10 \pm 5.10) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{\text{AH}}$  und  $4.92 \pm 0.50$  für den  $pK_{\text{AH}}$ -Wert der Verbindung.

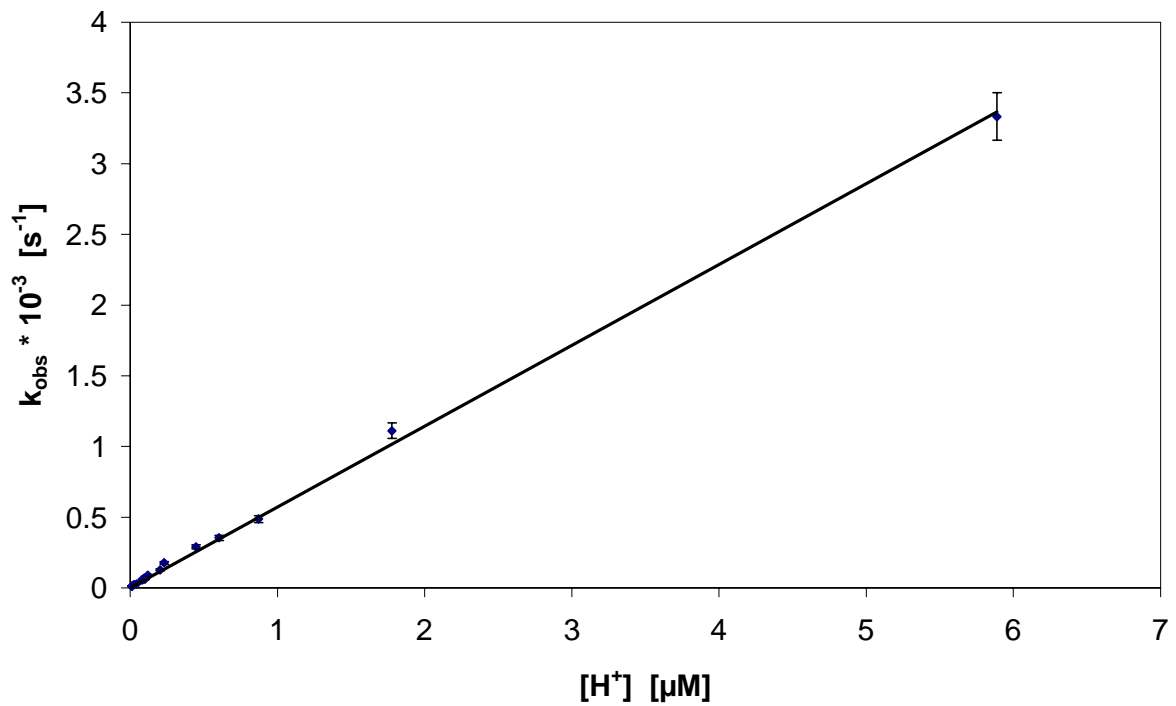


Abb. 79: Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls  $k_{\text{obs}}$  von **57** als Funktion der Protonenkonzentration  $[\text{H}^+]$  bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

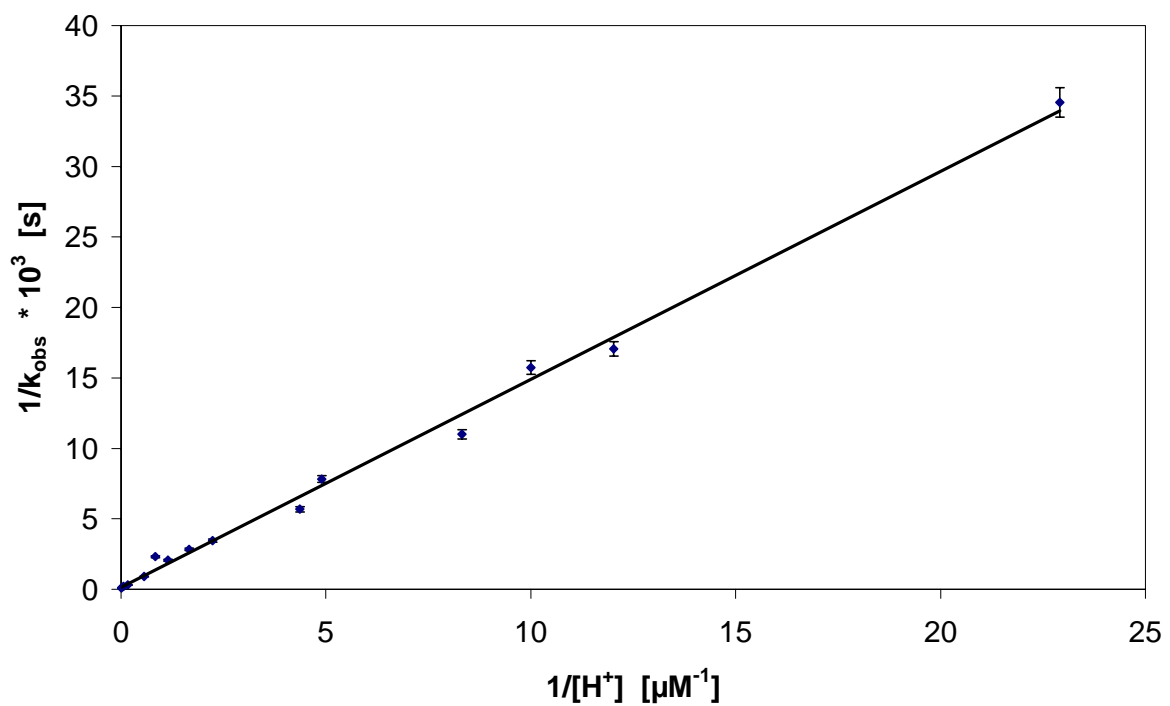


Abb. 80: Auftragung der Reziproken der Geschwindigkeitskonstante  $1/k_{\text{obs}}$  als Funktion des Reziproken der Protonenkonzentration  $1/[\text{H}^+]$  für den Zerfall von **57** bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Für Verbindung **58** ist ebenfalls bei den Auftragungen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  gegen die Protonenkonzentration  $[\text{H}^+]$  ( $y = 1.62 \cdot 10^{-4} x$ ,  $r^2 = 0.997$ , Abb. 81) und deren reziproken Werten gegeneinander, d. h.  $1/k_{\text{obs}}$  als Funktion von  $1/[\text{H}^+]$  ( $y = (4.18 \pm 0.11) \cdot 10^{-3}x + (459.7 \pm 214.0)$ ,  $r^2 = 0.996$ , Abb. 82) im pH-Bereich 4.00 – 6.64 einen linearen Verlauf zu erkennen. Die lineare Regression der zweiten Auftragung liefert dann einen Wert von  $(2.18 \pm 1.14) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{\text{AH}}$  und  $5.04 \pm 0.50$  für den  $\text{p}K_{\text{AH}}$ -Wert der Verbindung.

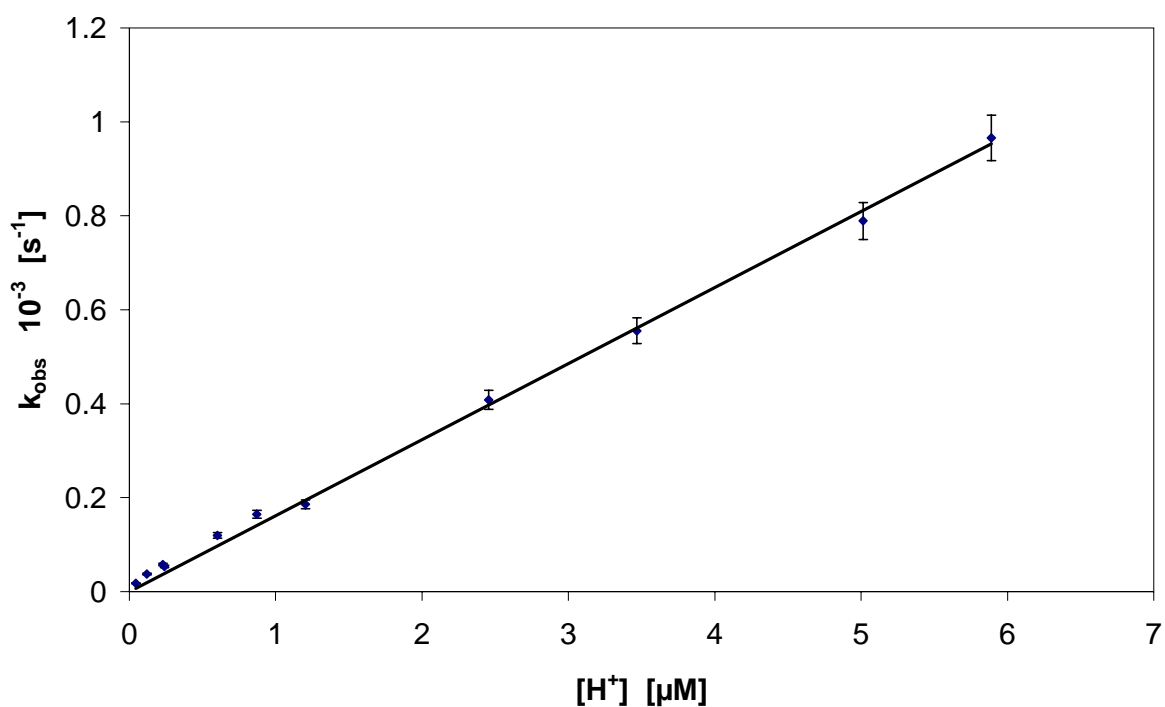


Abb. 81: gemessene Geschwindigkeitskonstante  $k$  für den Zerfall der Verbindung **58** als Funktion der Protonen-Konzentration  $[\text{H}^+]$  bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

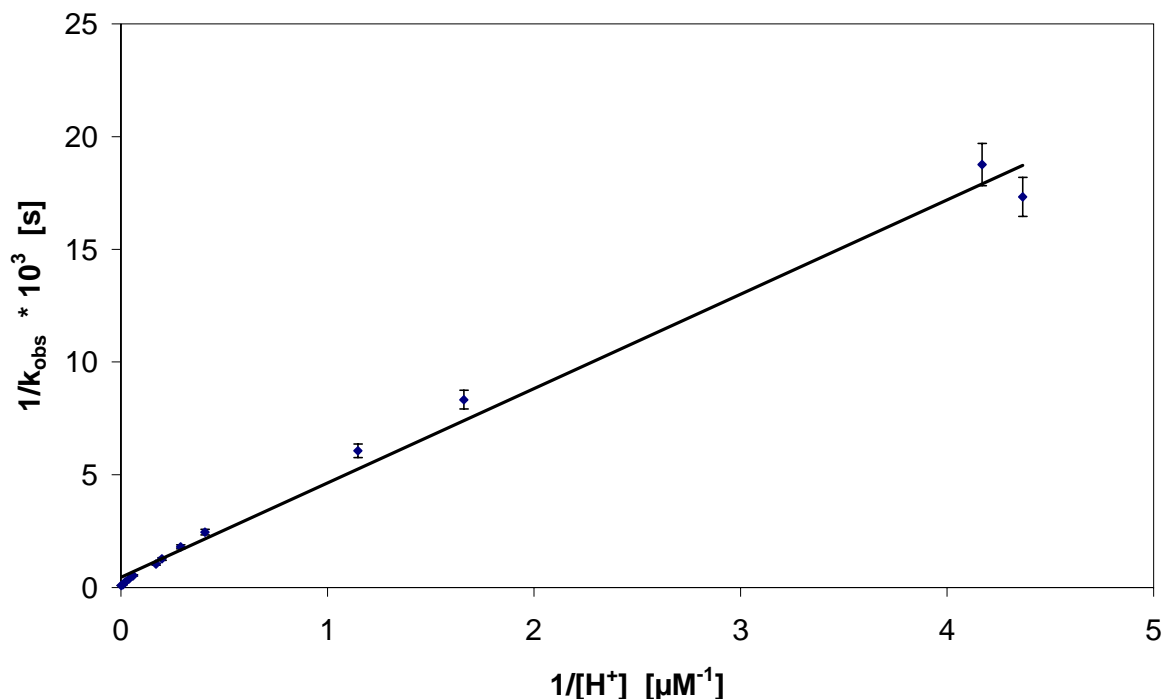


Abb. 82: Auftragung der Reziproken der Geschwindigkeitskonstanten  $1/k$  als Funktion des Reziproken der Protonen-Konzentration  $1/[H^+]$ , gemessen bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1$  °C.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass **57** und **58** in den untersuchten pH-Bereichen nach dem durch Gl. 16 – 18 beschriebenen Mechanismus zerfallen. Sowohl die gemessenen Daten, als auch die zuvor diskutierten linearen Zusammenhänge weisen auf einen zweistufigen Prozess, bei dem der erste Schritt ein Protonierungs-Gleichgewicht des NONOats ist und der zweite einen unimolekularen Zerfall unter Verlust des Chromophors darstellt. In der Literatur wird oft dieser Schritt in direktem Zusammenhang mit der NO-Freisetzung unter Rückbildung des Amins gebracht. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass der Verlust des Chromophors, der einzige Prozess ist, der mit Hilfe der UV-Spektroskopie beobachtet wird. Dieser Verlust ist aber kein Hinweis auf eine direkte NO-Freisetzung. Tatsache, die sich bei den Quantifizierungen der freigesetzten NO-Mengen widerspiegelt: nicht alle NONOate sind in der Lage NO quantitativ freizusetzen (Kap. 3.8 und 3.10).

Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht der Ergebnisse. Die in der Literatur vorhandenen Daten für die  $pK_{AH}$ -Werte von **21**, **34** und **67** betragen 5.0, 5.9 und 5.9 jeweils. Es soll noch gesagt werden, dass Untersuchungen bei pH-Werten < 3.99 nicht statt fanden, so dass der zweite von der Literatur vorgeschlagene Zerfallsweg für das langlebige **67** nicht auf die Guanidin-NONOaten übertragen werden konnte.

*Tab. 5: Zusammenfassung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{AH}$  und der scheinbaren Säurekonstanten  $pK_{AH}$  für den Zerfall von **57** und **58** in Abhängigkeit vom pH-Wert bei  $37.0 \pm 0.1$  °C*

Verbindung	$k_{AH}$ $10^{-3} [s^{-1}]$	$pK_{AH}$
<b>57</b>	$(8.10 \pm 5.10) \cdot 10^{-3}$	$4.92 \pm 0.30$
<b>58</b>	$(2.18 \pm 1.14) \cdot 10^{-3}$	$5.04 \pm 0.50$

Der Zerfall von NONOaten ist protonen-induziert und nicht protonen-katalysiert, wie fälschlicherweise in der Literatur gesagt wird. Je mehr Protonen vorhanden sind, d. h. je höher die Protonenkonzentration ist, desto schneller wird der Zerfall des NONOats. Die beobachtete Zerfallskonstante wird im Allgemeinen nach einer Kinetik erster Ordnung ausgewertet und liefert gute  $r^2$ -Werte. Wird der zweistufige Reaktionsmechanismus (Gl. 16 – 17) angenommen, so wird ersichtlich, dass der Zerfall einer erster Ordnung mit vorgelagertem Protonierungsgleichgewicht ist.

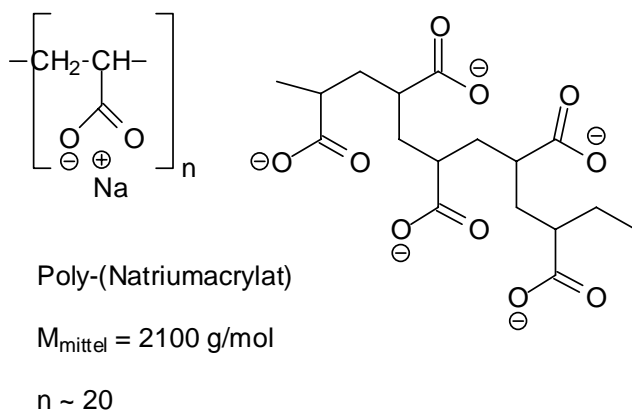
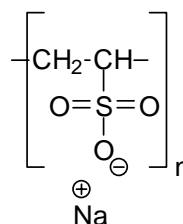
### 3.7.3 UV-Untersuchungen zum Zerfall von NONOaten in Anwesenheit von Ionenaustauschern.

Die Wechselwirkung von NONOaten in Anwesenheit von unterschiedlichen Ionenaustauscher-Konzentrationen wird in diesem Abschnitt diskutiert. Bei den verwendeten Ionenaustauschern handelt es sich um Poly-(natriumacrylat) (Abb. 83) mit einer mittleren Molmasse von 2100 g/mol und einer mittleren Carboxylat-Anzahl von  $\sim 20$  pro Austauscher-Einheit. Der zweite Ionenaustauscher ist die Poly(vinylsulfonsäure) als Natriumsalz. Dieser Austauscher liegt als technische 25proz. Lösung mit einer Reinheit von 95 % vor. Als Vergleich und in ähnlichen Konzentrationsbereichen wurde  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  verwendet.

Die Messungen wurden bei einer Temperatur von  $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$  und in einer Phosphatpufferlösung bei einem pH-Wert von  $7.36 \pm 0.03$  durchgeführt. Bei dem Zusatz von Ionenaustauscher wurde darauf geachtet, dass sich der pH-Wert der Messlösung sowohl vor als auch nach der Messung nicht geändert hatte. Es wurde unter anaeroben Bedingungen gearbeitet.

Für die Messungen wurden die Stammlösungen in dem Thermostat mind. 30 min temperiert. Unmittelbar vor der Messung wurde die entsprechende Menge an Pufferlösung entnommen. Die NONOat-Maßlösungen wurden in geschlossenen Gefäßen aufbewahrt.

Je nach gewünschter Konzentration an Ionenaustauscher-Lösung wurde die jeweilige Menge an Austauscher eingewogen und sofort mit entgaster Phosphatpufferlösung versetzt. Die Lösung wurde dann mindestens 30 – 45 min mit Argon gespült und der pH-Wert gemessen. Eine Änderung nach Zusatz des Ionenaustauschers war nicht feststellbar. Die Lösungen mit den höchsten Konzentrationen an Poly-(natriumacrylat)- und Poly-(natriumvinylsulfonat)-Austauscher sind nicht unendlich haltbar. Sie bilden nach 7 Tagen farblose Schlieren, die die Messungen erheblich stören können.

**70**

Poly-(natriumvinylsulfonat)

25% techn.

**71**

Abb. 83: Ionenaustauscher, die bei den Messungen des Zerfalls von **57**, **58** und **67** verwendet wurden.

### 3.7.3.1 Wechselwirkung von **57**, **58** und **67** mit dem Poly-(natriumacrylat)-Austauscher **70**

Es wurde die Wechselwirkung von diesem Austauscher mit den Verbindungen **57**, **58** und **67** untersucht. Bei allen drei Verbindungen wurde eine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls und dementsprechend, der daraus berechneten Halbwertszeiten (s. Exp. Teil) beobachtet. Untersuchungen dieser Art sind in der Literatur nicht vorhanden.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der bei 37 °C durchgeführten Messungen zusammengefasst. Die Werte entsprechen den maximalen Zunahmen der Geschwindigkeitskonstanten bzw. den max. Abnahmen der Halbwertszeiten. Hierbei

erkennt man dass bei Verbindung **57** die größte Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante bzw. maximale Abnahme der Halbwertszeit in Vergleich mit den Werten in Abwesenheit des Ionenaustauschers zu beobachten ist.

Die Halbwertszeit von **57** ändert sich um den Faktor 2.9 von einem Wert von 400 min auf 138 min. Bei den zwei anderen Verbindungen ist dieser Effekt nicht so ausgeprägt. Dennoch erniedrigt sich die Halbwertszeit des **58** um Faktor 1.6 von 650 auf 412 min. Bei dem **67** stellt man eine Abnahme der Halbwertszeit um den Faktor 2.2 von 1180 auf 525 min.

Nach diesen Auswertungen kann kein direkter Zusammenhang zwischen Austauscher-Konzentration und Änderung des  $k$ -Wertes für den Zerfall der drei untersuchten Verbindungen festgestellt werden.

*Tab. 6: Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Zerfalles von **57**, **58** und **67** in Phosphatpufferlösung (pH 7.36), bei 37 °C, in Abwesenheit von Ionenaustauscher und bei der Austauscher-Konzentration, die eine maximale Änderung der Geschwindigkeitskonstante bewirkt.*

Verbindung	[Austauscher] [mM]	$k_{\max}$ $10^{-5} [\text{s}^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]	Faktor
<b>57</b>	0	$2.89 \pm 0.01$	$399.5 \pm 0.7$	
	11.52	$8.39 \pm 0.01$	$137.8 \pm 0.1$	2.9
<b>58</b>	0	$1.77 \pm 0.01$	$651.1 \pm 2.1$	
	11.52	$2.80 \pm 0.02$	$412.5 \pm 4.9$	1.6
<b>67</b>	0	$0.978 \pm 0.022$	$1182 \pm 26$	
	11.52	$2.20 \pm 0.03$	$525 \pm 7$	2.2

In Kap. 3.7.2 wurde die pH-Abhängigkeit des Zerfalles in Pufferlösungen der Verbindungen **57** und **58** untersucht. Für Verbindung **67** wurden die in der Literatur<sup>[77]</sup> vorhandenen Daten verwendet. Wird der  $\log k$ - gegen den pH-Wert aufgetragen, so ist in allen drei Fällen eine Linearität zu erkennen. Im Fall von **57** ergibt die lineare Regression eine Gleichung der Form  $y = mx + b$  bzw.  $\log k = -0.901 \text{ pH} + 2.1753$  mit einem  $r^2$ -Wert von 0.994.

Diese Funktion kann dazu verwendet werden, den experimentell ermittelten Werten für die Geschwindigkeitskonstanten in Anwesenheit von verschiedenen Austauscherkonzentrationen einen scheinbaren pH-Wert zu zuordnen. Bei steigender Austauscher-Konzentration wird der pH-Wert immer kleiner (Abb. 84) bis ein Grenzwert erreicht wird. Im Fall von **57** beträgt dieser Grenz-pH-Wert 6.94.

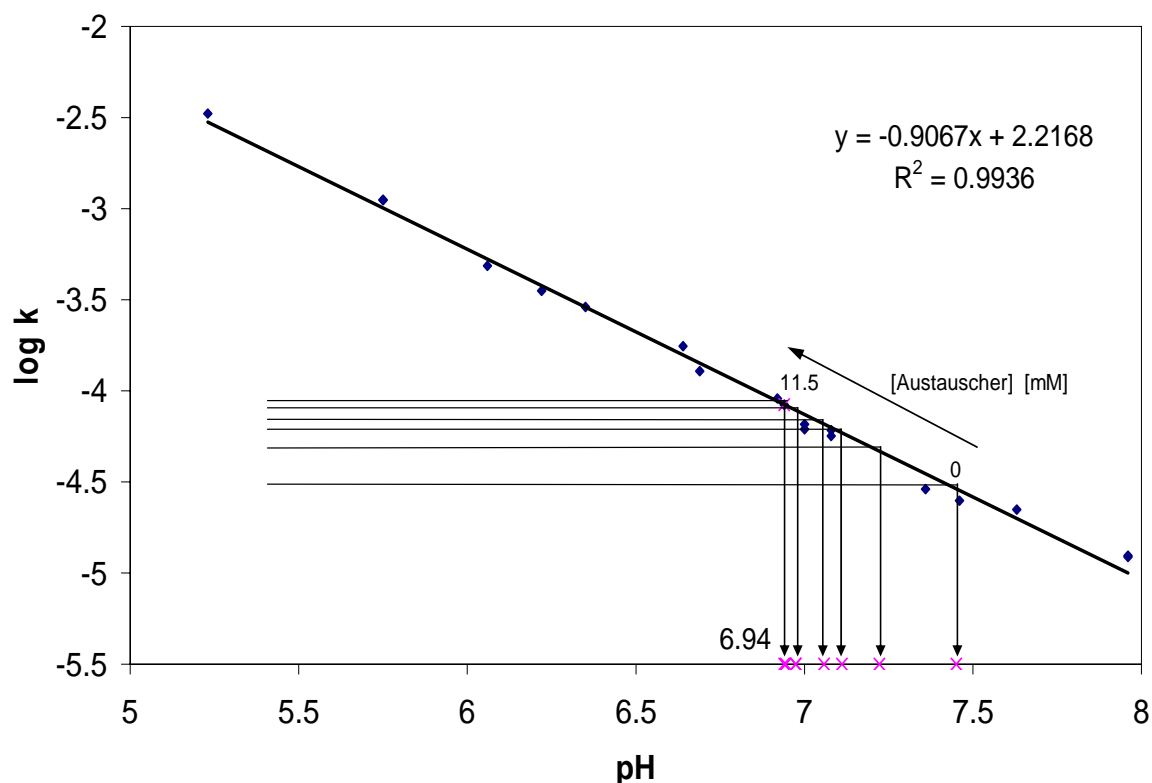


Abb. 84: Auftragung von  $\log k$  in Abhängigkeit vom pH-Wert für Verbindung **57** (Daten aus Kap. 3.7.2). Die durchgezogenen Linien stellen die gefundenen  $k$ -Werte für den Zerfall von **57** (pH 7.36 und 37 °C) bei unterschiedlichen Austauscherkonzentrationen dar. Diesen Werten kann ein pH-Wert zugeordnet werden. Der gefundene Grenz-pH-Wert beträgt 6.94.

Die Auftragung von  $\log k$  als Funktion des pH-Wertes (Daten aus Kap. 3.7.2) und anschließende lineare Regression für Verbindung **58** ergeben eine Gleichung der Form  $\log k = -0.8062 \text{ pH} + 1.1036$  mit  $r^2 = 0.993$ . Mit Hilfe dieser Gleichung können den gefundenen Werten für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  in Anwesenheit von unterschiedlichen Austauscherkonzentrationen pH-Werte zugeordnet werden. Bei steigender Austauscher-Konzentration werden die pH-Werte immer kleiner bis ein Grenzwert erreicht wird. Im Fall von **58** wird ein Grenz-pH-Wert von 7.01 gefunden.

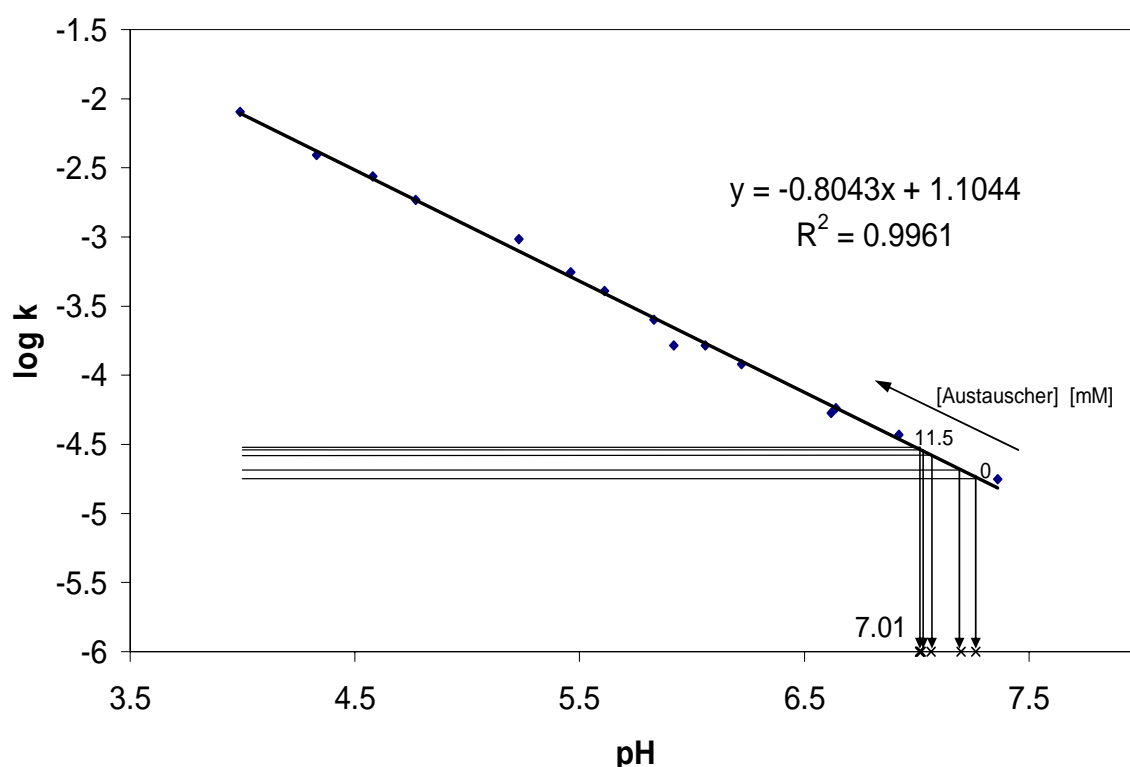


Abb. 85: Auftragung von  $\log k$  in Abhängigkeit vom pH-Wert für Verbindung **58** (Daten aus Kap. 3.7.2). Die durchgezogenen Linien stellen die gefundenen  $k$ -Werte für den Zerfall von **58** (pH 7.36 und 37 °C) bei unterschiedlichen Austauscherkonzentrationen dar. Diesen Werten kann ein pH-Wert zugeordnet werden. Der gefundene Grenz-pH-Wert beträgt 7.01.

Für Verbindung **67** wird in analoger Weise verfahren. Lineare Regression der Auftragung von  $\log k$  gegen den pH-Wert ergibt folgende Gleichung:  $\log k =$

$-0.7606 \text{ pH} + 0.6575$  mit  $r^2 = 0.997$ . Der Grenz-pH-Wert für diese Verbindung beträgt 6.99.

In Tab. 7 sind die Werte für die jeweiligen Grenz-pH-Werte zusammengefasst. Diese bewegen sich im Bereich 6.94 – 7.01 ( $6.97 \pm 0.04$ ). Untersuchungen mit *N*-Diazeniumdiolaten in Anwesenheit von Ionenaustauschern sind in der Literatur nicht vorhanden. Dennoch kann durch diese Messungen der saure Charakter der Ionenaustauscher-Umgebung bestätigt werden. Es ist nicht von der Hand zu weisen, dass NONOate als pH-Sonden eingesetzt werden könnten.

Tab. 7: Werte für die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der drei untersuchten Verbindungen bei maximaler Austauscher-Konzentration und ihre scheinbare pH-Wert-Zuordnung.

Verbindung	$k_{\max}$ $10^{-5} [\text{s}^{-1}]$	Grenz-pH-Wert
<b>57</b>	$8.39 \pm 0.01$	$6.94 \pm 0.02$
<b>58</b>	$2.80 \pm 0.02$	$7.01 \pm 0.02$
<b>67</b>	$2.20 \pm 0.03$	$6.99 \pm 0.01$

### 3.7.3.2 Wechselwirkung von **57**, **58** und **67** mit dem Poly-(natriumvinylsulfonat)-Austauscher **71**

Die NONOate **57**, **58** und **67** wurden in ihrer Wechselwirkung mit dem Poly(natriumvinylsulfonat)-Austauscher unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) untersucht. Die Messungen erfolgten analog zu den vorangegangenen Experimenten. Die maximale Austauscher-Konzentration, ist diejenige bei der noch keine Änderung des pH-Wertes der 0.1 M Phosphatpuffer-Lösung zu beobachten ist. Es wurde dieser Grenz-Wert ausgesucht, in dem man die Austauscher-Konzentration bestimmte, bei der der die Puffer-Kapazität gesprengt wurde. Die hier als „maximale“ Austauscher-Konzentration beträgt 80 % dieses Grenz-Wertes

In der Tab. 8 sind die Werte für die maximale Änderung der Geschwindigkeitskonstanten bzw. der daraus resultierenden Halbwertszeiten aufgelistet. Die Änderung ist in diesem Fall auch nicht höher als Faktor 1.84 für den Fall der Verbindung **57**. Eine direkte Korrelation zwischen den Mengen an NONOat und Ionenaustauscher ist nicht feststellbar.

Die Änderungen der Werte für die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der gemessenen NONOate sind kleiner als im Fall des ersten Austauschers. Verbindung **57** zeigt wieder die größte Änderung des  $k$ -Wertes im Vergleich zu den Messungen ohne Austauscher-Zusatz. Die Geschwindigkeitskonstante erhöht sich um Faktor 1.8 von 2.89 auf  $5.32 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Umgerechnet auf die Halbwertszeiten bedeutet dies, eine Erniedrigung dieses Wertes von 400 auf 218 min. Bei der Verbindung **58** wird ebenfalls eine Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten bzw. eine Erniedrigung der Halbwertszeit um den Faktor 1.2 von 650 auf 532 min festgestellt. Die kleinste Änderung ist bei Verbindung **67** vorhanden. Umgerechnet auf die Halbwertszeiten wird eine Erniedrigung um den Faktor 1.2 von 1180 auf 990 min beobachtet.

Tab. 8: Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Zerfalles von **57**, **58** und **67** in Phosphatpufferlösung (pH 7.36), bei 37 °C, in Abwesenheit von Ionenaustauscher und bei der Austauscher-Konzentration, die eine maximale Änderung der Geschwindigkeitskonstante bewirkt.

Verbindung	[Austauscher] [mM]	$k_{\max}$ $10^{-5} [s^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]	Faktor
<b>57</b>	0	$2.890 \pm 0.005$	$399.5 \pm 0.7$	
	32.7	$5.32 \pm 0.26$	$217.6 \pm 10.5$	1.84
<b>58</b>	0	$1.770 \pm 0.006$	$651.1 \pm 2.1$	
	32.7	$2.18 \pm 0.01$	$532.0 \pm 2.3$	1.22
<b>67</b>	0	$0.978 \pm 0.022$	$1182 \pm 26$	
	32.7	$1.170 \pm 0.004$	$990 \pm 4$	1.19

Diese Werte können in Analogie zu den zuvor diskutierten Messungen ebenfalls dazu dienen, den scheinbaren Grenz-pH-Wert zu bestimmen. Dazu werden wieder die Auftragungen von  $\log k$  als Funktion des pH-Wertes verwendet. Die Zuordnungen ergeben die Werte 7.16, 7.15 und 7.34 für **57**, **58** und **67** jeweils. Auffällig ist starke Abweichung, die man für das DETANO **67** findet. Für die beiden Guanidin-NONOate **57** und **58** sind die zugeordneten pH-Werte fast identisch. Dieser Befund und die Tatsache, dass NONOate sehr empfindlich und konstant gegenüber pH-Änderungen reagieren, könnten zu der Hypothese führen, dass der scheinbare Grenz-pH-Wert eine Zusammensetzung aus mehreren pH-Bereichen in der Lösung darstellen könnte. Zum einen der pH-Wert im Bulk und zum anderen der lokale pH-Wert auf der Oberfläche der Polymere.

*Tab. 9: Werte für die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der drei untersuchten Verbindungen bei maximaler Austauscher-Konzentration und ihre scheinbare pH-Wert-Zuordnung.*

Verbindung	$k_{\max}$ $10^{-5} [\text{s}^{-1}]$	Grenz-pH-Wert
<b>57</b>	$5.32 \pm 0.26$	$7.16 \pm 0.02$
<b>58</b>	$2.18 \pm 0.02$	$7.15 \pm 0.02$
<b>67</b>	$1.17 \pm 0.03$	$7.34 \pm 0.03$

### 3.7.3.3 Wechselwirkung von 57 und 58 mit Natriumsulfat

Der Einfluss von Natriumsulfat auf den Zerfall von **57** und **58** wurde ebenfalls untersucht. Ziel dieser Experimente war es, mögliche ionische Effekte auszuschließen. In der Tab. 10 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Dort erkennt man die Werte für die Geschwindigkeitskonstante bei maximaler Natriumsulfatkonzentration. Wie auch bei den anderen Untersuchungen, wurde hier darauf geachtet, dass sich der pH-Wert der Pufferlösung sowohl vor, als auch nach der Messung nicht änderte. Der Einfluss auf Verbindung **67** wurde nicht untersucht.

Tab. 10: Werte für die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der untersuchten Verbindungen **57** und **58** bei maximaler Natriumsulfat-Konzentration und ihre scheinbare pH-Wert-Zuordnung. Die Messungen erfolgten unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C).

Verbindung	[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [mM]	$k_{\max}$ 10 <sup>-5</sup> [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
<b>57</b>	0	2.890 ± 0.005	399.5 ± 0.7
	16.4	3.19 ± 0.09	362 ± 10
<b>58</b>	0	1.770 ± 0.006	651.1 ± 2.1
	16.4	1.82 ± 0.01	635.7 ± 5.0

### 3.8 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Nicht alle NONOate setzen gemäß ihrer Stöchiometrie 2 Mol NO pro Mol NONOat frei. Verbindungen **64**, **57** und **58** sollten auf die freigesetzte Menge Stickstoffmonoxid untersucht werden. Als Methode wurde die FNOCT-Methode (*Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap*) (Abb. 86) eingesetzt. Grundlage dieser Methode ist eine formale cheletrope Reaktion<sup>[129-133]</sup> von FNOCT mit Stickstoffmonoxid zu einem im ESR nachweisbaren Nitroxid-Radikal, wobei sich das fluoreszenzfähige  $\pi$ -System des Phenanthren-Grundgerüsts ausbildet. Eine sinnvolle Messung der Fluoreszenz des Phenanthren-Chromophors ist erst dann möglich, wenn das fluoreszenzlöschende Nitroxid-Radikal durch Reduktion in das entsprechende Hydroxylamin-Derivat überführt wird. Als Reduktionsmittel wird Ascorbinsäure oder Glutathion eingesetzt, da sie auch in zellulären Systemen vielseitig wirksam sind. Das Phenanthren-Gerüst kann mit einer hohen Empfindlichkeit fluoreszenz-spektroskopisch nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass ein direkter Nachweis von Stickstoffmonoxid mit Hilfe von Fluoreszenzreagenzien durch die direkte Bildung eines Fluorophors möglich ist.

Bisher vorhandene Fluoreszenzmethoden erfordern zuerst die Umwandlung von Stickstoffmonoxid in andere reaktivere Spezies wie  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}_2$  oder  $\text{N}_2\text{O}_3$ , wobei das Problem der Spezifität entsteht, da nicht bekannt ist, aus welcher der Verbindungen die detektierte Spezies gebildet wurde.

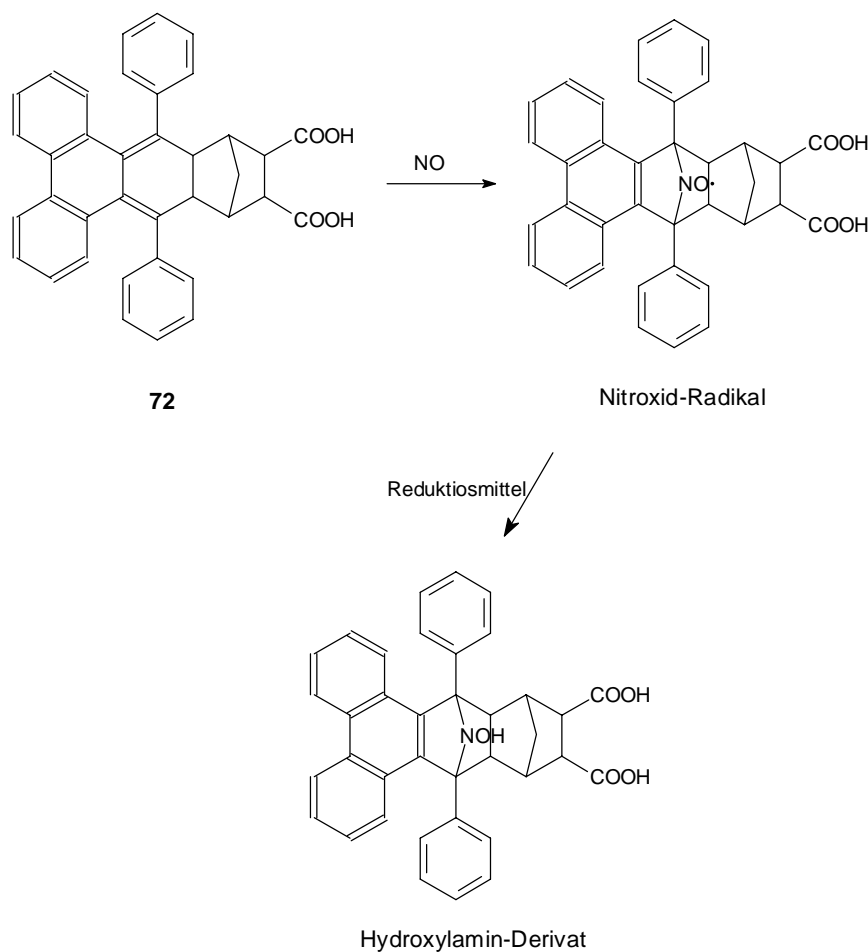


Abb. 86: Prinzip des Stickstoffmonoxid-Abfangs mit dem Fänger **72**.<sup>[131-133]</sup>

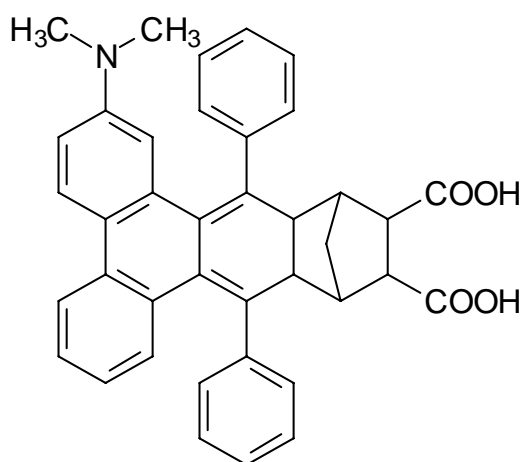
Für die Bestimmung der freigesetzten NO-Menge wurden zwei in diesem Arbeitskreis entwickelten FNOCT's **72** und **73** verwendet. Verbindung **72** (Abb. 86) wurde hauptsächlich während der Diplomarbeit verwendet. Dabei gelang die praktische Anwendung der Methode zur quantitativen Bestimmung der freigesetzten NO-Menge während des Zerfalls von Verbindung **64** in Phosphatpufferlösung (pH 7.4) und bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse dieser Messungen reproduziert und gesichert werden.

Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) von 315 nm und bei einer Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\text{em}}$ ) von 380 nm verfolgt. Da der verwendete FNOCT **72** bereits Fluoreszenz des Phthalocyanin-Rückgrates zeigte, was auf eine teilweise Zersetzung des Fängers unter

Ausbildung des Phenanthren-Chromophors hindeutete, musste die Abfangreaktion geeicht werden. Die Eichung erfolgte mit Hilfe von wässrigen Lösungen bekannten Stickstoffmonoxid-Gehaltes. Eine Quantifizierung der entstandenen Stickstoffmonoxid-Menge während des Zerfalls von **64** in Phosphatpuffer (pH 7.4) und bei einer Temperatur von  $22 \pm 2.0$  °C war nach dieser Kalibrierung möglich. Folgende Bedingungen wurden zusätzlich eingehalten: der Fänger soll stets im zehnfachen Überschuss zum Stickstoffmonoxid-Donor vorhanden sein, um quantitativ Stickstoffmonoxid abzufangen, die Fänger Lösungen sollen möglichst frisch und sauerstofffrei hergestellt sein, um den thermischen Zerfall des Fängers zu kontrollieren und als Reduktionsmittel dient eine Ascorbinsäure-Lösung.

Die Wiederholung der Messungen ergab einen Wert von  $1.55 \pm 0.05$  Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat **64** für die während des Zerfalls freigesetzte Stickstoffmonoxid-Menge.

Die Eichung mit der Stickstoffmonoxid-Lösung muss immer am gleichen Tag der Messung durchgeführt werden. Dies, weil die Haltbarkeit der FNOCT-Stammlösungen in DMSO über mehrere Stunden hinaus gewährleistet ist. Die FNOCT-Aliquoten werden kurz vor der Messung aufgetaut und nach der Entnahme wieder eingefroren. Die gesättigten wässrigen NO-Lösungen sind unter geeigneten Bedingungen in einem dicht verschlossenem Gefäß mit Bodenfritte in Abwesenheit von Sauerstoff lange haltbar (mehrere Tage). Es wird jedoch empfohlen, vor der Messung frisches NO in das Gefäß einzuleiten.



Der Fänger **73** wurde zur Quantifizierung der entstandenen Stickstoffmonoxid-Menge während des Zerfalls der Verbindungen **57** und **58** in gepufferten Lösungen bei einer Temperatur von 37 °C verwendet. Die Nachweisgrenze für das System **73** liegt in Phosphatpuffer-Lösung mit einem pH-Wert von 7.2 bei 2.5 nM.<sup>[134, 135]</sup> Bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von 37 °C betragen die mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie gemessenen Halbwertszeiten des Zerfalls von **57** und **58** 400 und 670 min jeweils. Der Zerfall dieser Verbindungen in gepufferten wässrigen Systemen ist pH-abhängig und wird schneller mit abnehmendem pH-Wert. Für die Untersuchungen mit dem Fänger **73** wurden die pH-Werte von 6.22 für **57** und 5.92 für **58** gewählt. Bei den Messungen wurde die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) von 321 nm und bei einer Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\text{em}}$ ) von 451 nm verfolgt. Die Ergebnisse waren unter diesen Bedingungen reproduzierbar und außerdem konnte so die Dauer der Messungen verkürzt werden.

Die für diese Messungen angewandte Methode wird im Experimentellen Teil ausführlich beschrieben. Die Konzentrationen an Fänger und Reduktionsmittel Glutathion waren stets konstant (50  $\mu\text{M}$ ). Als Lösungsvermittler wurde 10 % Pluronic F-127<sup>[134-136]</sup> verwendet.

Abb. 87 zeigt beispielhaft den Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bei unterschiedlichen Konzentrationen an NONOat **57** in Phosphatpuffer-Lösung bei einem pH-Wert von 6.22 und einer Temperatur von 37.0 °C. Bei Werten von 50 und 75  $\mu\text{M}$  NONOat wurde die maximale Fluoreszenzintensität erreicht. Sollten das NONOat **57** in der Lage sein, Stickstoffmonoxid quantitativ freizusetzen, so sollte bei einer NONOat-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{M}$  Stickstoffmonoxid gemäß der Stöchiometrie) ebenfalls die maximale Fluoreszenz erreicht werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer 25  $\mu\text{M}$  Konzentration an **57** praktisch die gleiche maximale Fluoreszenzintensität wie beim Zerfall von 50 und 75  $\mu\text{M}$ -Lösungen erreicht wurde, was auf eine quantitative Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus **57** zurück schließen lässt. Um diesen Befund zu sichern, wurden weitere NONOat-Konzentrationen (z. B. 20, 15 und 12.5  $\mu\text{M}$  **57**) gemessen, dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen den NONOat-Konzentrationen und den maximalen Fluoreszenzintensitäten gefunden. Aus dieser Korrelation ließ sich dann der Wert für die freigesetzte NO-Menge er-

mitteln. **57** ist demnach in der Lage  $2.00 \pm 0.05$  Mol NO pro Mol NONOat freizusetzen.

Verbindung **58** wurde bis auf den pH-Wert unter gleichen Bedingungen wie **57** gemessen. Der pH-Wert lag bei 5.92 und die Auswertung der Messungen (s. Exp. Teil) zeigte, dass **58** ebenfalls in der Lage ist, NO quantitativ freizusetzen. Der ermittelte Wert beträgt  $2.00 \pm 0.07$  Mol NO pro Mol **58**.

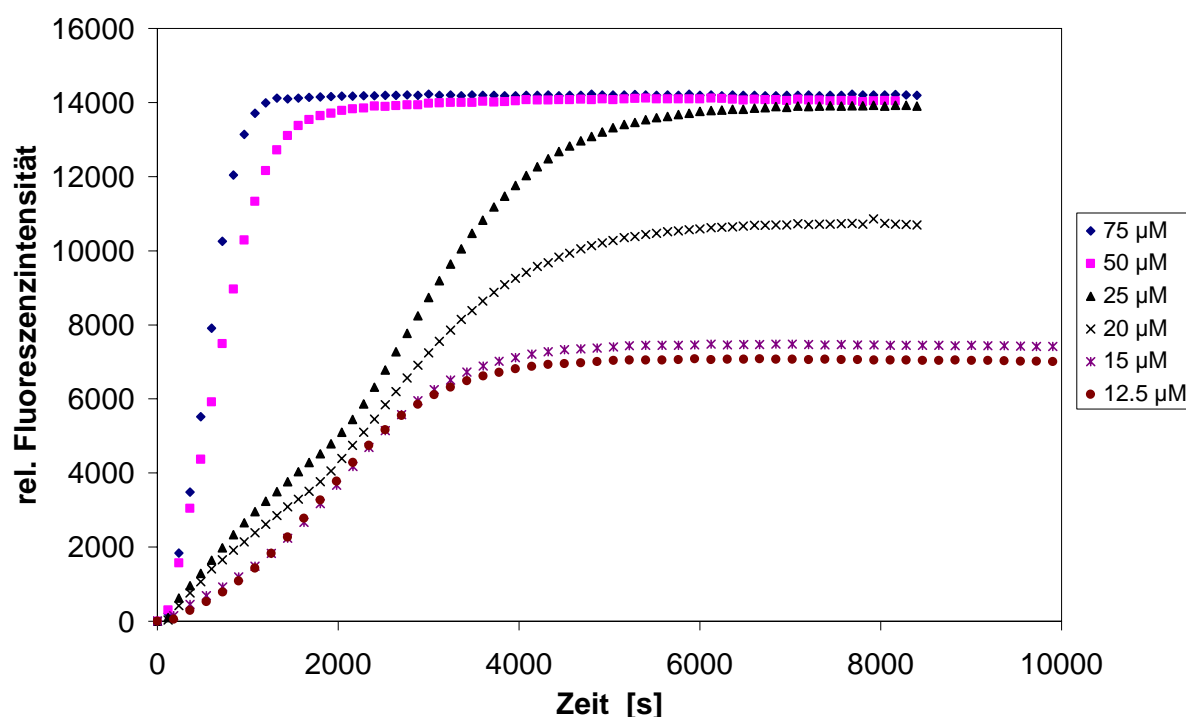


Abb. 87: Untersuchung des Zerfalls von **57** in Anwesenheit von  $50 \mu\text{M}$  **73** bei  $37^\circ\text{C}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$ ) in sauerstofffreier Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von  $50 \mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an **57** verwendet:  $\blacklozenge$   $75 \mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$   $50 \mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$   $25 \mu\text{M}$ ,  $\times$   $20 \mu\text{M}$ ,  $\ast$   $15 \mu\text{M}$  und  $\bullet$   $12.5 \mu\text{M}$ .

### Zusammenfassung

In Tab. 11 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst. Während Verbindung **64**  $1.55 \pm 0.55$  Mol NO pro Mol NONOat freisetzte, setzten die NONOate **57** und **58** NO quantitativ frei. Der Vorteil dieser Methode sei nochmal

betont, da es sich hier um eine direkte Nachweismethode für Stickstoffmonoxid *in situ* handelt. Die in diesem Arbeitskreis synthetisierten Fluoreszenzfänger **72** und **73** sind dazu geeignet Stickstoffmonoxid quantitativ zu erfassen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für Verbindung **73** ist aber erst unter streng anaeroben Bedingungen garantiert.

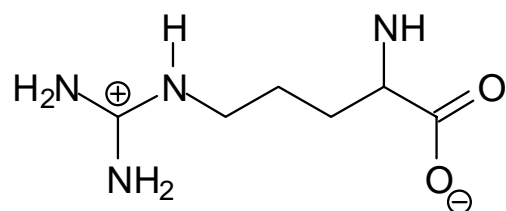
*Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse. Verbindung 64 wurde mit dem Fänger 72 in einer Phosphatpufferlösung (pH 7.4) und bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C ( $\lambda_{exc} = 315$  nm,  $\lambda_{em} = 380$  nm) unter Zusatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel. Verbindungen 57 und 58 wurden mit dem Fänger 73 in sauerstofffreien Phosphatpufferlösungen (pH 6.22 für 57 und 5.92 für 58) und bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.2$  °C unter Zusatz von Glutathion als Reduktionsmittel und Pluronic F-127 als Lösungsvermittler.*

Verbindung	Verwendeter Fänger	$n_{NO}/\text{Mol NONOat}$ [Mol]
<b>64</b>	<b>72</b>	$1.55 \pm 0.05$
<b>57</b>	<b>73</b>	$2.00 \pm 0.05$
<b>58</b>	<b>73</b>	$2.00 \pm 0.07$

### 3.9 NMR-Spektroskopische Untersuchungen von NONOaten

Guanidiniumsalze und *N*-Diazeniumdiolate wurden mit Hilfe ihrer natürlichen  $^{15}\text{N}$ -Isotopenhäufigkeit NMR-spektroskopisch untersucht. Die  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektroskopie stellte sich als ein wichtiges Werkzeug für den Nachweis von Diazeniumdiolat-Verbindungen heraus. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten neuen Guanidin-NONOate besitzen zum einen eine Diazeniumdiolat- und zum anderen die Guanidiniumfunktion. Beide Gruppen werden erst getrennt von einander behandelt.

In der Literatur<sup>[101-104]</sup> sind umfangreiche  $^{15}\text{N}$ -Daten für die Guanidin-Gruppe vorhanden. Die Verbindung *L*-Arginin als eine lebenswichtige Aminosäure, die die Guanidin-Gruppe trägt, wurde ausführlich in Abhängigkeit des pH-Wertes (Abb. 88) untersucht. Die gefundenen chemischen Verschiebungen für den Guanidin-Rest mit Nitromethan  $\text{CH}_3^{15}\text{NO}_2$ <sup>[137]</sup> als Standard liegen im Bereich von -291 bis -296 ppm für die NH-Gruppe des Guanidins, bei -291 bis -310 ppm für die anderen Guanidin-*N*-Atome und bei -340 bis -348 ppm für die  $\text{NH}_2$ -Gruppe in  $\alpha$ -Stellung. Es wurde in einem pH-Bereich von 1 - 14 gemessen. Für die Zuordnung der Signale benutzte man in der Literatur vorhandene Daten und Guanidiniumcarbonat als Vergleich. Lage und Art der Verschiebung wurden ausführlich diskutiert. Die Guanidin-Gruppe ist die stärkste organische basische Gruppe, unter physiologischen Bedingungen liegt sie protoniert vor.



*L*-Arginin

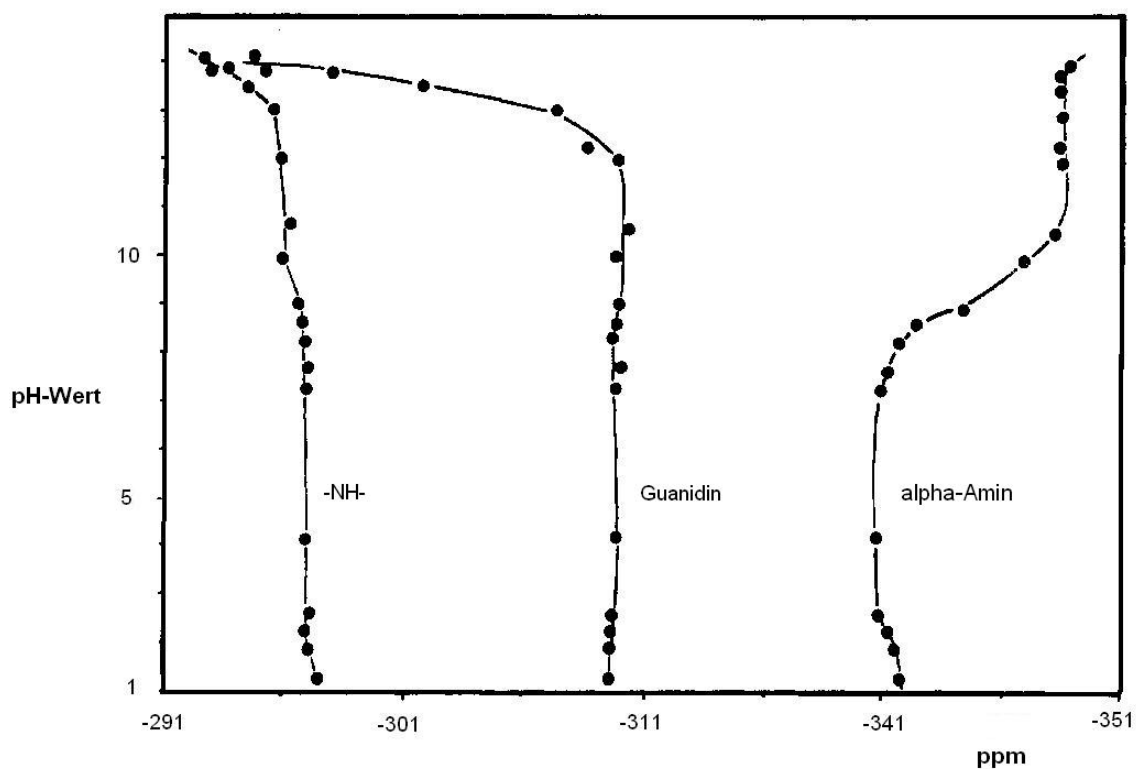
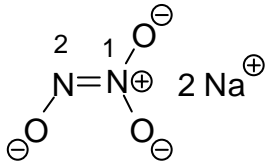
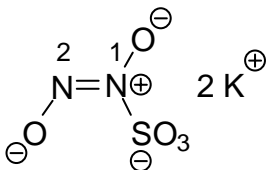
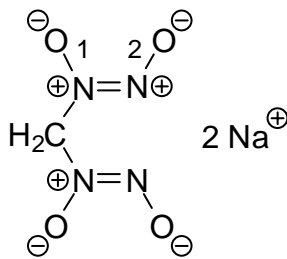
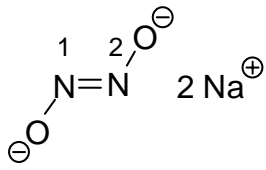
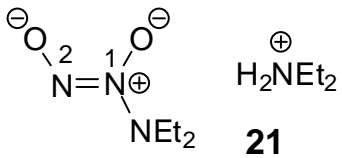


Abb. 88: pH-Abhängigkeit<sup>[101]</sup> der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Verschiebungen von L-Arginin bei 25 °C mit Nitromethan  $\text{CH}_3^{15}\text{NO}_2$  als Standard.

Untersuchungen dieser Art für *N*-Diazeniumdiolate und verwandte Verbindungen sind in der Literatur<sup>[120-122]</sup> rar. Bis jetzt gibt es wenige Berichte über solche Verbindungen. SCHULTHEISS und FLUCK<sup>[120]</sup> beschrieben und diskutierten eine Reihe von Diazeniumdiolaten, die Ergebnisse einiger dieser Messungen sind in der Tab. 12 zusammengefasst. Auch ein Vertreter der *N*-Diazeniumdiolate (**21**) wurde dort erwähnt. Die Messung dieser Verbindung erfolgte jedoch in  $\text{CDCl}_3$  und nicht in  $\text{D}_2\text{O}$ , Lösungsmittel, in dem die meisten NONOate löslich sind.

Tab. 12: In der Literatur<sup>[120-122]</sup> vorhandene Daten für <sup>15</sup>N-NMR-Verschiebungen von Diazeniumdiolaten und verwandten Verbindungen.

Verbindung	chem. Verschiebung [ppm]		Lsgm.	Literatur
	N-1	N-2		
$\begin{array}{c} 1 \quad 2 \\ \text{N}=\text{N}=\text{O} \end{array}$	-225.0	-140.0		[122]
	-27.9	-43.4	D <sub>2</sub> O	[120]
	-46.9	58.1	D <sub>2</sub> O	[120]
	-82.4	62.6	D <sub>2</sub> O	[120]
	54.9	54.9	1 M NaOH	[121]
	-137.9	27.6	CDCl <sub>3</sub> / -10 °C	[120]

Für die Messungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden zwei Lösungen eingesetzt: entweder D<sub>2</sub>O im Falle der Amine und Guanidiniumsalze oder in 2 – 4 M NaOD/D<sub>2</sub>O-Lösung im Falle der NONOate. Auf Grund der geringen Isotopenkonzentration sind möglichst hohe Konzentrationen ( $\geq 100$  mg/mL) an den jeweiligen Substanzen notwendig.

In Abb. 89 sind die Werte für einige der eingesetzten Amine zu beobachten. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe von entkoppelten Spektren und von in den Literatur<sup>[104, 138, 139]</sup> vorhandenen Daten. Diese Werte wurden später für die Zuordnung der Signale der jeweiligen synthetisierten NONOate verwendet.

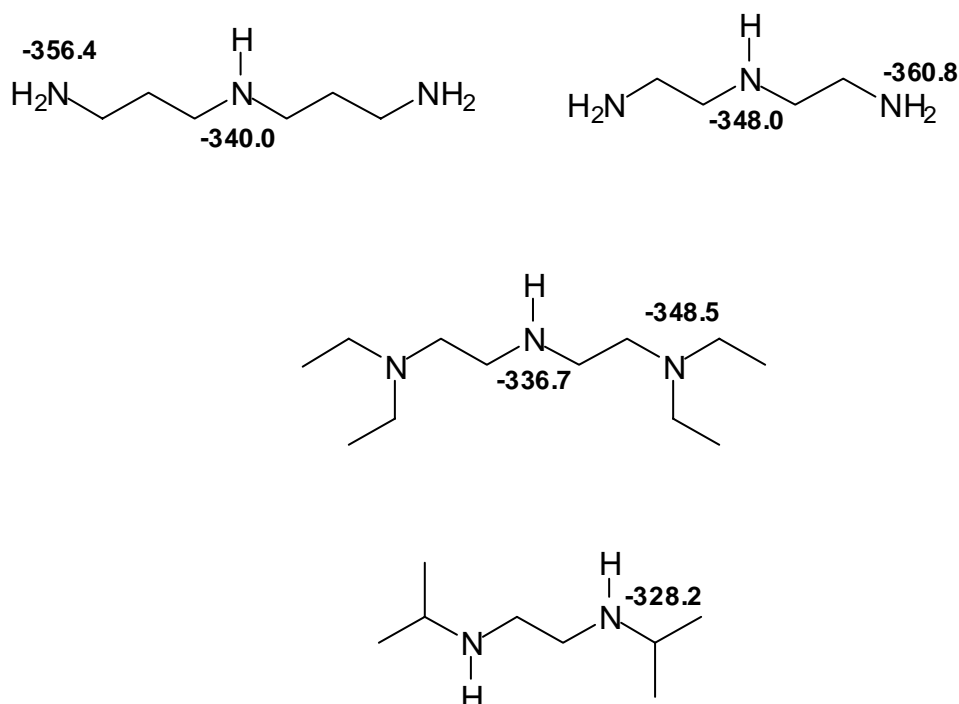


Abb. 89: <sup>15</sup>N-NMR-Daten gemessen in D<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur

Es wurden drei Guanidiniumsalze **38**, **40** und **42** untersucht. Von Verbindung **38** und auf Grund der nicht ausreichenden Löslichkeit in D<sub>2</sub>O war es nicht möglich ein <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum aufzunehmen. Die Daten für die anderen zwei Guanidinverbindungen **40** und **42** stehen im Einklang mit den in der Literatur<sup>[101]</sup> berichteten chemischen Verschiebungen für diese funktionelle Gruppe. In Abb. 93 sind die chemischen Verschiebungen dargestellt. Der pH-Wert der ges. Lö-

sungen liegt im alkalischen Bereich ( $\text{pH} > 10$ ). Wie in der Literatur berichtet, ist bei diesen pH-Werten eine Unterscheidung zwischen den beiden N-Atom-Sorten der Guanidinium-Gruppe noch möglich. Unter physiologischen und unter schwach alkalischen Bedingungen liegen die in der Abb. 90 aufgelisteten Verbindungen protoniert vor. Die chemische Verschiebung für das  $-\text{NH}-$ Atom der Guanidin-Gruppe liegt bei  $-301.1$  bzw.  $-296.5$  ppm, während die Guanidin-N-Atome eine chemische Verschiebung von  $-310.8$  bzw.  $-309.8$  aufweisen. Für die sekundäre Aminofunktion, die im späteren Verlauf der Synthese die NONOat-Gruppe unterbringen wird, findet man eine Verschiebung von  $-336.6$  bzw.  $-341.3$  ppm. Dies ist typisch für sek. Amine. Verbindung **40** zeigt auf Grund der Anwesenheit der tert. Aminofunktion ein zusätzliches Signal bei  $-350.0$  ppm.

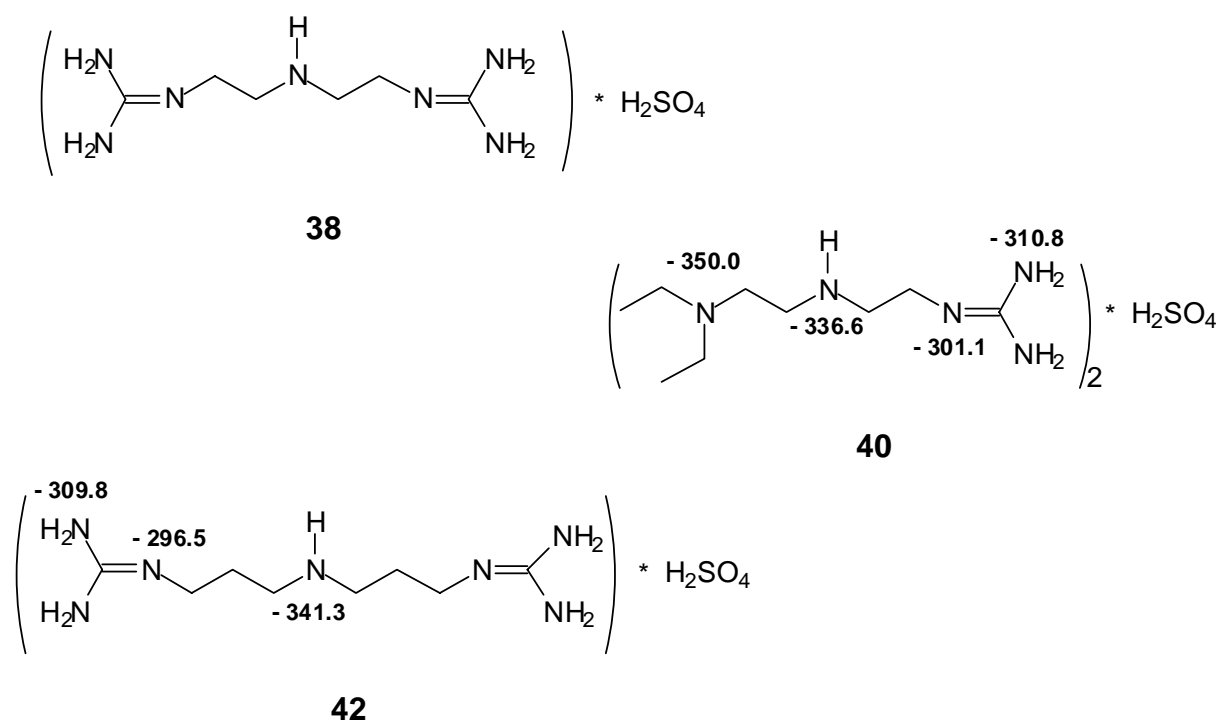
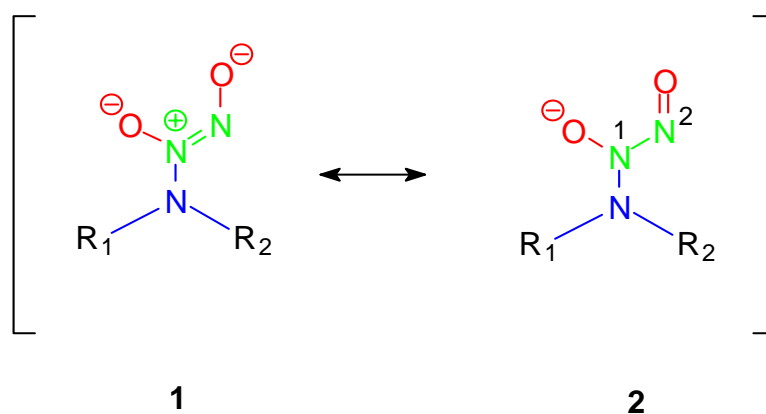


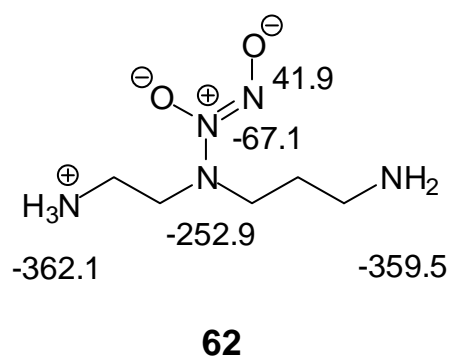
Abb. 90:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Daten für Guanidiniumsalze als ges. Lösungen in  $\text{D}_2\text{O}$  bei Raumtemperatur.

NONOate zeigen sowohl in Lösung, als auch im Festkörper drei charakteristische Signale. Das Stickstoffatom, das die funktionelle Gruppe trägt zeigt eine Tieffeld-Verschiebung im Vergleich zum sek. Ausgangsamin, bei dem diese Gruppe eine Verschiebung im Bereich von  $-336$  bis  $-350$  ppm besitzt. Diese fast kon-

stante chemische Verschiebung, unabhängig vom Molekül, liegt bei -251 bis -258 ppm. Das N<sup>1</sup>-Stickstoffatom ist bei einer chemischen Verschiebung von -50 bis -69 ppm zu finden, während das Signal für das N<sup>2</sup>-Stickstoffatom im Bereich von 37 bis 43 ppm anzutreffen ist. Abb. 91 zeigt eine Auflistung und Zuordnung der jeweiligen Signale.



Die Zuordnung der Signale für **62** konnte mit Hilfe der gemessenen Verschiebungen für die Verbindungen **65** und **66** durchgeführt werden. **62** kann formell als eine Mischung aus beiden Verbindungen betrachtet werden.



In Abb. 91 sind weitere gemessene NONOate aufgelistet. Im Falle der Verbindungen **63** und **64** war die Aufnahme von Festkörper-NMR-Spektren möglich.

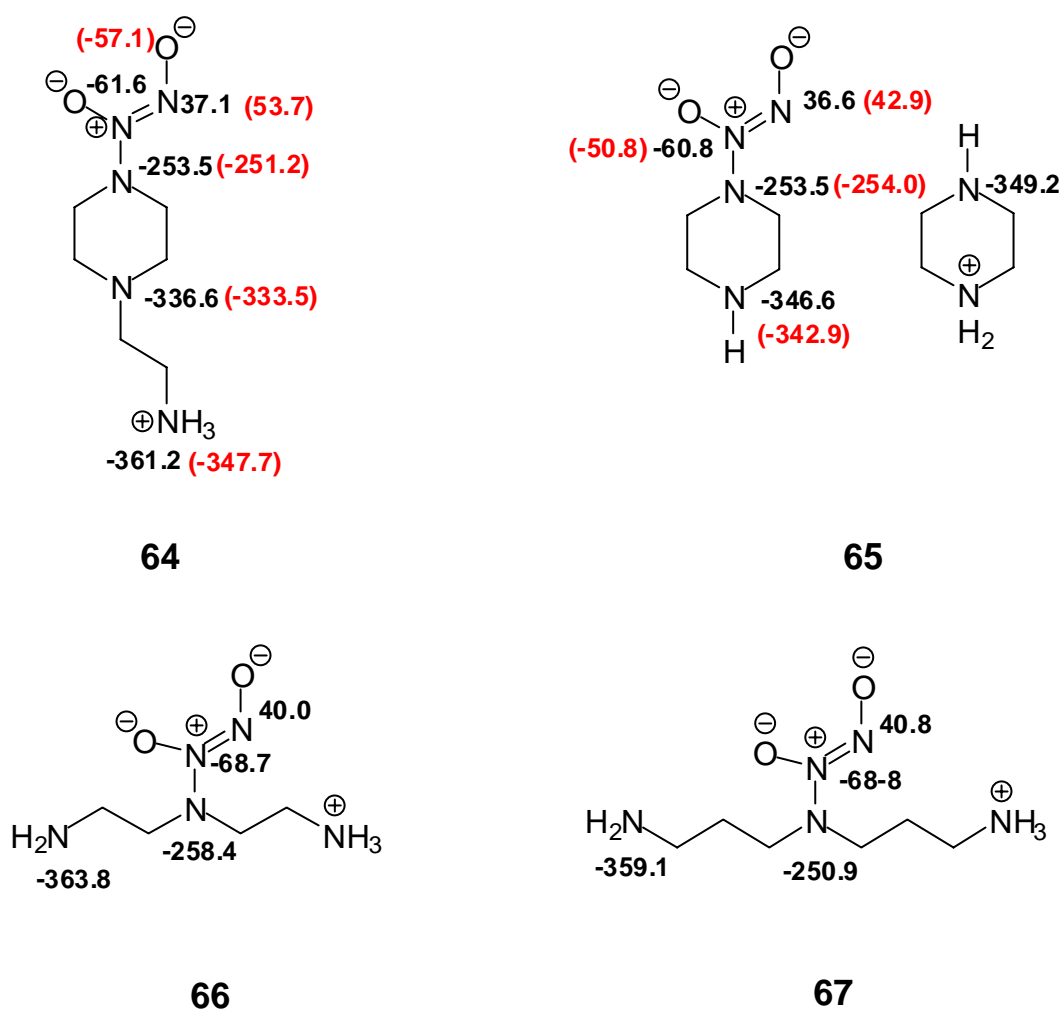


Abb. 91:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Daten gemessen in 2 - 4 M NaOD. Die Werte in Klammern stammen aus den Festkörper-NMR-Messungen.

Für die Guanidin-NONOate sind die Werte in Abb. 92 aufgeführt. Um eine bessere Übersicht zu ermöglichen, wurden die Gegenionen im Falle der intermolekular stabilisierten Salze nicht mit abgebildet. Die Signale des  $\text{N}^1$ -Atoms der Diazeniumdiolat-Gruppe befinden sich im Bereich -69.0 bis -67.1 ppm, während die Signale des  $\text{N}^2$ -Atoms im Bereich 41.3 - 42.8 ppm zu finden sind. Beide Signalgruppen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten für die NONOate **62** und **64** - **67**. Das Diazeniumdiolat tragende  $\text{N}$ -Atom besitzt ein Signal im Bereich -254.4 - -250.4 ppm, ebenfalls im Einklang mit den Daten für die bereits erwähnten Verbindungen. Bei der Verbindung **58** ist noch eine tert. Aminofunktion vorhanden, die ein Signal bei -348 ppm zeigt. Die Messungen dieser Verbindungen wurden in stark alkalischen Lösungen (2 - 4 M NaOD) durchgeführt. Im

Einklang mit den in der Literatur<sup>[101]</sup> vorhandenen Werten findet man nur ein Signal für die drei Guanidin-N-Atome. Dieses Signal befindet sich bei -293.1 bis -291.8 ppm und ist ein Hinweis darauf, dass die Guanidin-Gruppe deprotoniert vorliegt.

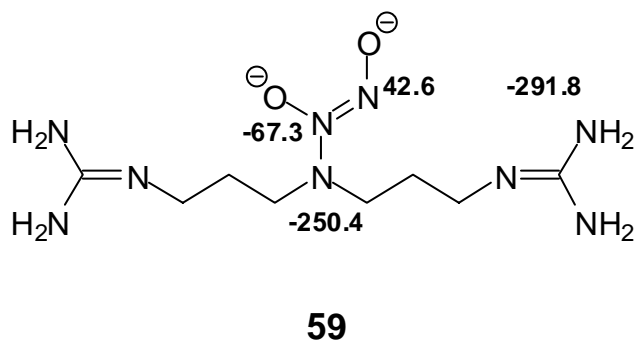
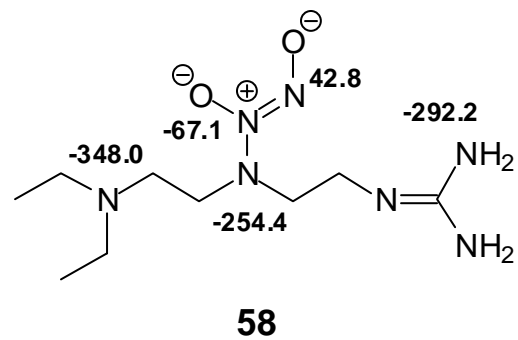
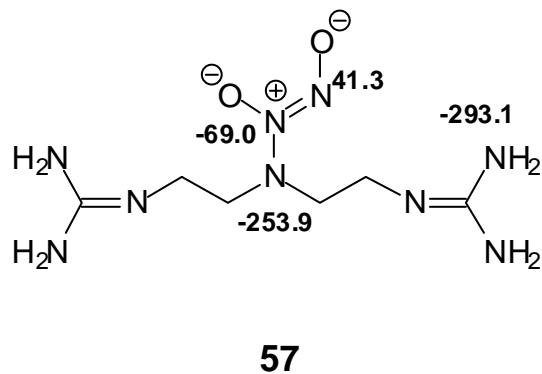


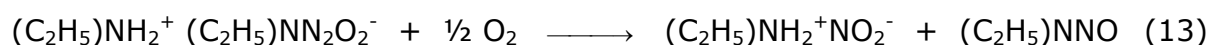
Abb. 92:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Daten der Guanidin-NONOate gemessen in 2 – 4 M NaOD.

### 3.10 Produktanalyse des Zerfalls von NONOaten

#### Zerfall vom Feststoff ausgehend

DRAGO *et. al.*<sup>[60]</sup> beschreiben Produktanalysen für den Zerfall von NONOaten der Struktur  $R_2NH_2^+ R_2NN_2O_2^-$  für Verbindungen aus sekundären Aminen (Diethylamin-NONOat) und der Struktur  $RNH_3^+ RNHN_2O_2^-$  für Verbindungen aus primären Aminen (Isopropylamin-NONOat), unter Sauerstoffausschluss und bei Sauerstoffanwesenheit. Zu diesem Zeitpunkt waren Anwendungen von NONOaten im zellbiologischen Bereich noch nicht von Relevanz. Die Produktanalysen hatten eher qualitativen Charakter und erfolgten unter zellbiologisch nicht relevanten Bedingungen.

Bei Raumtemperatur beobachteten sie in Anwesenheit von Sauerstoff eine langsame Zersetzung des NONOats aus Diethylamin, wobei ein braunes Öl entstand. Das NONOat wurde langsam unter Bildung von Diethylammoniumnitrit und Diethylnitrosamin oxidiert. Wahrscheinlich ist, dass erst nach der Dissoziation des Eduktes (NONOat) das Ausgangsamin und Stickstoffmonoxid zu Nitrit und Nitrosamin oxidiert wurden.



Unter anaeroben Bedingungen entstehen beim Zerfall des Diethylamin-NONOats Stickstoffmonoxid und das Ausgangsamin. Die Zersetzung verläuft sehr langsam bei Raumtemperatur.

Bei der Zersetzung von Isopropylamin-*N*-Diazeniumdiolat, wurden in Anwesenheit von Sauerstoff mehrere Produkte gefunden, darunter Wasser, das Ausgangsamin und andere nicht definitiv identifizierte Produkte (Olefin, Nitrit und Alkohol).

## Zerfall in Lösung

Zum Zerfall von NONOaten in Lösung gibt es mehrere Berichte. KEEFER *et al.*<sup>[56]</sup> untersuchten den Zerfall von Verbindungen, die in Tab. 13 aufgeführt werden. Von allen Verbindungen wurde der Zerfall im Phosphatpuffer (pH 7.4 und 37 °C) mit Hilfe der UV-Spektroskopie untersucht. Aus den kinetischen Daten konnten so die Halbwertszeiten ermittelt werden.

Mit Hilfe der Chemiluminiszenz wurden die beim Zerfall entstandenen Stickstoffmonoxid-Mengen in einer Pufferlösung (pH 7.4) bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bestimmt. Beim Zerfall des Natriumsalzes des Diethylamin-NONOats mit  $\lambda_{\max}$  bei 250 nm und einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 2.1$  min wurden 1.5 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat gefunden. Das Natriumsalz des Isopropylamin-NONOats mit  $\lambda_{\max}$  bei 252 nm und  $t_{1/2} = 2.3$  min spaltet dem Bericht zufolge 0.73 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat ab. Das dritte untersuchte NONOat, das Spermin-NONOat mit  $\lambda_{\max}$  bei 252 nm und  $t_{1/2} = 39$  min, spaltet 1.90 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat ab. Allerdings wurde diese Menge bei pH 2 ermittelt, da das NONOat bei pH 7.4 zu stabil für diese Messtechnik war.

In den Berichten von RAMAMURTHI und LEWIS<sup>[140]</sup> wurden die entstandenen Stickstoffmonoxid-Mengen mit Hilfe von Ultrafiltrationszellen in Phosphatpufferlösung (pH 7.4) bei 37 °C bestimmt, wobei sie die Natriumsalze der Diethylamin- und Spermin-NONOate untersuchten. Für das Natriumsalz des Diethylamin-NONOats fanden sie 1.5 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat. Die freigesetzte Stickstoffmonoxid-Menge vom Natriumsalz des Spermin-NONOats wurde im Gegensatz zu KEEFER bei pH 7.4 bestimmt. Demnach werden 1.7 Mol Stickstoffmonoxid pro Mol NONOat abgespalten.

Hinweise auf die weiteren Zerfallsprodukte bzw. Zwischenprodukte, die beim Zerfall entstehen gibt es offensichtlich nicht.

Tab. 13: Auflistung der in der Literatur vorhandene Daten zur entstandenen Stickstoffmonoxid-Menge beim Zerfall (Phosphatpuffer pH 7.4 und 37 °C) verschiedener NONOate.

Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]	$k \cdot 10^{-3}$ [min <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]	Ausbeute an NO nach Keefer <sup>[56]</sup> [n <sub>NO</sub> /Mol <sub>NONOat</sub> ]	Ausbeute an NO nach Lewis <sup>[140]</sup> [n <sub>NO</sub> /Mol <sub>NONOat</sub> ]
Diethylamin- NONOat (Na-Salz)	250	5.4 ± 0.2	2.1	1.50 ± 0.11	1.50 ± 0.20
Isopropylamin- NONOat (Na-Salz)	252	5.1 ± 0.4	2.3	0.73 ± 0.04	
Spermin-NONOat	252	0.30 ± 0.02	39	1.90 ± 0.00 (pH 2)	1.70 ± 0.10

### 3.10.1 Produktanalyse des Zerfalls von 1-(2-Aminoethyl)-piperazin-*N*-diazoniumdiolat **64**

#### Zerfall vom Feststoff ausgehend

Der Zerfall des NONOats **64** wurde sowohl vom Feststoff ausgehend als auch in Lösung unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 22.0 ± 2.0 °C untersucht. Vom Feststoff ausgehend wurde unter Sauerstoffausschluss eine langsame Zersetzung beobachtet, wobei nach 7 Tagen eine klare Flüssigkeit entstand. Die GC-Analyse ergab die Anwesenheit einer einzigen Verbindung, die mit Hilfe von authentischem Material als Vergleich und nach GC-MS-Analyse eindeutig als das Ausgangsamin identifiziert wurde.

Beim Zerfall unter aeroben Bedingungen konnte nach 7 Tagen die Bildung eines gelben Öles festgestellt werden. Das Öl wurde ebenfalls mit Hilfe der GC analysiert. Dabei zeigte sich, dass zwei Verbindungen vorhanden waren, von denen die eine aufgrund des Vergleiches mit authentischem Material und nach GC-MS-Analyse eindeutig das Ausgangsamin 1-(2-Aminoethyl)-piperazin war. Die andere Verbindung war nicht so leicht identifizierbar, konnte aber mit Hilfe der GC-IR-Analyse als Nitrosamin des 1-(2-Aminoethyl)-piperazins erkannt werden. Die beiden Verbindungen entstanden nach Analyse der GC-Flächen im Verhältnis 70:30 zu Gunsten des Amins.

### Zerfall in Lösung

Zum Studium der Zersetzung dienten Lösungen des NONOats in reinem Wasser und Phosphatpuffer. Als Analysemethoden wurden die Gaschromatographie und die NMR-Spektroskopie eingesetzt.

Der Zerfall des NONOats **64** in sauerstofffreier wässriger Lösung wurde nach 18 h mit Hilfe der GC-Analyse untersucht. Dabei konnte die Anwesenheit von zwei Verbindungen festgestellt werden. Beide konnten in analoger Weise zu den zuvor diskutierten Experimenten eindeutig als das Ausgangsamin 1-(2-Aminoethyl)-piperazin und das Nitrosamin des 1-(2-Aminoethyl)-piperazins identifiziert werden. Die beiden Verbindungen entstanden nach Analyse der GC-Flächen im Verhältnis 80:20 zu Gunsten des Amins. Lässt man Zerfallslösungen längere Zeit stehen (14 Tage), so beobachtet man ausschließlich Amin. Das wird darauf zurückgeführt, dass sich Nitrosamine langsam unter Bildung von Amin und salpetriger Säure zersetzen.

Die Zersetzung in Gegenwart von Sauerstoff lieferte prinzipiell keine neuen Erkenntnisse. Auch hier entstanden bevorzugt Ausgangsamin und Nitrosamin. Die Bildung der Produkte wurde auch in Phosphatpuffer analysiert, wobei die GC-Analyse in Gegenwart des Phosphats zu Schwierigkeiten führte.

Das Ergebnis der Produktanalysen ist nicht einfach zu interpretieren, insbesondere nicht die Bildung des Nitrosamins unter anaeroben Bedingungen und die Quantifizierung der entstandenen Produkte in Phosphatpuffer und Wasser

sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Zur Klärung dieser Frage wurde der Zerfall von **64** mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt.

Neu sind die Quantifizierungen der tatsächlich entstandenen Zerfallsprodukte unter aeroben und streng anaeroben Bedingungen (Ar-Atmosphäre) in Phosphatpufferlösung (pD 7.2) und  $\text{D}_2\text{O}$ , mit Hilfe von 1,4-Dioxan als externem Standard. Zwei NONOat-Konzentrationen wurden ausgesucht. Die erste betrug 0.1 M, während die zweite Konzentration, die als Kontrolle gedacht war, bei 1 mM lag. Es wurde bei einer Temperatur von  $25.0 \pm 0.5$  °C gemessen. Für die anaeroben Messungen wurde auf eine absolute Schutzgas-Atmosphäre geachtet. Sämtliche verwendete Geräte wurden zuerst ausgeheizt und dann mit Argon belüftet. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls unter Schutzgas. Die mit Phosphatpuffer gefüllten NMR-Röhrchen wurden kurz vor den Messungen mit der jeweiligen Menge an NONOat versetzt und dann luftdicht verschlossen. Das während der Messung gebildete Gas wurde unter Schutzgas vom Röhrchen entfernt und das Gefäß wieder verschlossen. Eine andere Methode bestand darin, den Zerfall in einem unter Schutzgas stehenden Stickstoffkolben zu verfolgen. Je nach Bedarf wurden Aliquoten in NMR-Röhrchen zur Messung überführt. Der Zerfall wurde auch unter aeroben Bedingungen verfolgt.

Die Ergebnisse der Messungen unter anaeroben Bedingungen bei  $25.0 \pm 0.5$  °C zeigen, dass nach 1014 min pro Mol NONOat **64** 0.7 – 0.8 Mol Amin und 0.2 – 0.3 Mol Nitrosamin entstanden sind. Mit Hilfe von Vergleichs- und Korrelationspektren konnten die Signale der Zerfallsprodukte eindeutig zugeordnet werden. Die Quantifizierung bezog sich auf die sich neu bildenden Triplets der Nitrosamin-Verbindung mit chemischen Verschiebungen von 3.87 und 4.24 ppm. Abb. 93 zeigt den zeitlichen Verlauf der  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen in deuterierter Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) bei  $25.0 \pm 0.5$  °C über einem Zeitraum von 410 min.

Die Auswertung der Messungen unter aeroben Bedingungen erfolgte in analoger Weise und zeigte dass pro Mol NONOat 0.60 - 0.65 Mol Amin und 0.35 - 0.40 Mol Nitrosamin gebildet worden waren. Abb. 94 zeigt die zeitliche Verfolgung der Nitrosaminbildung unter aeroben und anaeroben Bedingungen in deuterierter Phosphatpufferlösung (pD 7.2) bei  $25.0 \pm 0.5$  °C bezogen auf eine Anfangskonzentration von  $[\mathbf{64}] = 1$  M.

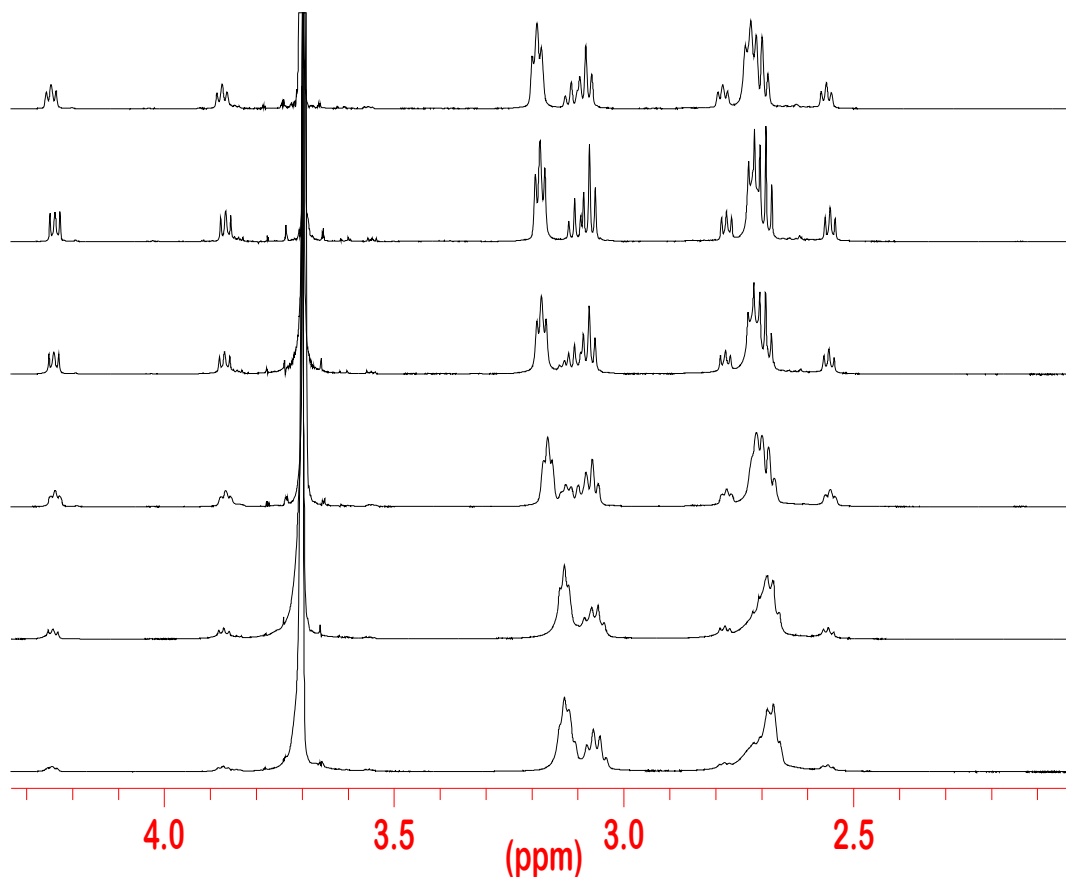


Abb. 93: Darstellung des Zerfalls von 0.1 M **64** unter anaeroben Bedingungen in deuterierter Phosphatpufferlösung (pD 7.2) bei  $25.0 \pm 0.5$  °C über einen Zeitraum von 410 min.

Analysen dieser Art sind bis jetzt einmal in der Literatur<sup>[141]</sup> beschrieben worden. Die durchgeführten Untersuchungen zum Zerfall von **21** als intermolekular stabilisiertem Salz fanden in D<sub>2</sub>O bzw. CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel und nicht im gepufferten Medium statt. Die Halbwertszeit, die in D<sub>2</sub>O bei 22 °C gemessen wurde, lag bei 130 h. Dieser Wert stimmt nicht mit den literaturbekannten Daten überein. Der Grund dafür wurde nicht diskutiert. Es ist wahrscheinlich, dass die Reaktionslösung während des Zerfalls und auf Grund des wachsenden Amin-Anteils in der Probe alkalischer wurde, so dass der Zerfall durch Autokatalyse bedingt langsamer wurde.

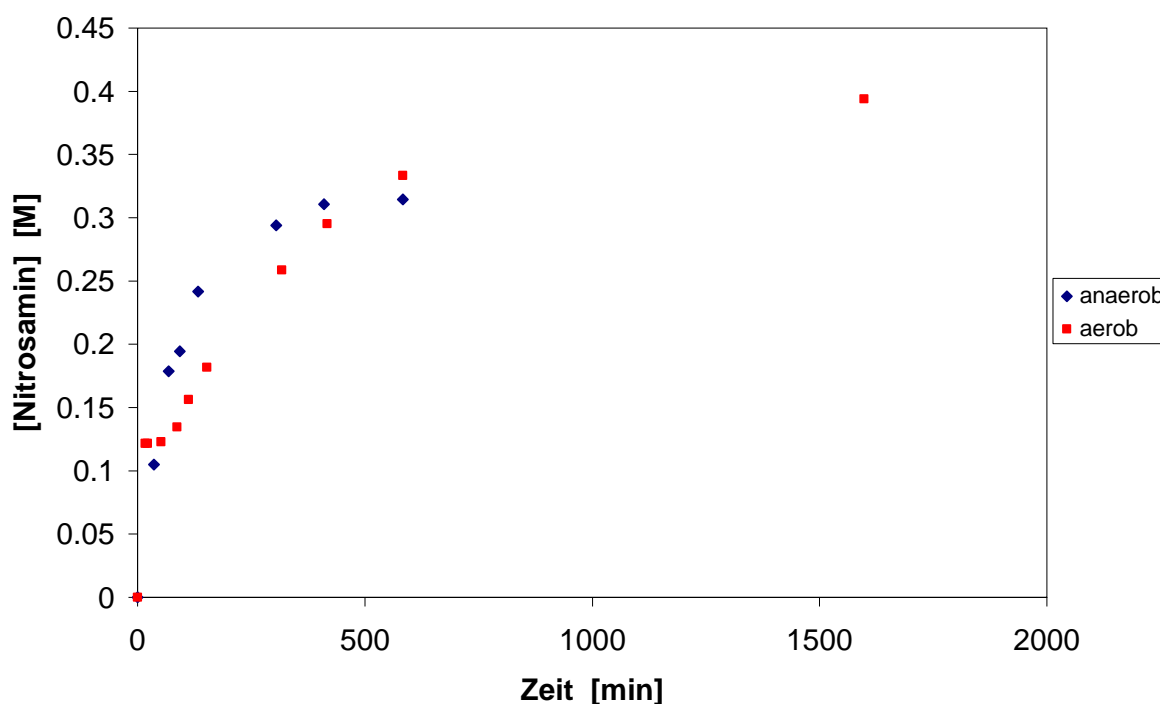


Abb. 94: Zeitliche Verfolgung der Nitrosaminbildung in deuterierter Phosphatpufferlösung (pD 7.2) bei  $25.0 \pm 0.5$  °C unter aeroben (- ■ -) und anaeroben (- ◆ -) Bedingungen bezogen auf  $[64]_{t=0} = 1$  M.

### Zusammenfassung

Die hier gefundenen Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten der Fluoreszenzmessungen von **64** (mit der Sonde **72**). Der Zerfall unter streng anaeroben Bedingungen kann demnach nicht nur über den in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismus ablaufen. Es müssen alternative Zerfallswege vorhanden sein, die die Bildung des Nitrosamins auch unter anaeroben Bedingungen erklären können.

Abb. 95 postuliert zwei Mechanismen, die die Bildung des Nitrosamins unter anaeroben Bedingungen zu erklären versuchen. In beiden Fällen entsteht neben Nitrosamin HNO bzw.  $\text{NO}^-$ . Mechanismus **A** geht von einer Protonierung der Stelle mit der höchsten Basizität<sup>[128]</sup> aus. Denkbar wäre eine nicht radikalische Abspaltung der guten Abgangsgruppe HNO unter Bildung des Nitrosamins. Bei Mechanismus **B** wird vom modifizierten<sup>[59]</sup> DRAGO-Mechanismus<sup>[52, 53, 60]</sup> ausgegangen (Kap. 1.2.4). Das während der Synthese entstehende Nitroxyl-Radikal

könnte zum Nitrosamin oxidiert werden, wobei Stickstoffmonoxid als Oxidationsmittel unter Bildung von  $\text{NO}^-$  bzw.  $\text{HNO}$  dient.

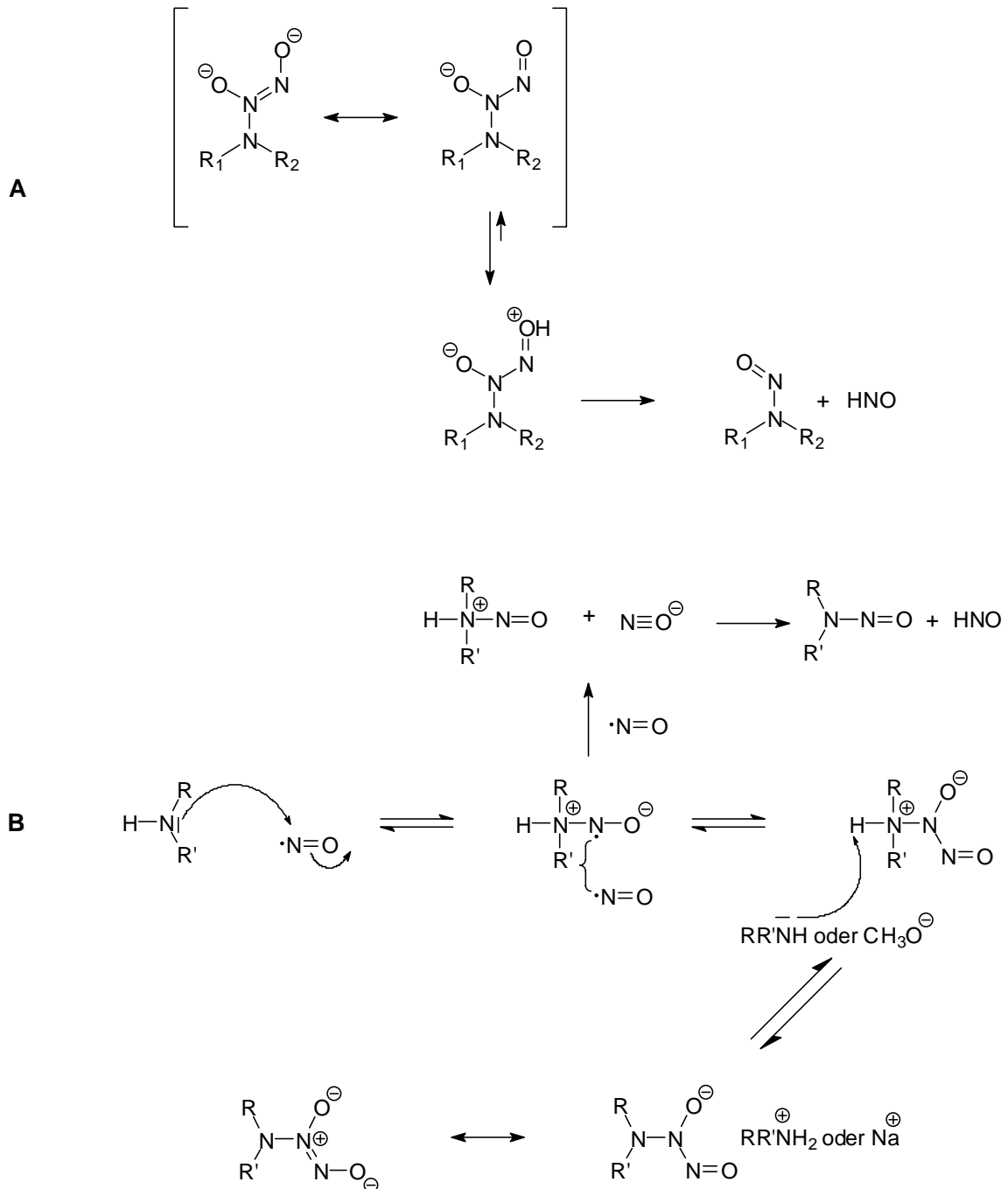
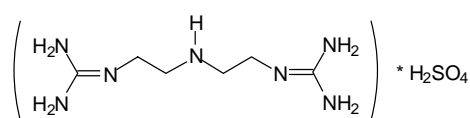


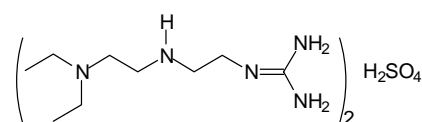
Abb. 95: Alternative Zerfallswege von NONOaten: **A)** Ausgehend aus einer Protonierung der Stelle der höchsten Basizität. **B)** Erweiterter Bildungs/Dissoziationsmechanismus, bei dem das Nitrosamin durch Oxidation des Nitroxylradikals entsteht.

## 4 Zusammenfassung

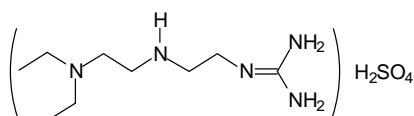
Es konnten erfolgreich die literaturbekannten Guanidiniumsulfate **38** (97 %, Lit.<sup>[88]</sup> 87%), **40** (92 %), **41** (54 %) und **42** (96 %, Lit.<sup>[88]</sup> 65 %), sowie die neue Verbindung **44** (79 %) synthetisiert werden. Ergebnisse dieser Arbeit werden in blau dargestellt. Für die Freisetzung der Guanidine, ausgehend aus den Sulfatsalzen, wurde eine Methode entwickelt und optimiert, so dass die Synthese der neuen Guanidine **51**, **52** und **53** mit quasi quantitativen Ausbeuten von ~ 98 % durchgeführt werden konnte. Literaturbekannte Triamine **54** (34 %, Lit.<sup>[117, 118]</sup> 34 %) und **55** (35 %, Lit.<sup>[119]</sup> 21 %) wurden als Gerüste für NONOate konzipiert und synthetisiert.



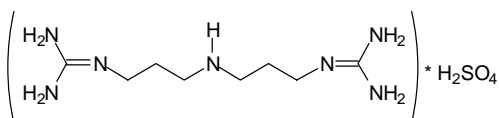
98%, Lit.<sup>[88]</sup> 87 %



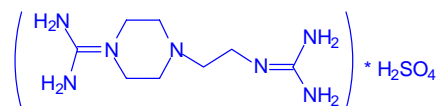
92 %



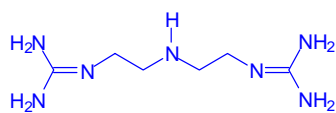
74 %



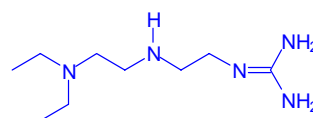
96 %, Lit.<sup>[88]</sup> 65 %



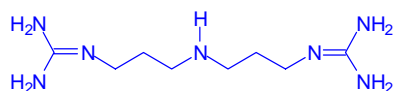
79 %



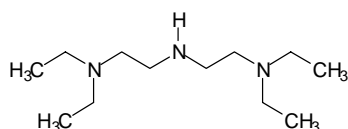
98 %



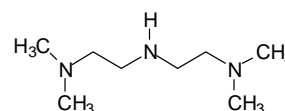
98 %



98 %

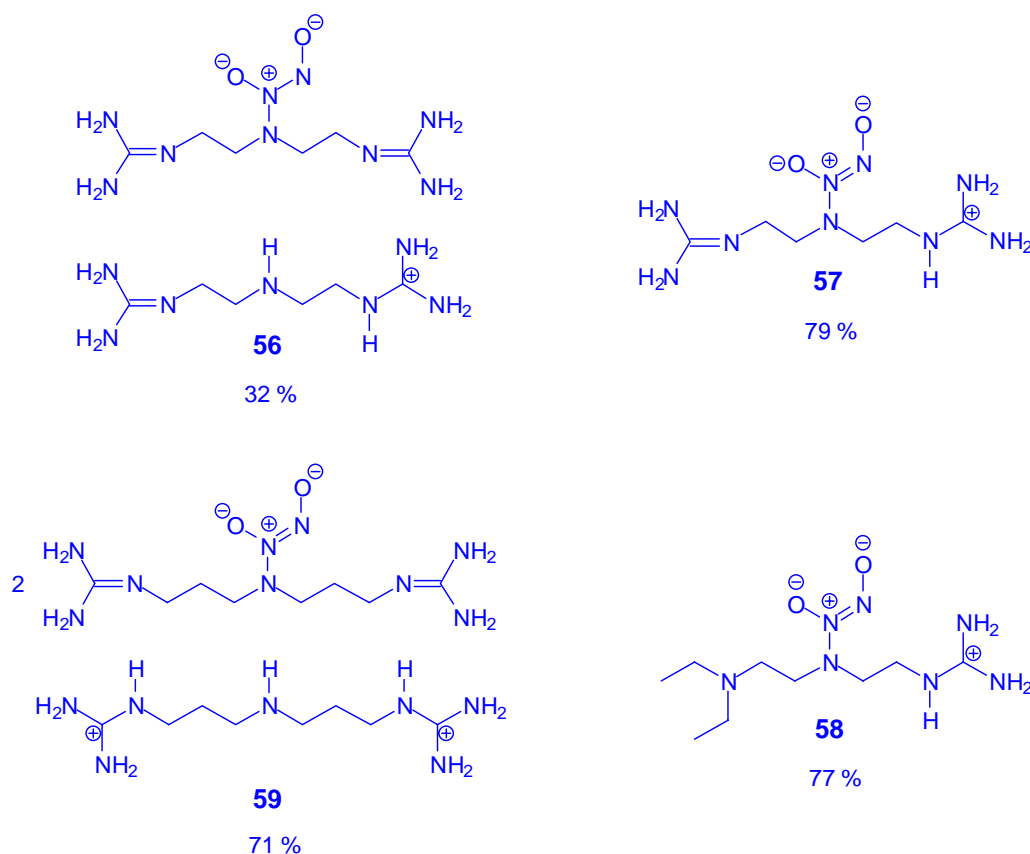


34 %, Lit.<sup>[117, 118]</sup> 34 %

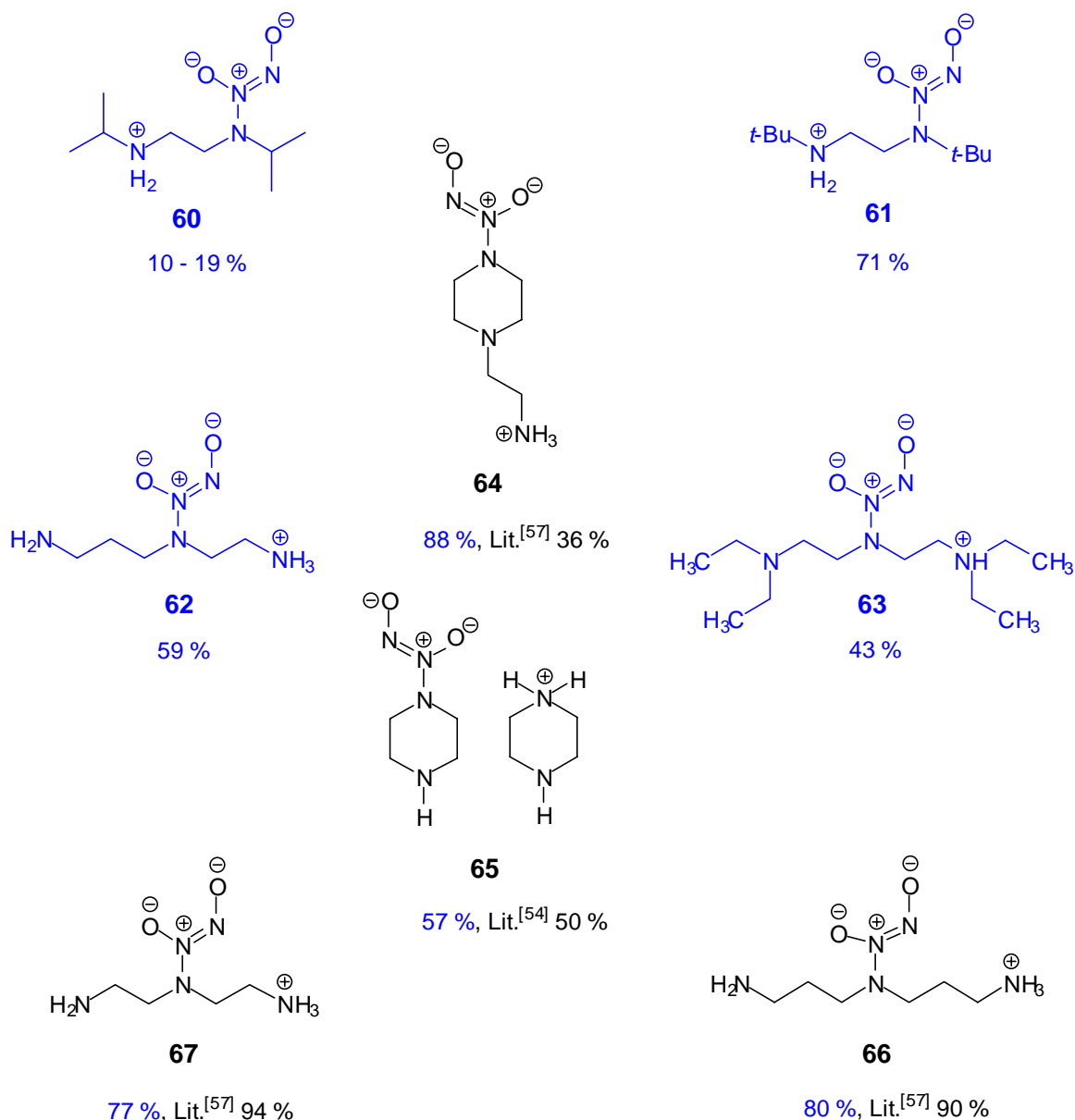


35 %, Lit.<sup>[119]</sup> 21 %

Ausgehend aus den freien Guanidinen **52**, **52** und **53** wurden die NONOate **56** (32 %), **57** (79 %), **58** (77 %) und **59** (71 %) durch Umsetzung mit Stickstoffmonoxid im Autoklaven erfolgreich synthetisiert. Diese Verbindungen sind Bestandteil der neuen Verbindungsklasse: der Guanidin-NONOate. Bei **56** und **57** handelt es sich um zwei Formen des gleichen NONOats (Kap. 3.3): als intra- und intermolekular stabilisiertes Salz. Die Synthese Guanidine dieser Art ist nicht einfach, freie Guanidine sind luftempfindliche Verbindungen. Während des Befüllens und Entleerens konnte nicht unter Schutzgas gearbeitet werden, so dass es hier wahrscheinlich zur Bildung von Zersetzungsprodukten und Verunreinigungen kam.



Auf Diaminbasis konnten die NONOate **60** (10 - 19 %) (keine optimierte Synthese) und **61** (71 %) genauso erfolgreich synthetisiert werden, wie die NONOate auf Triaminbasis **62** (59 %) und **63** (43 %). Diese Verbindungen sind ebenfalls neu. Weiter wurden literaturbekannte NONOate **64** (88 %, Lit.<sup>[57]</sup> 36 %), **65** (57 %, Lit.<sup>[54]</sup> 50 %), **66** (77 %, Lit.<sup>[57]</sup> 94 %) und **67** (80 %, Lit.<sup>[57]</sup> 90 %) dargestellt.



Mit Hilfe der UV-Spektroskopie wurde der Zerfall von NONOaten unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C) verfolgt. Dieser Zerfall lässt sich mit einer Kinetik erster Ordnung beschreiben. Die Auswertung liefert die Werte für den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , die Geschwindigkeitskonstante  $k$  und daraus resultierend den Wert für die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der jeweiligen Verbindung. Die Verbindungen **58** (670 min), **63** (585 min), **62** (450 min) und **57** (399 min) stellen die stabilsten bisher bekannten wasserlöslichen NONOate dar, mit Ausnahme von Verbindung **67** (1180 min). Guanidin-NONOate sind auf Grund der hohen  $pK$ -Werte der Guanidinfunktionen unter physiologischen Bedingungen stets protoniert und sind interessant, weil sie als kationische NONOate in Lösung vorliegen sollten.

Die pH-Abhängigkeit des Zerfalls von **57** und **58** wurde ausführlich untersucht. Demnach zerfallen beide Moleküle nach einem zweistufigen Mechanismus, der durch die Gl. 16 – 18 (s. S. 137) beschrieben wird. Es wurden die  $pK_{\text{AH}}$ -Werte sowie der  $k_{\text{AH}}$ -wert für die Reaktionsabfolge bestimmt.

Die Fluoreszenzsonden **72** und **73** konnten erfolgreich und reproduzierbar angewendet werden. Mit Hilfe dieser Verbindungen wurde die während des Zerfalls von **57**, **58** und **64** freigesetzte Menge an Stickstoffmonoxid quantitativ bestimmt. Während das literaturbekannte NONOat **64** 1.50 – 1.60 Mol No pro Mol NONOat freisetzt, sind Verbindungen **57** und **58** in der Lage NO quantitativ freizusetzen.

Die Produktanalyse des Zerfalls von **64** konnte ebenfalls reproduziert werden und mit Hilfe der quantitativen NMR-Spektroskopie eindeutig auf die entstandenen Mengen der jeweiligen Komponenten untersucht werden. Es wurde in Wasser und Pufferlösung gearbeitet, sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen. In der Literatur sind Untersuchungen dieser Art nicht vorhanden. Aus den Messungen geht hervor, dass unter anaeroben Bedingungen pro Mol NONOat **64** 0.2 – 0.3 Mol Nitrosamin entstehen.

Aus den letzten drei Abschnitten konnte auf mehr als einen Zerfallsweg für NONOate geschlossen werden. Die Tatsache, dass manche dieser Verbindungen unter Bildung von Nitrosaminen zerfallen, wurde in der Literatur bis auf eine Ausnahme nur unter aeroben Bedingungen, erwähnt.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Arbeiten unter Schutzgas

Bei der Herstellung der Verbindungen und den Operationen mit ihnen wurde unter Schutzgas gearbeitet. Als Schutzgase wurden Stickstoff 5.0 und Argon 5.0 (beide mit einer Reinheit von 99.999 %) der Firma Messer Griesheim verwendet. Die Gefäße wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe ( $p = 200 \text{ Pa}$ ) evakuiert, anschließend unter Vakuum mit einer Flamme ausgeheizt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur schließlich mit Schutzgas belüftet. NMR-Röhrchen wurden in Gegenwart von Molekularsieb  $3 \text{ \AA}$  in einem Kolben ausgeheizt, mit Schutzgas belüftet und aufbewahrt.

### 5.2 Verwendete Geräte und Methoden

#### *Elementaranalyse*

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor der Universität Duisburg-Essen mit einem Elemental Analyser Modell 1106 der Firma Carlo Erba durchgeführt. Bei einem Stickstoffgehalt  $>35 \%$  nehmen die Abweichungen von den berechneten Werten zu, was Folge der thermischen Zersetzung sein kann.

#### *Infrarot-Spektroskopie*

Zur Aufnahme der Infrarot-Spektren diente das FT-IR-Spektrometer FT 135 der Firma Bio-Rad. Es sind die Wellenzahlen  $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$  der Schwingungen angegeben, welche für die Verbindungen charakteristisch sind. Die Schwingungsart ist mit  $\nu$  (Valenz- bzw. Streckschwingung),  $\delta$  (Deformationsschwingung),  $\varphi$  (Pen-

del-Deformationsschwingung), i.p. (in plane) bzw. o.o.p. (out of plane) aufgeführt.

### *NMR-Spektroskopie*

Die NMR-Spektren wurden mit drei Spektrometern aufgenommen: XL-200 Spektrometer der Firma Varian mit einer Messfrequenz von 200 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR) bzw. 50.3 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR), DRX-500 Spektrometer der Firma Bruker mit einer Messfrequenz von 500 MHz ( $^1\text{H}$ -NMR), 125.76 MHz ( $^{13}\text{C}$ -NMR) und 50,66 MHz ( $^{15}\text{N}$ -NMR). Für die Festkörper-NMR-Analysen wurde ein DMX-300 Spektrometer der Firma Bruker mit einer Messfrequenz von 30.4 MHz ( $^{15}\text{N}$ -NMR) eingesetzt. Die  $\delta$ -Skala ist in ppm angegeben. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die chemischen Verschiebungen auf TMS als Standard. Die Signalmultiplizitäten werden durch die Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett von Dublett) und m (Multipllett) wiedergegeben.

### *Schmelzpunkte*

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät 510 der Firma Büchi bestimmt und sind unkorrigiert.

### *Massenspektrometrie*

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit dem Quadrupol-Massenspektrometer HP5871A MSD der Firma Hewlett Packard. Davor geschaltet befand sich ein Gaschromatograph des Typs HP 5890 Serie II der gleichen Firma. Standardmäßig wurde eine unpolare Säule vom Typ SGE BPX5 mit den Dimensionen Länge = 50 m, Innendurchmesser = 0.15 mm und Filmdicke = 0.4  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Für die Nutzung über den Direkteinlass wurde das Sektorfeld-Massenspektrometer FISIONS VG Prospec 3000 bevorzugt genommen.

### *ESI-TOF*

Die hochaufgelöste Massenspektrometrie erfolgte mit dem Gerät Bio TOF II der Firma Bruker (*ESI-Elektrospray ionisation*) (Boston, USA). Zur Auswertung der hochaufgelösten Massenspektren wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse (*monoisotopic mass*) ausgewählt.

### *UV-Vis-Spektroskopie*

Die UV-Spektren und -Analysen wurden mit dem Gerät FL 3095-500 der Firma J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH und mit dem Gerät Cary 300, ausgerüstet mit einem automatischen thermostatisierbaren Küvettenwechsler mit Kapazität für 14 Küvetten aufgenommen.

### *Fluoreszenzspektroskopie*

Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer FL 3095-Fluoro-Scan der Firma J&M Analytische Mess- und Regeltechnik aufgenommen.

### *Gaschromatographie*

Die GC-Analysen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit dem Gerät Varian Model 3700 durchgeführt. Als Säule diente eine BPX35-Säule mit der Länge = 30 m, Durchmesser = 0.33 mm und Filmdicke = 0.25  $\mu\text{m}$ .

### *GC-IR*

Die GC-IR Analysen wurden mit einem Gaschromatograph 8521-A der Firma Dany durchgeführt, gekoppelt an das FT-IR-Spektrometer FT 135 der Firma Bio-Rad. Als Säule diente eine unpolare DB210-Säule der Firma J+W mit den Dimensionen Länge = 30 m, Durchmesser = 0.22 mm und Filmdicke = 0.4  $\mu\text{m}$ .

### *pH-Messungen*

Die pH-Werte wurden mit einem Piccolo Plus ATC pH/C-Meter der Firma Hanna bestimmt.

*Verwendete Chemikalien*

Wenn nicht anders erläutert, handelt es sich um p. a. Chemikalien.

Verbindung	Hersteller	Eingesetzt in Kap.
Diethylentriamin	Aldrich	5.4, 5.7
Bis-(3-aminopropyl)-amin 98%	Acros	5.4, 5.7
N,N-Diethyldiethylentriamin 97%	Lancaster	5.4, 5.7
S-Methylisothioharnstoff Sulfat 98%	Aldrich	5.4
1-(2-Aminoethyl)-piperazin 99%	Aldrich	5.4, 5.7
Cyanamid	Sigma	5.4
Bis-(2-chloroethyl)-amin	Acros	5.6
Ethylendiamin 99%	Acros	5.6
Diethylamin $\geq$ 99%	Fluka	5.6
Dimethylamin-Lösung 40proz. in Wasser, 33proz. in Ethanol	Fluka	5.6
Stickstoffmonoxid 2.5 (Reinheit 99.5%)	Messer-Griesheim	5.7, 5.9
<i>N,N'</i> -Diisopropylethylendiamin	Aldrich	5.7
<i>N,N'</i> -Di- <i>tert.</i> -butylethyleniamin 98%	Aldrich	5.7
3-(2-Aminoethylamino)-propylamin 97%	Aldrich	5.7
Piperazin	Merck	5.7
Natriumhydroxid	Friedel-de-Haën	5.7, 5.8
Kaliumdihydrogenphosphat	Friedel-de-Haën	5.7, 5.8
Di-Natriumhydrogenphosphat	Friedel-de-Haën	5.7, 5.8

---

Citronensäure	Fluka	5.8
Natriumacetat	Aldrich	5.8
Poly-(vinylsulfonsäure Natriumsalz), 25proz. in Wasser, tech.	Aldrich	5.8
Poly-(acrylsäure Natriumsalz)	Aldrich	5.8
Chondroitin-4-sulfat als Natriumsalz	Fluka	5.8
Chondroitin-6-sulfat als Natriumsalz	Fluka	5.8
Pluronic F 127	Molecular Probes	5.9
Ascorbinsäure $\geq 99.5\%$	Fluka	5.9
Glutathion	Sigma	5.9

---

### 5.3 Trocknung der Lösungsmittel

Sämtliche Lösungsmittel wurden nach dem Trocknen über Molekularsieb unter Schutzgas aufbewahrt.

*Acetonitril* wurde über Molekularsieb 3 Å vorgetrocknet und anschließend in einen ausgeheizten mit Molekularsieb 3 Å befüllten Kolben überdestilliert.

*Ethanol* wurde zuerst mit Calciumoxid vorgetrocknet, danach wurde das Lösungsmittel mit metallischem Natrium (7.0 g/L) und Phthalsäurediethylester (27.5 g/L) versetzt, zwei Stunden erhitzt und anschließend auf Molekularsieb 3 Å destilliert.

*Methanol* wurde durch Erhitzen in Gegenwart von Magnesiumspänen (5.0 g/L) getrocknet. Nach Abklingen der Reaktion wurde noch 2 - 3 Stunden unter Rückfluss gekocht und anschließend auf Molekularsieb 3 Å überdestilliert.

*Toluol*, *THF* und *Diethylether* wurden in Gegenwart von Natrium zum Sieden erhitzt, bis sich aus dem zugesetzten Indikator *p*-Phenylbenzophenon das blau-violett-farbige Ketylradikalanion gebildet hatte. Danach erfolgte die Destillation in einen ausgeheiztem unter Schutzgas stehenden Kolben.

Die deuterierten Lösungsmittel wurden mit ausgeheiztem Molekularsieb 3 Å getrocknet.

*Phosphatpuffer* ( $pH = 7.4$ )<sup>[142]</sup> wurde aus 50.0 mL einer 0.1 M  $KH_2PO_4$ -Lösung und 39.1 mL einer 0.1 M NaOH-Lösung hergestellt. Die Lösung wurde entgast bzw. mit Argon 45 min lang gespült. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters überprüft.

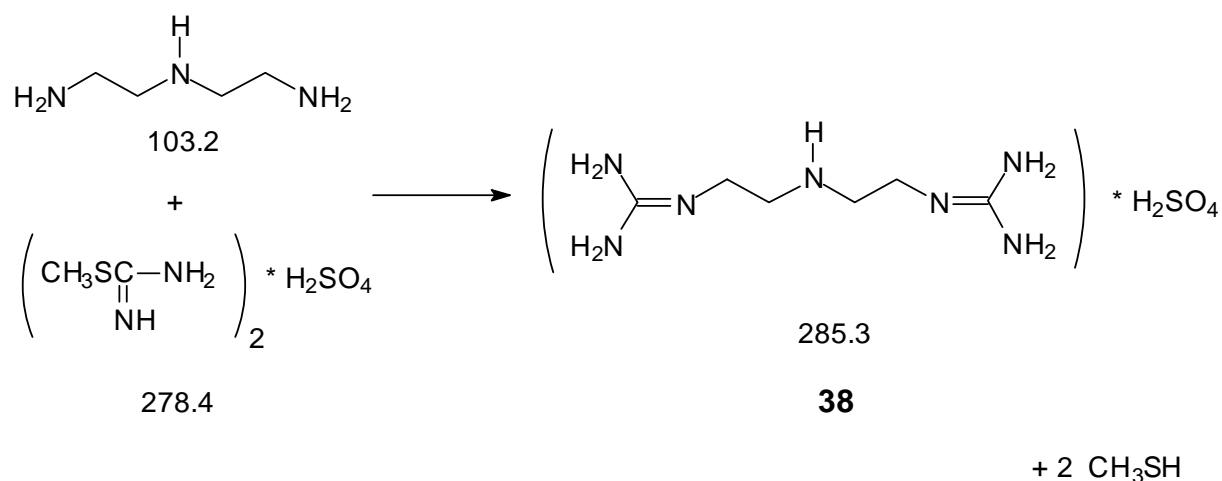
## 5.4 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Guanidinverbindungen

Das gereinigte Amin wird mit Methanol im Verhältnis Amin:MeOH = 1:2 versetzt. Die entsprechende Menge an *S*-Methylisothioharnstoffsulfat wird mit Wasser (23 g in 100 mL Wasser) versetzt. Als Vorlage dient in den meisten Fällen die Harnstoff-Lösung. Die Reaktionsmischung wird mit einem leisen Ar-Strom durchspült. Das entstehende Methyl-Mercaptan wird in einer Reihe von aufeinander geschalteten Gaswaschflaschen aufgefangen. Die Gaswaschflaschen sind zu 60 % mit einer ges.  $\text{KMnO}_4$ -Lösung mit Bodensatz gefüllt. Man muss mehrmals die Flaschen wechseln, da eine massive Braunsteinbildung während der Reaktion zu beobachten ist.

Die Umsetzungen dauern in der Regel 12 bis 18 h und man kann das Ende der Reaktion erkennen, wenn kein Braunstein mehr gebildet wird. Um restliches Gas (Methyl-Mercaptan) entfernen zu können, kann man die Apparatur einem sanften Unterdruck von 700 bis 800 hPa unterwerfen. Sollte ein farbloser Niederschlag ausgefallen sein, so ist dieser mit Hilfe einer Umkehrfritte abzufiltrieren. Der Niederschlag wird ein Mal mit kaltem Wasser und drei bis vier Mal mit 30-50 mL Methanol gewaschen. Die Mutterlauge wird am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 15 hPa und einer Badtemperatur von 35 °C vom Lösungsmittel befreit. Sollte sich ein Öl gebildet haben, so ist dieses mit Methanol oder Acetonitril zu versetzen, bis sich ein Niederschlag gebildet hat.

Die Reinigung der Verbindungen erfolgt durch Umkristallisation aus einer Mischung von Methanol/Wasser bzw. Acetonitril/Methanol in unterschiedlichen Verhältnissen. Die Trocknung der Verbindungen erfolgt mit Hilfe von Phosphor-pentoxid als Trockenmittel und an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 10 – 50 Pa und bei Raumtemperatur. Die Sulfatsalze werden in einem Schlenck oder Stickstoffkolben und unter Ar aufbewahrt.

### 5.4.1 Darstellung von Bis-(2-guanidiniummethyl)aminsulfat **38**



16.0 g (0.16 mol) Diethylentriamin (DETA) wurden in 40 mL Methanol gelöst und zu einer Suspension aus 43.0 g (0.15 mol) S-Methylisothioharnstoff-sulfat in 200 mL Wasser gegeben. Nach 120 min entstand aus der zunächst klaren Lösung ein farbloser Niederschlag. Es wurde Argon in die Reaktionsmischung eingeleitet, um Methyl-Mercaptan ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) zu vertreiben. Das entstandene Gas wurde in eine Reihe mit Kaliumpermanganat gefüllten Gaswaschflaschen eingeleitet. Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit, mit 20 mL kaltem Wasser ein Mal gewaschen und anschließend zur Trocknung an der Öldiffusionspumpe über Phosphorpentoxid angeschlossen. Die Mutterlauge wurde am Rotationsverdampfer schonend (d.h. bei max. 30 °C Badtemperatur) eingeeengt, dabei beobachtet man weitere Niederschlagsbildung, die analog zum ersten Niederschlag verarbeitet wurde.

Rohausbeute: 43.2 g **38** (0.15 mol, 98 %).

#### Umkristallisation

835 mg (2.93 mmol) des Bisguanidiniumsalzes wurden aus einer Wasser/Methanol-Mischung (20 mL : 15 mL) umkristallisiert. Beim Erkalten bilden

sich farblose Nadeln. Die Trocknung erfolgte an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 0.8 – 1 hPa, Raumtemperatur und über Phosphorpentoxid.

Ausbeute: 810 mg **38** (2.84 mmol, 97 %, Lit.<sup>[88]</sup> 87 %).

Elementaranalyse: C<sub>6</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (285.32)

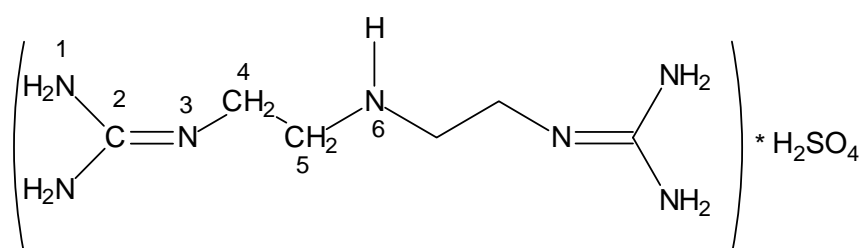
ber. C 25.25 H 6.71 N 34.37

gef. C 25.29 H 6.65 N 33.14

Schmp. : 150 °C (Zers.)

Die Banden, die das IR-Spektrum zeigt, wurden mit Hilfe der in der Literatur<sup>[95-98, 143]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet.

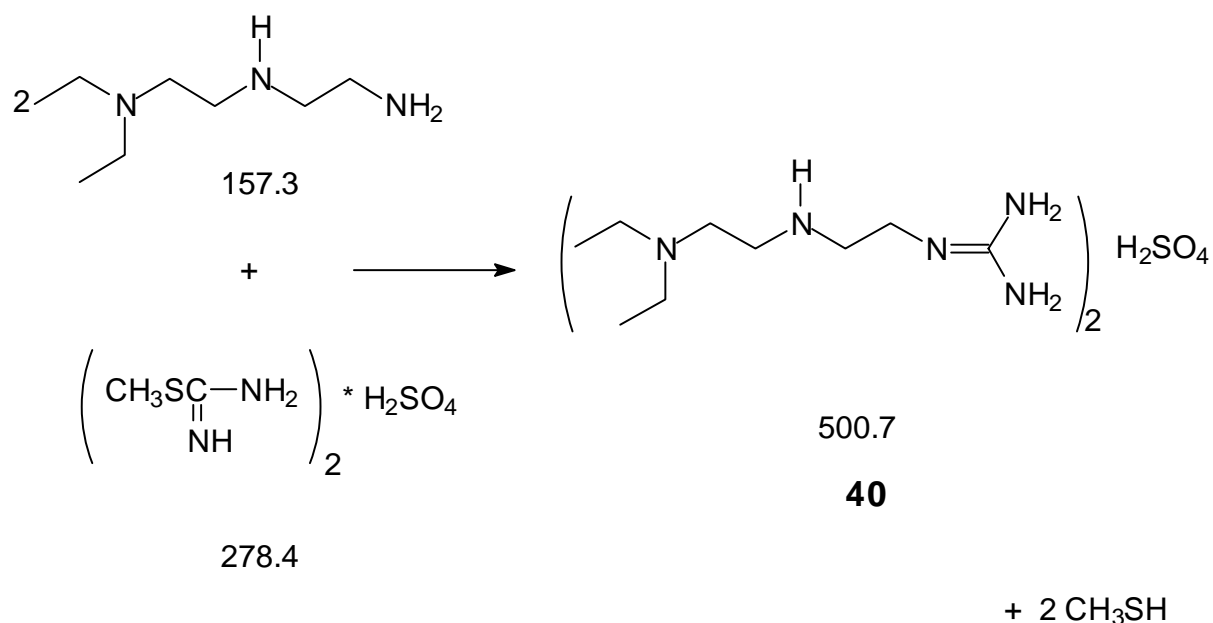
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3540 - 3159  $\nu$ (NH), 2950 - 2850  $\nu$ (R<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>),  $\nu$ (=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>),  $\nu$ (CH<sub>2</sub>, -N-CH<sub>2</sub>), 1650-1640  $\nu$ (C=N),  $\delta$ (C-N-H),  $\delta$ (R<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1460 - 1450  $\nu$ (C=N),  $\delta$ (CH<sub>2</sub>), 1110  $\nu$ (C-N),  $\varphi$ (NH<sub>2</sub>), Sulfat-Anion.



<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 2.68 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 4 H, H-5), 3.19 (t, <sup>3</sup>J = 5.9 Hz, 4 H, H-4).

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta$  = 40.59 (2 C, C-5), 46.55 (2 C, C-4), 157.05 (2 C, C-2).

### 5.4.2 Umsetzung von *N,N*-Diethyldiethylentriamin mit *S*-Methylisothioharnstoffsulfat zu 2-(2-Diethylaminoethylamino)-guanidiniumsulfat **40**



19.9 g (125 mmol) *N,N*-Diethyldiethylentriamin wurden mit 27 mL Methanol versetzt. Eine Lösung bestehend aus 17.4 g (62.4 mmol) *S*-Methylisothioharnstoffsulfat in 80 mL Wasser wurde innerhalb von 60 min dazu getropft. Es entstand eine klare sehr schwach braune Lösung. Beim Einengen der Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 90 – 100 hPa kam es zur Bildung eines farblosen Niederschlages. Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge getrennt, ein Mal mit 10 mL Wasser und zwei Mal mit 10 mL Acetonitril gewaschen. Zur Trocknung wurde die Umkehrfritte an der Öldiffusionspumpe 24 h bei einem Druck von 0.8 – 1 hPa angeschlossen. Die Mutterlauge wurde um 50 % eingengt. Bei der Zugabe von Acetonitril zu der Mutterlauge beobachtete man nach einer anfänglichen Trübung eine Niederschlagsbildung. NMR-Spektren beider Niederschläge, die am 200 MHz-Gerät aufgenommen wurden, zeigten identische Signale, so dass beide Substanzen vereinigt werden konnten.

Rohausbeute: 29.7 g **40** (59.3 mmol, 95 %).

Die Reinigung erfolgte, in dem man das Rohprodukt in der Siedehitze in ca. 50 mL Ethanol löste, es wurde anschließend so viel Acetonitril ( $\sim 70$  mL) zugesetzt, bis eine bleibende Trübung zu beobachten war. Beim Erkalten fällt ein voluminöser, farbloser Niederschlag aus. Dieser wird mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit und drei Mal mit 25 – 30 mL kaltem Acetonitril gewaschen. Zur Trocknung wurde die Substanz an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur, über Phosphorpentoxid, und einem Druck von 80 – 90 Pa 72 h angeschlossen.

Reinausbeute: 28.7 g **40** (57.3 mmol, 92 %).

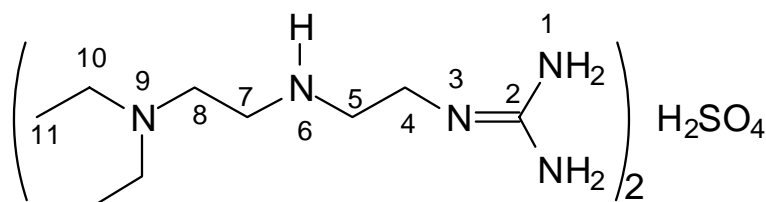
Elementaranalyse:  $C_{18}H_{46}N_{10} \cdot H_2SO_4$  (500.71)

ber. C 43.18 H 9.66 N 27.97

gef. C 42.92 H 9.54 N 27.52

Die Banden, die das IR-Spektrum zeigt, wurden mit Hilfe der in der Literatur<sup>[95-98, 143]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3330 - 3150  $\nu(NH)$ , 2970  $\nu(R_2NH_2^+)$ ,  $\nu(=NH_2^+)$ ,  $\nu(CH_2, -N-CH_2)$ , 1670  $\nu(C=N)$ ,  $\delta(C-N-H)$ ,  $\delta(R_2-NH_2^+)$ , 1470  $\nu(C=N)$ ,  $\delta(CH_2)$ , 1120  $\nu(C-N)$ ,  $\varphi(NH_2)$ , Sulfat-Anion.



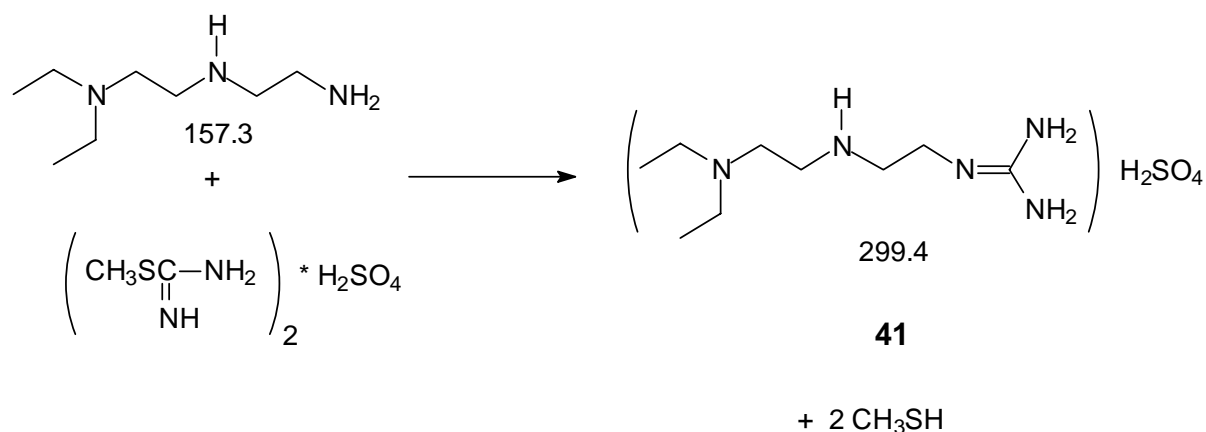
Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von H-H- und C-H-Korrelationen.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 0.97$  (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 6 H, H-11), 2.50 (quartett,  $^3J = 7.2$  Hz, 4 H, H-10), 2.54 (t, 2 H, H-8), 2.66 (t, 2 H, H-7), 2.74 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-5), 3.26 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-4)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 12.8$  (2 C, C-11), 43.4 (C-4), 47.9 (C-7), 49.4 (2 C, C-10), 49.6 (C-5), 53.6 (C-8) 159.8 (C-2)

$^{15}\text{N-NMR}$  (3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $[\text{D}_6]$ -DMSO = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -350.02$  (N-6), -336.54 (N-9), -310.82 (N-1), -301.14 (N-3)

### 5.4.3 Umsetzung von *N,N*-Diethyldiethylentriamin mit *S*-Methylisothioharnstoffsulfat und 1 Äq. Schwefelsäure 41



21.3 g (130 mmol) *N,N*-Diethyldiethylentriamin wurden mit 20 mL Methanol versetzt. Eine Lösung bestehend aus 18.0 g (64.7 mmol) *S*-Methylisothioharnstoffsulfat in 95 mL Wasser wurde innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur dazu getropft. In Gegensatz zu den anderen Synthesen wurde in diesem Fall keine Niederschlagsbildung beobachtet. Zu der Reaktionsmischung wurde 3.40 mL (64 mmol, 96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) Schwefelsäure in 5 mL Wasser zugegeben. Es entsteht eine gelbe Lösung.

Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und einem Druck von 50 – 60 hPa entsteht ein gelbes Öl. Das Öl wurde nach verschiedenen Weisen verarbeitet, so wurde es zum Beispiel mit Isopropanol versetzt, *n*-Heptan wurde dazu gegeben, dabei trat eine Trübung ein, die allerdings über Nacht wieder verschwand.

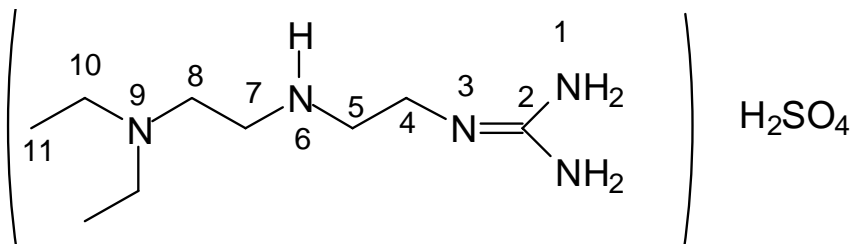
Das Öl wurde bis zur Trockne an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 0.8 – 1 hPa angeschlossen. Es bildete sich ein gelb-bräunlicher Feststoff. Der Feststoff wurde mit Acetonitril gewaschen, dabei wurde er farblos. Anschließend wurde er unter gleichen Bedingungen über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Nach der Analytik ist, in diesem Fall, das zweifach protonierte Sulfatsalz entstanden.

Ausbeute: 10.5 g **41** (35.1 mmol, 54 %).

Elementaranalyse:  $C_9H_{23}N_5 \cdot H_2SO_4$  (299.39)

ber. C 36.11 H 8.42 N 23.29

gef. C 36.31 H 8.50 N 21.92

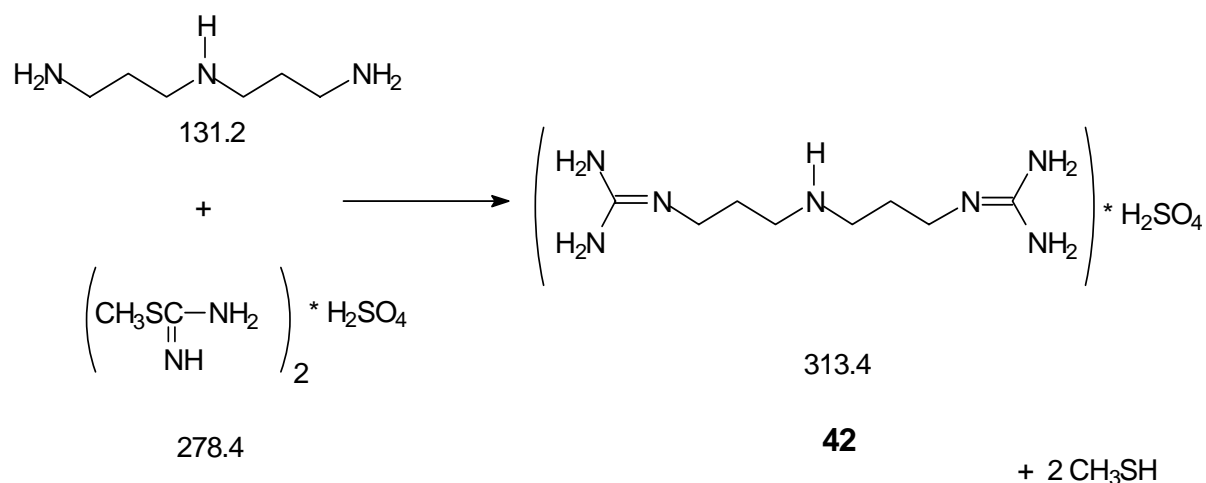


Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von H-H- und C-H-Korrelationen.

$^1H$ -NMR ( $D_2O$ , 500 MHz):  $\delta = 1.25$  (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 6 H, H-11), 2.81 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2 H, H-5), 2.94 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2 H, H-7), 3.16 – 3.20 (m, 6 H, H-8 H-10), 3.30 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2 H, H-4)

$^{13}C$ -NMR ( $D_2O$ , 125 MHz):  $\delta = 10.9$  (2 C, C-11), 43.3 (C-4), 45.2 (C-7), 49.5 (C-5), 50.3 (2 C, C-10), 53.3 (C-8) 159.8 (C-2)

#### 5.4.4 Umsetzung von Bis-(3-aminopropyl)-amin mit S-Methylisothioharnstoffsulfat 42

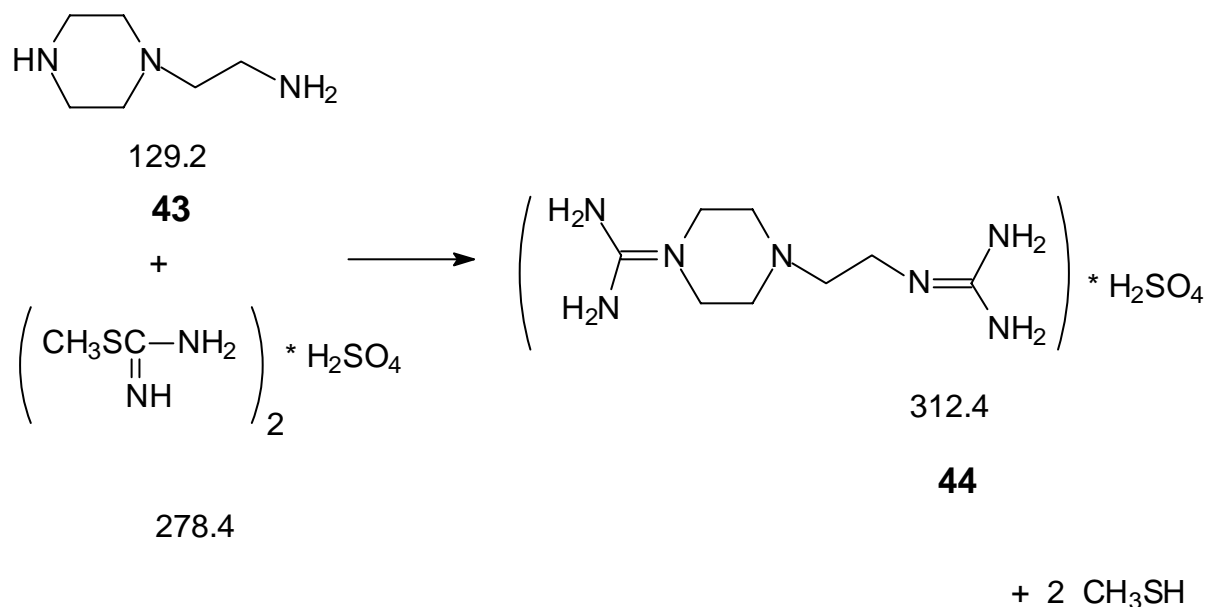


52.4 g (185 mmol) S-Methylisothioharnstoffsulfat wurden mit 280 mL Wasser versetzt. 24.2 g (185 mmol) Bis-(3-aminopropyl)-amin wurden mit 33 mL Methanol p.a. versetzt und in einen Tropftrichter gegeben. Die Mischung wurde langsam innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur zugetropft. Nach 120 min beobachtete man die Bildung eines farblosen Niederschlages. Die Umsetzung erfolgte nach der allg. Vorschrift zur Darstellung von Guanidinen. Nach 72 h unterbrach man die Reaktion. Ein milchiger, farbloser Niederschlag war entstanden.

Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte vom Lösungsmittel befreit, ein Mal mit 50 mL Acetonitril und ein weiteres Mal mit 50 mL Methanol gewaschen. Dabei beobachtete man eine Trübung im Auffangkolben. Diese Lösung wurde erneut mit 50 mL Acetonitril versetzt und der gebildete Niederschlag erneut durch die Fritte gegeben. Dieser wurde noch drei Mal mit 50 mL Acetonitril gewaschen und anschließend an die Öldiffusionspumpe bei 0.8 – 1.0 hPa 24 h angeschlossen. Zur besseren Trocknung wurde die Substanz über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 48 h getrocknet.



### 5.4.5 Umsetzung von 1-(2-Aminoethyl)piperazin mit S-Methylisothioharnstoffsulfat **44**



28.3 g (102 mmol) S-Methylisothioharnstoffsulfat wurden in 150 mL Wasser suspendiert und mit Eiswasser gekühlt gehalten. 27.0 g (209 mmol) 1-(2-Aminoethyl)piperazin wurden mit 40 mL Ethanol versetzt und der Vorlage langsam zugetropft, es wurde weiterhin gekühlt. Es wurde über Nacht gerührt, dabei entstand ein milchiger Niederschlag, der schwer durch die Umkehrfritte ging. Der Niederschlag wurde drei Mal mit 25 mL kaltem Wasser und anschließend zwei Mal mit 20 mL kaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Trocknung über Phosphorpentoxid mit Hilfe einer Öldiffusionspumpe 48 h bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa.

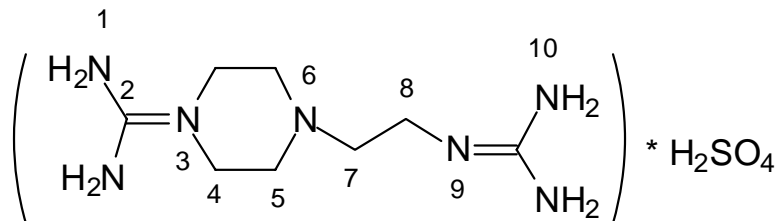
Die Charakterisierung der Substanz erfolgte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Elementaranalyse. Von den zwei denkbaren Produkten hat sich das Bisguanidiumsulfat offenbar gebildet. Da es hier kein sekundäres Stickstoffatom zur Verfügung steht, wurde die Freisetzung nicht versucht.

Ausbeute: 25.1 g **44** (80.4 mmol, 79 %).

Elementaranalyse: C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S (312.37)

ber.: C 30.76      H 7.10      S 10.27

gef.: C 30.65      H 6.84      S 10.39

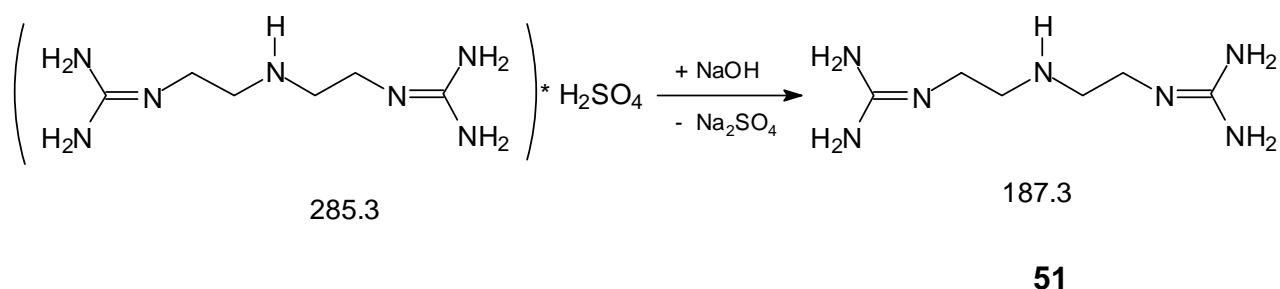


<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 2.64 (t, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 4 H, H-5), 2.67 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2 H, H-7), 3.36 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2 H, H-2), 3.48 (t, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, 4 H, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta$  = 40.9 (C-8), 47.4 (2 C, C-4), 53.9 (2 C, C-5), 58.1 (C-7), 159.1 (C-10), 159.8 (C-2)

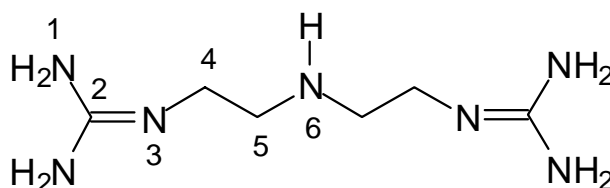
## 5.5 Freisetzung der Guanidine

### 5.5.1 Freisetzung von Bis-(2-guanidinethyl)-amin 51



8.52 g (28.1 mmol) des Guanidinsulfats **38** wurden in 150 mL Acetonitril aufgeschlämmt. 2.26 g (56.5 mmol) NaOH wurden in 450 mL Alkohol gelöst und innerhalb von 90 min der Suspension zugetropft. Es entstand zunächst eine trübe Lösung. Es wurde weitere 60 min gerührt und anschließend 30 min stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung mit Hilfe einer Umkehrfritte vom gebildeten farblosen Niederschlag (Natriumsulfat) abgetrennt und danach am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und einem Druck von 50 - 60 hPa zu 80 Vol.-% von Lösungsmittel befreit. Es entstand eine klare Flüssigkeit, deren Gehalt an freiem Guanidin mit Hilfe von quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen mit 1,4-Dioxan als externem Standard bestimmt wurde.

Ausbeute: 5.17 g **51** (27.6 mmol, 98 %).



$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 2.44$  (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 4 H, H-5),  $2.90$  (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 4 H, H-4).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 43.80$  (2 C, C-5), 50.44 (2 C, C-4), 162.26 (2 C, C-2).

Die quantitativen NMR-Analysen deuten auf die Bildung des freien Guanidins und nicht, wie es denkbar wäre, auf die Bildung des Guanidiniumhydroxids. Um diesen Befund zu untermauern, isolierte man das freie Guanidin.

1.5 mL (1.63 g) einer Lösung bestehend aus 146 mg (0.78 mmol) freiem Guanidin in Isopropanol wurden mit insgesamt 5.0 mL Methanol versetzt. 50 mL Acetonitril wurden langsam dazu gegeben, Bei der Zugabe beobachtete man eine Trübung bis eine milchige Lösung entstand. Aus der Lösung bildeten sich innerhalb 1 h kleine Kristalle. Nach 48 h wurde die überstehende Lösung abgetrennt und die Kristalle wurden zur Trocknung an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa angeschlossen.

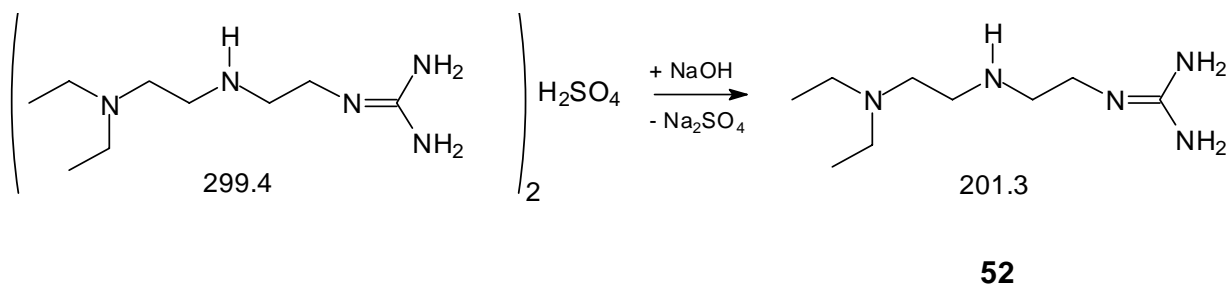
Ausbeute: 100 mg **51** (0.53 mmol, 68 %).

Elementaranalyse:  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_7$  (187.3)

ber.: C 38.49    H 9.15    N 52.36

gef.: C 38.44    H 9.20    N 51.38

### 5.5.2 Freisetzung des 2-(2-Diethylaminoethylamino)-ethylguanidins **52** aus **40**



3.20 g (6.40 mmol) des Guanidiniumsalzes **40** wurden mit 50 mL Acetonitril versetzt. 102.3 mL (12.8 mmol) einer NaOH-Lösung in Alkohol ( $c = 1.25$  g NaOH in 250 mL Isopropanol = 0.125 M) wurden langsam innerhalb 2 h zuge tropft. Es wurde anschließend noch weitere 2 h gerührt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und einem Druck von 50 – 60 hPa zu 70 Vol.-% abgezogen. Die erhaltene Suspension wurde mit 50 mL Acetonitril versetzt. Dabei konnte man die Bildung eines farblosen Niederschlages beobachten. Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte vom Lösungsmittel befreit und noch Mal mit 50 mL Acetonitril gewaschen. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer (50 – 60 hPa, 30 °C) eingeeengt. Es entstand ein gelbes Öl. Dieses Öl wurde an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von  $\sim 90$  Pa 72 h getrocknet. Das Öl wurde mit Hilfe von quantitativen  $^1\text{H-NMR}$ -Analysen mit 1,4-Dioxan als externem Standard untersucht.

Ausbeute: 2.53 g **52** (12.6 mmol, 98 %).

Das farblos bis leicht gelbliche Öl wurde 7 Tage über Phosphorpentoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa an der Öldiffusionspumpe getrocknet. Sämtliche Versuche, einen Feststoff zu isolieren, schlugen fehl. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte durch eine  $^1\text{H-NMR}$ -quantitative Analyse mit 1,4-Dioxan als externem Standard. 12.2 mg des Öls wurden mit 991.5 mg  $\text{D}_2\text{O}$

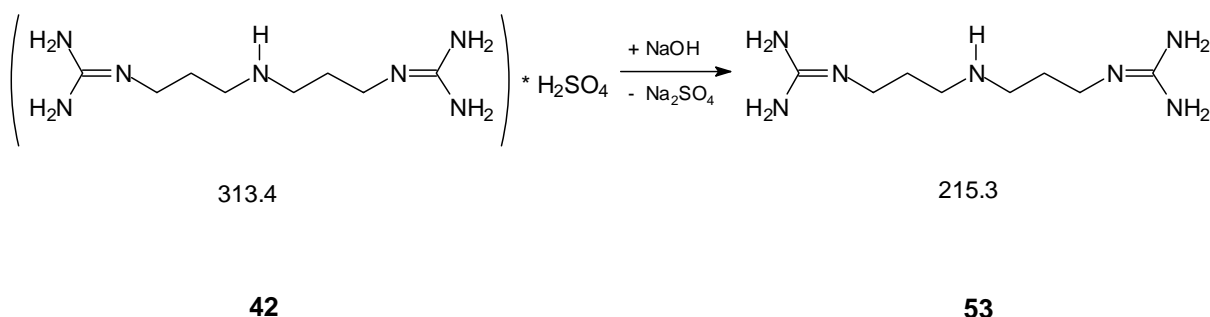
versetzt. Zu dieser Lösung wurden 12.0 mg (0.14 mmol) 1,4-Dioxan gegeben. Die Auswertung des Spektrums ergab eine Ausbeute von 99 % an freiem Guanidin.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz)  $\delta = 1.09$  (t, 6 H, H-11), 2.5 – 2.9 (m, 10 H, H-10, H-8, H-7, H-5), 3.35 (t, 2 H, H-4)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 0.83$  (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 6 H, H-11), 2.36 (quartett,  $^3J = 7.2$  Hz, 4 H, H-10), 2.40 (t, 2 H, H-8), 2.52 (t, 2 H, H-7), 2.60 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-5), 3.12 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-4)

Das Öl wurde direkt weiter mit Stickstoffmonoxid umgesetzt.

### 5.5.3 Freisetzung des Bis-(3-guanidiniumpropyl)-amins **53** aus **42**



6.00 g (19.2 mmol) des Guanidiniumsalzes wurden mit 150 mL Acetonitril versetzt. 250 mL (38.5 mmol) einer NaOH-Lösung in Isopropanol ( $c = 1.54 \text{ g NaOH in } 250 \text{ mL Isopropanol} = 0.154 \text{ M}$ , in einem Gefäß mit Bodenfritte 45 min entgast) wurden auf ein Mal dazugegeben. Bei der Zugabe beobachtete man eine Abkühlung des Systems. Nach 20 min wurde die Reaktionsmischung trüb. Es wurde über Nacht gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Lösung abgetrennt und zwei Mal mit 30 mL Acetonitril gewaschen.

Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer bei  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem Druck von 50 – 60 hPa zu 90 % abgezogen. Es entstand eine farblose ölige Substanz. Es wurde eine quantitative NMR-Analyse mit 1,4-Dioxan als externem Standard durchgeführt.

Rohausbeute: 3.57 g **53** (16.6 mmol, 86 %).

#### *Isolierung und Reinigung*

Die Lösung wurde mit Hilfe einer Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 0.8 – 1 hPa 10 h getrocknet. Als kein Lösungsmittel mehr erkennbar war wurde das klare Öl 3 Tage stehen gelassen (mit Alufolie ummantelt). Nach Ablauf dieser Zeit bildete sich ein farbloser Niederschlag und es war noch ein Rest einer Flüssigkeit zu beobachten. Zur Entfernung dieser Reste wurde der Kolben an die Öldiffusionspumpe (0.8 – 1 hPa) 48 h angeschlossen. Es entstand eine farblose feste Substanz. Die Substanz wurde mechanisch und zu

einem feinen, farblosen Pulver zerkleinert. Zur endgültigen Trocknung wurde die Substanz noch 10 h an der Öldiffusionspumpe bei 0.8 – 1.0 hPa angeschlossen.

Reinausbeute: 3.47 g **53** (16.1 mmol, 84 %).

## 2. Ansatz

4.55 g (14.5 mmol) des Guanidinsulfats wurden mit 150 mL Acetonitril versetzt. 250 mL (29.0 mmol) einer NaOH-Lösung in Isopropanol ( $c = 1.16 \text{ g in } 250 \text{ mL Isopropanol} = 0.12 \text{ M}$ ) wurden innerhalb von 30 min zugegeben. Bei der Zugabe beobachtete man ebenfalls eine Abkühlung und Trübung des Systems. Es wurde über Nacht gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit bildete sich ein farbloser Niederschlag, der mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Lösung befreit und zwei Mal mit 30 mL Acetonitril gewaschen wurde. Die klare Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 35 °C und einem Druck von 50 – 60 hPa auf ca. 10 % eingengt. Das erhaltene Öl wurde zur Trocknung an der Öldiffusionspumpe (~ 90 Pa, Raumtemperatur) 3 Tage angeschlossen. Nach Ablauf dieser Zeit bildete sich eine farblose feste Substanz, die mechanisch zu einem feinen Pulver bearbeitet wurde.

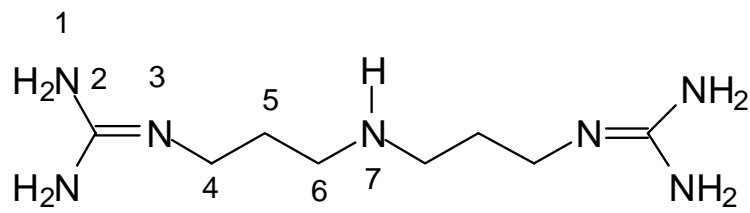
Ausbeute: 3.05 g **53** (14.2 mmol, 98 %).

Elementaranalyse:  $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_7$  (215.30)

ber.: C 44.63    H 9.83    N 45.54

gef.: C 44.79    H 9.75    N 45.41

Schmp.: 118 °C

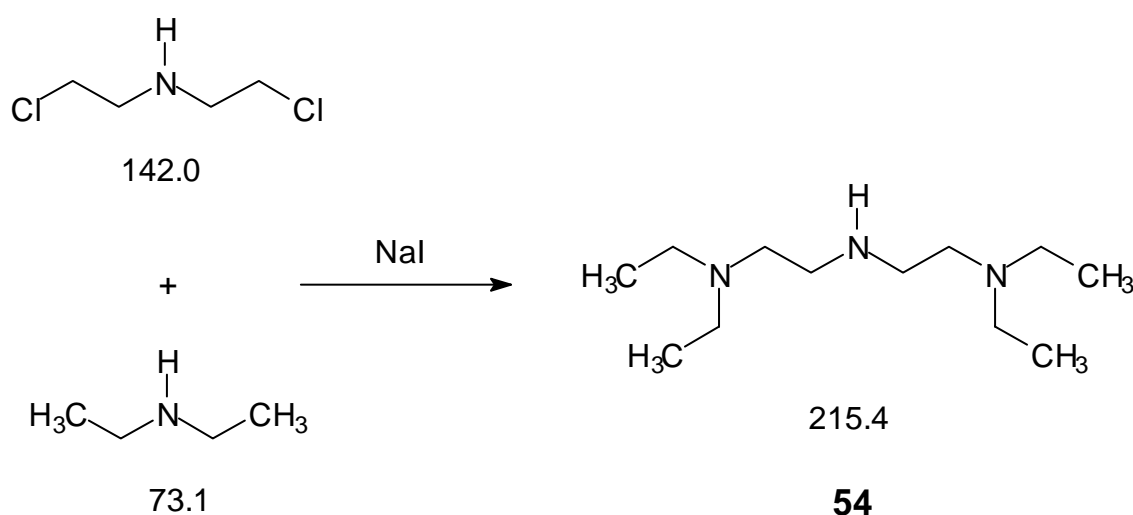


<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta = 1.33$  (quintett,  $^3J = 7.2$  Hz, 4 H, H-5), 2.23 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 4 H, H-6), 2.73 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 4 H, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta = 26.5$  (2 C, C-5), 39.6 (2 C, C-6), 46.1 (2 C, C-4), 159.5 (2 C, C-2)

## 5.6 Andere Amin-Synthesen

### 5.6.1 Synthese von Bis-(2-diethylaminoethyl)-amin **54**



116.7 g (1.60 mol) des Diethylamins wurden in einen 500 mL Zweihals-Kolben vorgelegt. 43.8 g (245 mmol) Bis-(chloroethyl)-amin Hydrochlorid wurden in 100 mL Wasser gelöst und dem Amin innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur zugetropft. Anfangs beobachtete man eine Trübung mit anschließender Niederschlagsbildung, die aber bei weiterer Zugabe des Chlorids wieder verschwand. Bei einer weiteren Zugabe von 30 mL Wasser entstand eine farblos bis schwach gelbe klare Lösung. Die Reaktionsmischung wurde zum Sieden erhitzt (Badtemp. 140 °C) dabei färbte sich die Lösung gelb. Eine Spatelspitze NaI wurde in 5 mL Wasser gelöst und durch den Intensivkühler der Mischung zugefügt. Die Lösung wurde weitere 6 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt.

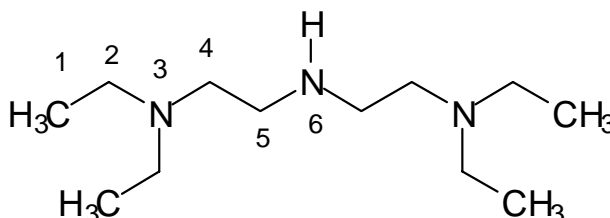
Die Reaktionsmischung wurde nach dem Erkalten vorsichtig mit 100 mL einer 50proz. KOH-Lösung versetzt, darauf folgend wurden noch 200 mL einer 10proz. KOH-Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt. Es bildeten sich zwei Phasen. Zur vollständigen Bildung der freien Amine wurden noch 50 g fein zermörstertes KOH zugegeben. Die obere Phase ist klar und gelb gefärbt und die untere fast braun gefärbt.

Die obere Phase wurde abgetrennt und die untere wässrige Phase mit Diethylether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde noch mal mit 20 mL einer

ges. KOH-Lösung versetzt und mit je 50 mL Diethylether drei Mal gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 600 hPa und Raumtemperatur eingengt. Der verbliebene gelbfarbene Rest wurde in einen Stickstoffkolben überführt und mit fein zerriebenem KOH zur Trocknung versetzt. Alle weiteren Schritte wurden dann unter Argon durchgeführt. Überschüssiges Diethylamin wurde abdestilliert und das Produkt fraktionierend mit Hilfe einer Vigreuxkolonne schonend (langsame Temperaturerhöhung, feines Destillieren) destilliert. Das Amin wird unter Schutzgas und im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Nach gaschromatographischer Analyse (Säule: BPX35, Länge = 30 m, Durchmesser = 0.22 mm, Filmdicke = 0.25 µm) betrug die Reinheit bezogen auf die Flächenprozentage 99.9 %.

Ausbeute: 18.04 g **54** (83.8 mmol, 34 %, Lit.<sup>[117, 118]</sup> 34 %).

Sdp.: 122 - 125 °C/17 hPa, Lit.<sup>[117]</sup> 120 °C/10 mm Hg

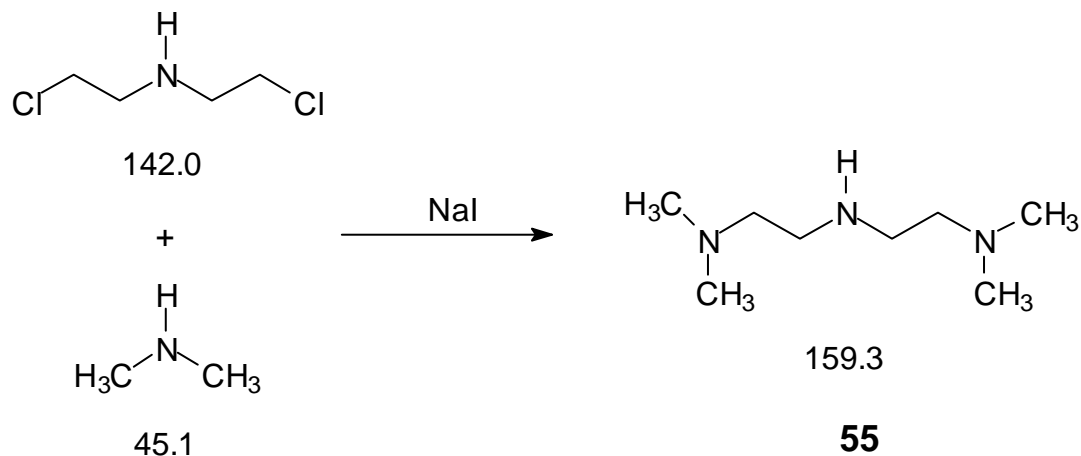


<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 0.91 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 12 H, H-1), 2.40 – 2.47 (m, 12 H, H-2, H-4), 2.58 (t, AA'BB', 4 H, H-5)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz): δ = 10.3 (4 C, C-1), 45.5 (2 C, C-5), 46.7 (4 C, C-2), 50.9 (2 C, C-4)

<sup>15</sup>N-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, Standard: extern 90 % Formamid in [D<sub>6</sub>]-DMSO = - 267.6 ppm, 50.7 MHz): δ = -343.5 (N-6), -336.7 (N-3)

### 5.6.2 Synthese von Bis-(2-dimethylaminoethyl)-amin **55**



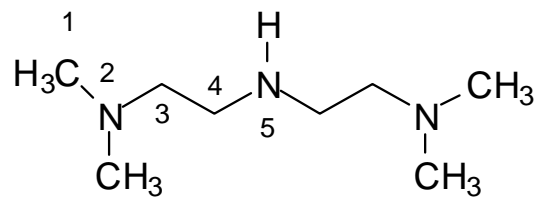
34.0 g (0.24 mol) Bis-(2-chlorethyl)-amin wurden zu einer Vorlage, bestehend aus 500 mL (2.0 mol) einer 22proz. Dimethylamin-Lösung getropft. Eine Spatelspitze (0.5 g) NaI wurde in 5 mL Wasser gelöst und ebenfalls der Reaktionsmischung zugegeben. Es wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt und anschl. 6h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Ablauf dieser Zeit bildete sich eine klare gelbe Lösung. Die Reaktionsmischung wurde nach dem Erkalten vorsichtig mit 100 mL einer 50proz. wässrigen KOH-Lösung versetzt. Danach wurden noch 100 g fein gemörserteres, festes KOH hinzugefügt. Es entstanden zwei Phasen. Die obere Phase wurde abgetrennt und die untere wässrige Phase mit zus. 50 g festem KOH versetzt und anschließend drei Mal mit je 200 mL Diethylether extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe von fein gemörserterem KOH über Nacht getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 700 – 800 hPa und 30 °C Badtemperatur abgezogen. Der verbleibende Rest wurde in einen Stickstoffkolben überführt und nochmals mit KOH-Pulver versetzt. Eine fraktionierende Destillation lieferte dann das gewünschte Produkt. Das Produkt ist eine klare, farblose Flüssigkeit, die in einem Stickstoffkolben, unter Argon im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Ausbeute: 10.6 g **55** (66.7 mmol, 35 %, Lit.<sup>[119]</sup> 21 %)

Sdp.: 85 – 86 °C/20 hPa, Lit.<sup>[144]</sup> 198 °C/760 mm Hg

Nach gaschromatographischer Analyse betrug die Reinheit des Produktes 99.9 % bezogen auf die Flächenprozent.



<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 2.06 (s, 12 H, H-1), 2.31 (t, AA'BB', 4 H, H-3), 2.55 (t, AA'BB', 4 H, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta$  = 46.9 (4 C, C-1), 48.5 (2 C, C-3), 60.1 (2 C, C-4)

## 5.7 Allgemeine Vorschrift für Autoklavenversuche zur NONOat-Synthese

Die Ausgangsamine müssen unbedingt vor ihrem Einsatz gereinigt werden. Lösungsmittel müssen trocken sein. Im Gegensatz zu der Literatur,<sup>[49, 51-53, 57, 60, 62]</sup> bei der in der Regel 1 bis 2 g der Verbindung in 50-60 mL polarem Lösungsmittel, meistens Acetonitril, gelöst werden, wurden bei diesen Umsetzungen, 6 bis 7 g für die gleiche Menge Lösungsmittel eingesetzt, bei zum Teil löslichen festen Verbindungen wurde meistens soviel Ausgangsverbindung genommen, wie sie in 50 – 60 mL Acetonitril löslich war, bzw. es wurden 10 – 15 mL Ethanol dazugegeben.

Wichtig bei der Synthese von diesen Verbindungen ist es, soweit wie möglich unter anaeroben Bedingungen zu arbeiten. Sauerstoff wirkt sich reaktionsschädlich aus. Bei der Umsetzung muss der Druck immer wieder nachgeregelt werden, dabei soll der Druck nicht zu hoch gewählt werden, d.h. nicht höher als  $10 \cdot 10^5$  Pa, da die Gefahr besteht, dass Stickstoffmonoxid unter Disproportionierung zu  $N_2O$  und  $NO_2$  reagiert. Der optimale Druck bewegt sich zwischen  $5 - 7 \cdot 10^5$  Pa. Die Reaktionsdauer variiert zwischen 12 und 100 h, unterbrochen wird die Reaktion, wenn nach Nachregelung des Stickstoffmonoxid-Druckes, keine Drucksenkung am Manometer über mehrere Stunden zu erkennen ist.

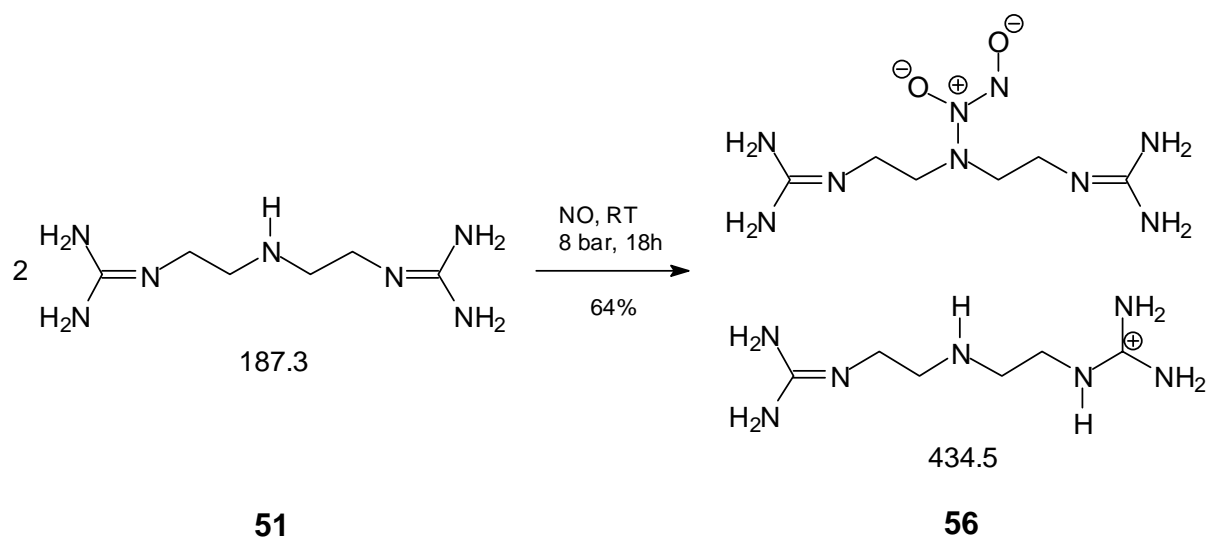
In Anhang 4 wird detailliert über den Umgang mit Autoklaven bei Umsetzungen mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur berichtet. Der gereinigte Autoklav wird mit der Reaktionslösung gefüllt und zugemacht. Als nächstes wird er an die Gasleitungen angeschlossen, er wird zuerst zwei Mal mit Stickstoff gespült ( $p = 5 - 8 \cdot 10^5$  Pa) und das dritte Mal wird der Stickstoff nicht abgeleitet sondern zur Dichtheitsprüfung im Autoklaven gelassen. Ist über einen Zeitraum von  $\sim 30$  min kein Druckabfall erkennbar, wird der Autoklav entspannt. Als nächstes wird Stickstoffmonoxid zugeführt, ist Stickstoffmonoxid-Geruch wahrnehmbar, so sollten Verschraubungen und Ventile mit Lecksuchspray überprüft und eventuell nachgezogen werden. Stickstoffmonoxid-Verbrauch ist durch Druckabfall am Autoklav-Manometer erkennbar. Durch Nachdosierung kann der gewünschte Druck wieder eingestellt werden.

Am Versuchsende wird der Stickstoffmonoxiddruck abgelassen, die Apparatur wird mit Stickstoff gespült und danach entspannt. Ein- und Ausgangsventile am Autoklaven werden geschlossen und die Gasleitungen demontiert. Die Öffnung des Autoklaven geschieht nach Möglichkeit im Abzug.

Beim Entleeren des Autoklaven sind besonders hohe Sicherheitsmaßnahmen zu treffen, da Stickstoffmonoxid frei wird. Der gebildete Niederschlag sollte rasch in einen unter Schutzgas stehenden, vorgekühlten Kolben überführt werden. Bei der Umsetzung mancher Verbindungen kann man den Niederschlag bei der Überführung verschwinden sehen. Dies deutet auf eine zu geringe Stabilität des NONOats hin. Der gebildete Niederschlag ist manchmal farblos kristallin, es wurden aber auch gelartige Verbindungen erhalten. Die Substanzen sind im Allgemeinen feuchtigkeit- und temperaturempfindlich.

Die Lagerung der Verbindungen erfolgte in geeigneten Gefäßen unter Schutzgas und bei  $-20\text{ °C}$ . Die Verbindungen lassen sich gut unter diesen Bedingungen halten.

### 5.7.1 Umsetzung von Bis-(2-guanidinethyl)-amin mit Stickstoffmonoxid in Acetonitril/Isopropanol



15.0 mL (16.3 g) einer Lösung bestehend aus 1.46 g (7.80 mmol) freiem Guanidin in Isopropanol wurden mit insgesamt 50 mL Acetonitril versetzt. Bei der Zugabe beobachtete man eine anfängliche Trübung der Lösung, die jedoch bei weiterer vorsichtiger Zugabe von Acetonitril wieder verschwand. Diese Lösung wurde nach der allgemeinen Methode bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 hPa 18 h mit Stickstoffmonoxid umgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen und der Autoklav geöffnet. Man konnte die Bildung eines schwach gelben Niederschlages feststellen. Der Ansatz wurde rasch in einen Stickstoffkolben überführt und sofort gekühlt. Die Reaktionsmischung wurde dann bis ihrer Verarbeitung im Tiefkühlfach bei -20 °C aufbewahrt.

Mit Hilfe einer Umkehrfritte konnte der Niederschlag abgetrennt werden, er wurde noch zwei Mal mit kaltem Acetonitril und ein Mal mit kaltem Ether gewaschen. Das Produkt wurde an der Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 18 h getrocknet.

Das Produkt ist ein leicht gelbliches Pulver, das sich in Kontakt mit der Luft unter Bildung eines braunen, zähen Öles zersetzt. Es wird in einem Stickstoffkolben unter Argon und im Tiefkühlfach aufbewahrt.

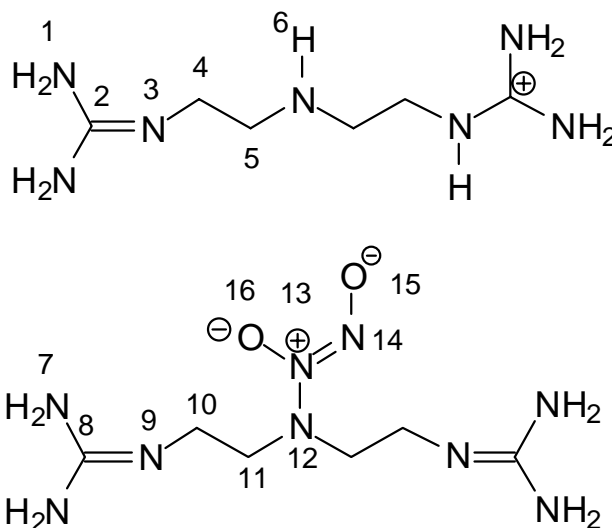
Ausbeute: 550 mg **56** (1.26 mmol, 32 %).

Elementaranalyse:  $C_{12}H_{34}N_{16}O_2$  (434.51)

ber. C 33.17 H 7.89 N 51.58

gef. C 32.44 H 7.23 N 43.66

Die Banden, die das IR-Spektrum zeigt, wurden mit Hilfe der in der Literatur<sup>[49, 52, 95-98, 143]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet.

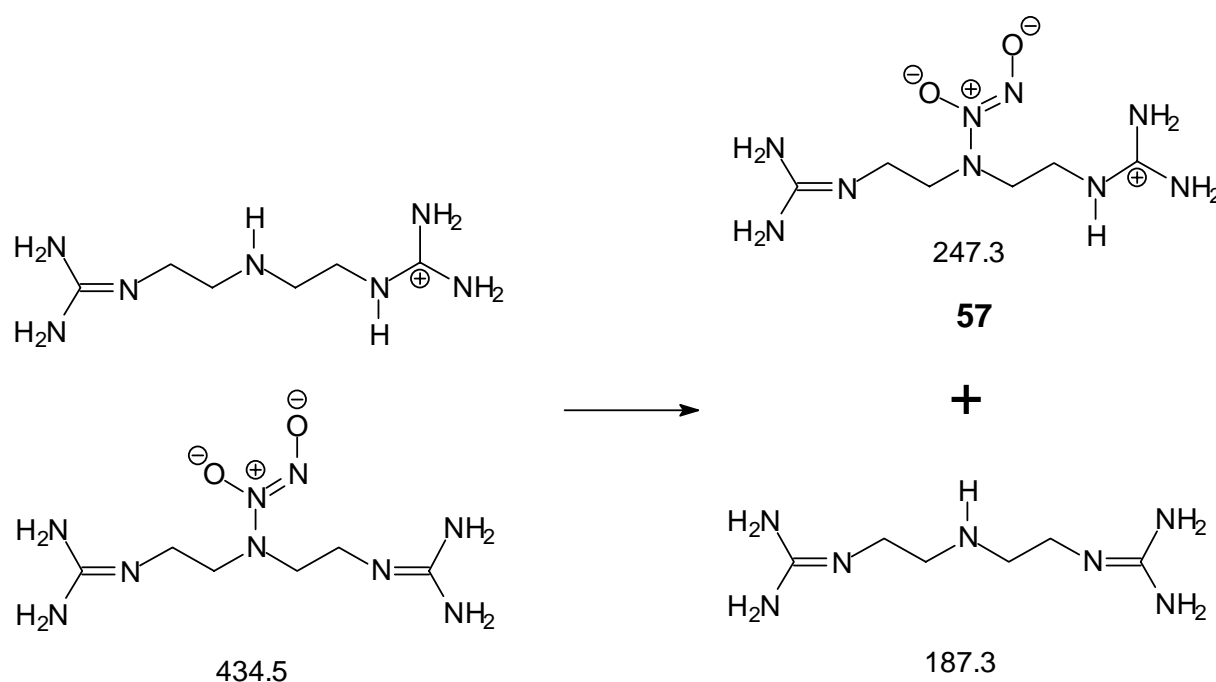


$^1\text{H-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 2.35$  (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 4 H, H-5), 2.68-2.76 (AA'BB', 8 H, H-10, H-11), 2.79 (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 4H, H-4)

$^{13}\text{C-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 38.7$  (2 C, C-10), 40.9 (2 C, C-5), 47.4 (2 C, C-4), 52.7 (2 C, C-11), 159.9 (4 C, C-2, C-8).

$^{15}\text{N}$ -NMR (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$  = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta$  = -339.6 (N-6), -293.1 (4 N, N-1, N-3, N-7, N-9), -256.9 (N-12), -69.0 (N-13), 41.3 (N-14)

### Isolierung des intramolekular stabilisierten Salzes **57**

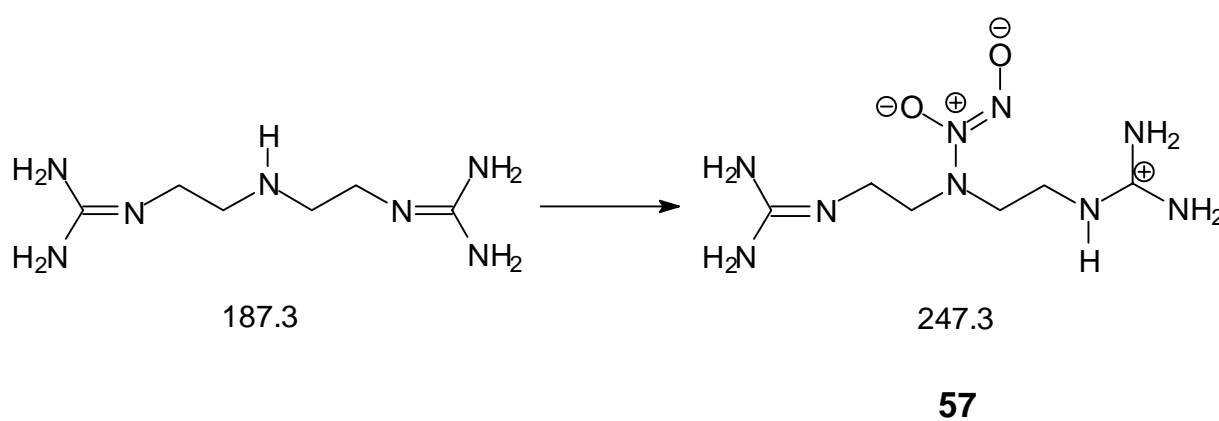


Zur Reinigung und Isolierung des intramolekular stabilisierten Salzes **57** wurden 300 mg (0.69 mmol) des Produktes **56** mit 2 mL Methanol versetzt und 30 min gerührt. Die Überstehende Lösung wurde vom Rest mit Hilfe einer Umkehrfritte getrennt und zu 20 mL Isopropanol zugetropft. Dabei bildete sich ein farbloser Niederschlag, der von der Lösung abgetrennt wurde und drei Mal 60 min bei Raumtemperatur mit je 20 mL Isopropanol digeriert und anschließend abfiltriert wurde. Der farblose Niederschlag wurde zur Trocknung an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem druck von 80 – 90 Pa 24 h angeschlossen.

Ausbeute: 120 mg **57** (0.49 mmol, 70 %).

Die Analytik dieser Verbindung wird im nächsten Abschnitt behandelt.

### 5.7.2 Umsetzung von Bis-(2-guanidinethyl)-amin mit Stickstoffmonoxid in Isopropanol



340 mg (1.82 mmol) des freien Guanidins wurden mit 75 mL Isopropanol versetzt und nach der allgemeinen Methode zur Darstellung von *N*-Diazoniumdiolaten mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von ~ 6000 hPa 96 h umgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit war keine Abnahme des NO-Druckes im Reaktor mehr beobachtbar, der Versuch wurde abgebrochen. Beim Öffnen des Autoklaven konnte man die Bildung eines schwach gelben bis farblosen Niederschlags beobachten. Dieser Niederschlag zeigte sich fein pulvrig. Die Substanz wurde in einen vorgekühlten Stickstoffkolben überführt und sofort unter Eiskühlung gehalten.

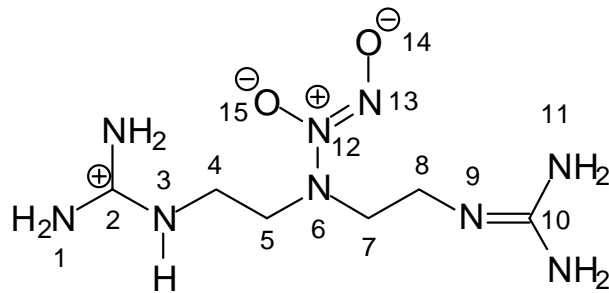
Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge getrennt und zwei Mal mit je 10 mL Isopropanol und ein Mal mit 10 mL Ether gewaschen und zur Trocknung an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 72 h angeschlossen.

Ausbeute: 353 mg **57** (1.43 mmol, 79 %).

Elementaranalyse:  $C_9H_{23}N_7O_2$  (261.3)

ber. C 29.15 H 6.82 N 51.01

gef. C 28.99 H 6.45 N 43.72

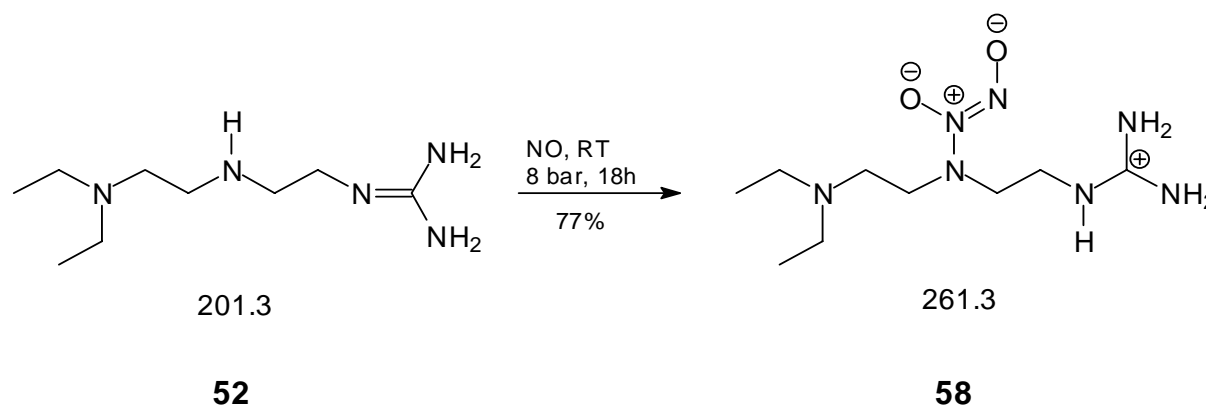


$^1\text{H-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 2.69$  (t, AA'BB', 4 H, H-5, H-7),  
2.74 (t, AA'BB', 4 H, H-4, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 41.6$  (2 C, C-5, C-7), 55.6  
(2 C, C-4, C-8), 162.7 (2 C, C-2, C-10)

$^{15}\text{N-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$   
= -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -293.1$  (6 N, N-1, N-2, N-9, N-11), -256.9 (N-6),  
-69.0 (N-12), 41.3 (N-13)

### 5.7.3 Umsetzung von 2-(2-Diethylaminoethylamino)-ethylguanidin **52** mit Stickstoffmonoxid unter Bildung von 1-[(2-Diethylaminoethyl)-(2-guanidiniummethyl)-amino]-diazen-1-ium-1,2-diolat **58**



0.67 g (3.33mmol) des freien Guanidins **52**, das als farbloses Öl vorliegt, wurden mit 65 mL Acetonitril versetzt. Es entstand eine gelbe, leicht trübe Lösung. Die Reaktionsmischung wurde nach der allg. Methode zur Darstellung von *N*-Diazoniumdiolaten mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 h Pa 18 h umgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen, es war keine Abnahme des NO-Druckes mehr beobachtbar.

Beim Öffnen des Reaktors konnte man die Bildung eines farblosen, kristallinen Niederschlages feststellen. Der Niederschlag wurde rasch in einen vorgekühlten Stickstoffkolben überführt und unter Eiskühlung aufbewahrt.

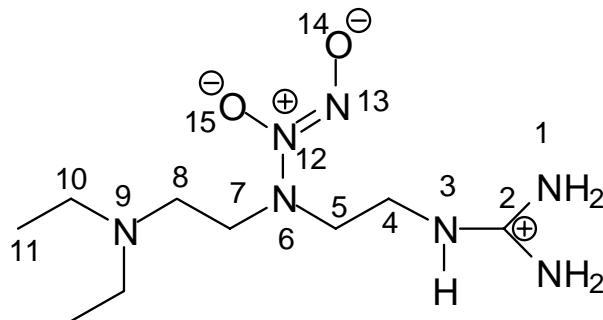
Die Substanz wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit, ein Mal mit 10 mL Isopropanol und ein Mal mit 5 mL Ether gewaschen und zur Trocknung an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 48 h angeschlossen.

Ausbeute: 660 mg **58** (2.56 mmol, 77 %).

Elementaranalyse: C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> (261.3)

ber. C 41.36 H 8.87 N 37.52

gef. C 41.58 H 8.72 N 37.18

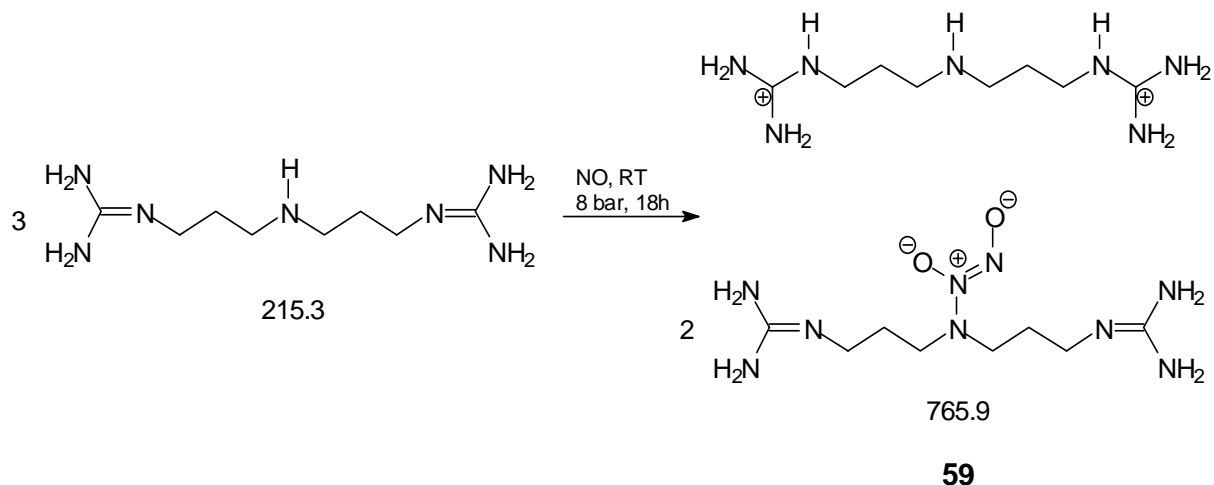


<sup>1</sup>H-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 0.92 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 6 H, H-11), 2.42 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2 H, H-8), 2.46 (quartett, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 4 H, H-10), 3.02 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2 H, H-4), 3.10 -3.13 (m, 4 H, H-5, H-7)

<sup>13</sup>C-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta$  = 13.0 (2 C, C-11), 41.2 (2 C, C-4), 49.5 (2 C, C-10), 51.0 (C-7), 53.4 (C-5), 55.1 (C-8), 160.0 (C-2).

<sup>15</sup>N-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, Standard: extern 90 % Formamid in DMSO-d<sub>6</sub> = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta$  = -339.6 (N-9), -293.1 (3 N, N-1 N-3), -256.9 (N-6), -69.0 (N-12), 41.3 (N-13)

### 5.7.4 Umsetzung von Bis-(3-guanidiniumpropyl)-amin **53** mit Stickstoffmonoxid



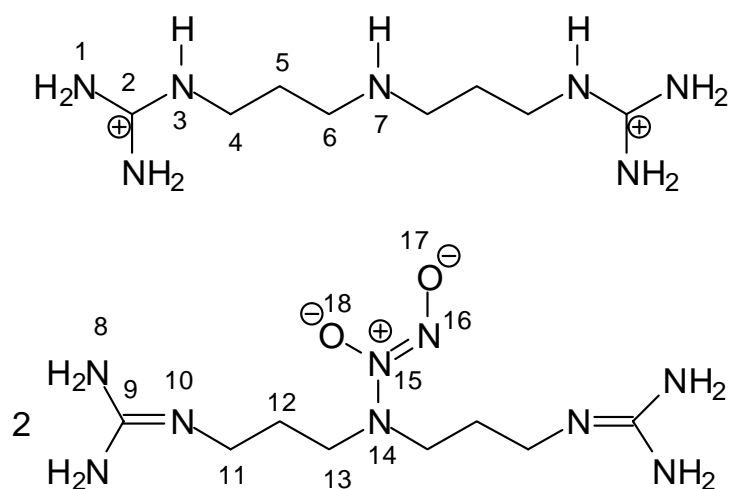
3.43 g (15.9 mmol) des freien Guanidins **53** wurden mit 50 mL Acetonitril versetzt. Dabei beobachtete man eine Trübung der Lösung. Ein farbloser Niederschlag bildete sich allmählich. Es wurden noch 5 mL Methanol dazu gegeben, bei der Zugabe wurde die Lösung wieder klar und transparent. Die Reaktionsmischung wurde noch mal mit weiteren 15 mL Acetonitril versetzt und nach der allg. Methode mit NO bei einem Druck von 6000 hPa 18 h versetzt. Folgende Abweichungen wurden getroffen: die Rührgeschwindigkeit wurde verringert, zuerst von 450 auf  $150 \text{ min}^{-1}$ , dabei wurde der Reaktor entspannt. Anschließend wurde NO noch mal gepresst und bei einer Rührgeschwindigkeit von  $90 \text{ min}^{-1}$  über Nacht gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit bildete sich ein voluminöser farbloser Niederschlag. Die Reaktionsmischung wurde in einen 250 mL Stickstoffkolben überführt und sofort gekühlt. Niederschlagsreste klebten noch an der Rührwelle des Reaktors. Diese Reste wurden ebenfalls mit Hilfe von Isopropanol und Ether isoliert, in ein Schnappdeckelglas überführt und gekühlt.

Ausbeute: 2.88 g **59** (3.76 mmol, 71 %).

Elementaranalyse:  $C_{24}H_{63}N_{25}O_4$  (765.93)

ber.: C 37.64    H 8.29    N 45.72

gef.: C 37.78    H 8.36    N 42.65

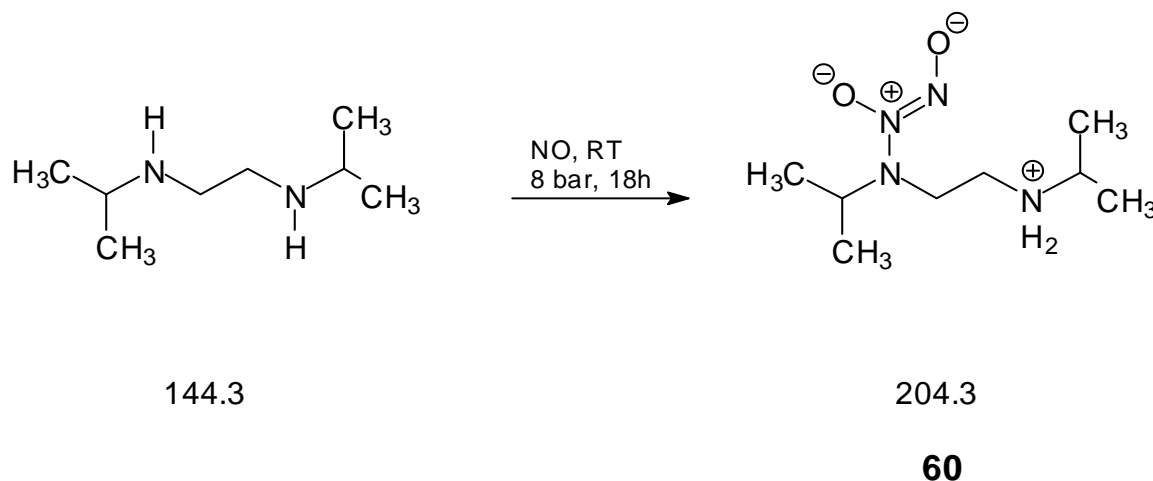


$^1\text{H-NMR}$  (3.5 M NaOD, 500 MHz):  $\delta = 1.49$ (quintett,  $^3J = 6.9$  Hz, 4 H, H-12), 1.62 (quintett,  $^3J = 7.2$  Hz, 4 H, H-5), 2.52 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2 H, H-6), 2.89 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2 H, H-13), 3.04 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2 H, H-4), 3.07 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2 H, H-11)

$^{13}\text{C-NMR}$  (3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 24.1$  (2 C, C-5), 28.6 (2 C, C-12), 39.0 (2 C, C-13), 39.5 (2 C, C-6), 46.1 (2 C, C-4), 51.3 (2 C, C-11), 160.0 (2C, C-2), 160.1 (2 C, C-9)

$^{15}\text{N-NMR}$  (3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6 = -267.6$  ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -341.0$  (N-7), -291.8 (N-1, N-3), -290.8 (N-8, N-10), -250.4 (N-14), -67.3 (N-15), 42.6 (N-16)

### 5.7.5 Umsetzung von *N,N'*-Diisopropylethylendiamin mit Stickstoffmonoxid



3.72 g (25.8 mmol) *N,N'*-Diisopropylethylendiamin wurden in 75 mL trockenem Acetonitril gelöst und nach der allg. Methode mit Stickstoffmonoxid bei einem Druck von 6000 hPa 18 h versetzt. Bei der Umsetzung wurden folgende Abweichungen getroffen: die Rührgeschwindigkeit wurde verringert zuerst von 450 auf 150 min<sup>-1</sup>, dabei wurde der Reaktor entspannt. Anschließend wurde Stickstoffmonoxid noch mal gepresst und bei einer Rührgeschwindigkeit von 90 min<sup>-1</sup> über Nacht gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde der Ansatz abgebrochen. Man beobachtet die Bildung eines feinen farblosen Niederschlages, der zum Teil an der Rührwelle haftet. Der größte Anteil wurde in einen 250 mL Stickstoffkolben überführt. Der Niederschlag, der an der Rührwelle haftet wurde mit Hilfe von Isopropanol in ein Schnapdeckelglas überführt. Beide Gefäße wurden sofort gekühlt.

Der farblose Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte vom Lösungsmittel befreit, zwei Mal mit je 20 mL Ether gewaschen und anschließend an die Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 1 hPa zur Trocknung angeschlossen.

Rohprodukt: 915 mg **60** (4.87 mmol, 19 %).

### Reinigung

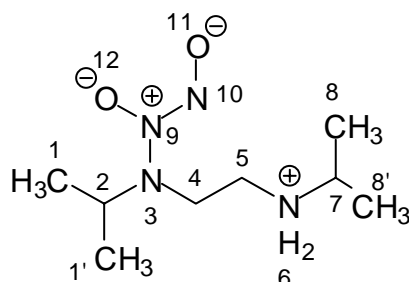
Zur Reinigung wurde das Rohprodukt zwei Mal mit je 30 mL Acetonitril 60 min lang bei Raumtemperatur digeriert, anschließend mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit, zwei Mal mit jeweils 15 mL Diethylether gewaschen und schließlich zur Trocknung an der Öldiffusionspumpe bei einem Druck von 0.8 - 1 hPa angeschlossen.

Reinausbeute: 515 mg **60** (2.52 mmol, 10 %).

Elementaranalyse: C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (204.27)

ber. C 47.04 H 9.87 N 27.43

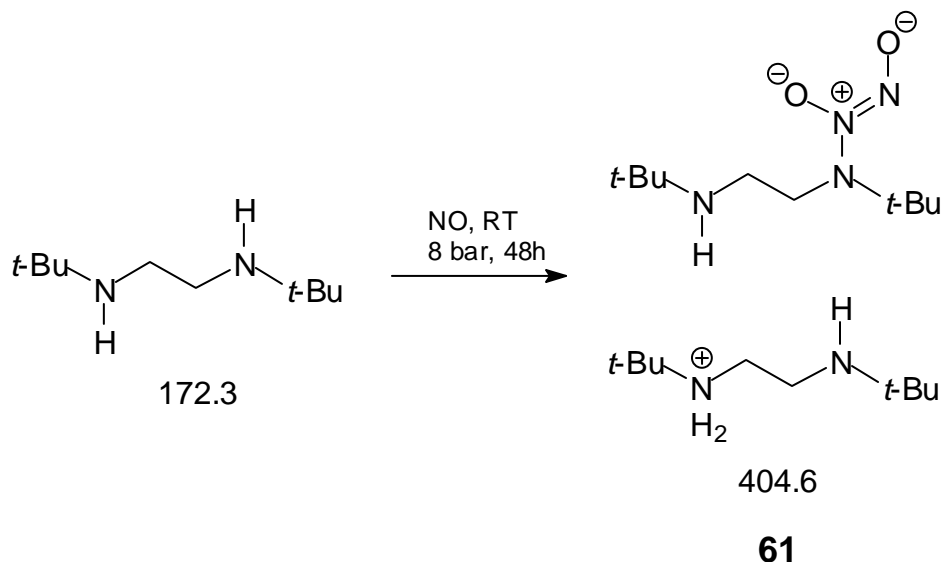
gef. C 47.32 H 9.99 N 26.98



<sup>1</sup>H-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 1.06 (d, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 6 H, H-8), 1.25 (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 6 H, H-1), 2.94 (m, 2 H, H-5), 3.30 (m, 6 H, H-2 H-4 H-7)

<sup>13</sup>C-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 125 MHz): δ = 18.4 (2 C, C-8), 19.3 (2 C, C-1), 41.4 (C-7), 45.8 (C-2), 50.6 (C-5), 54.0 (C-4)

### 5.7.6 Umsetzung von *N,N'*-Di-*t*-butylethylendiamin mit Stickstoffmonoxid

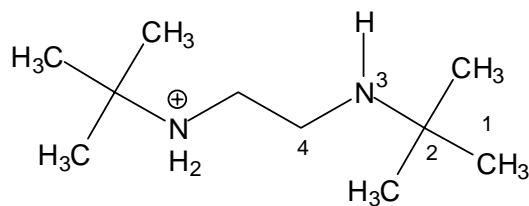
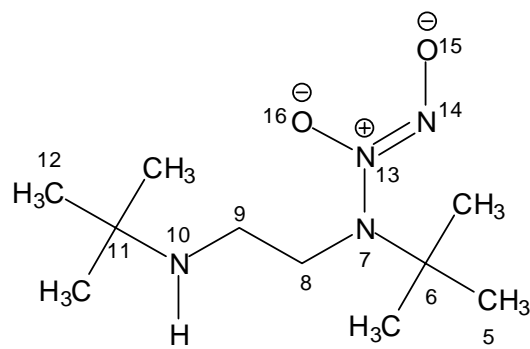


2.45 g (14.2 mmol) des Amins wurden mit 75 mL Acetonitril versetzt und nach der allg. Methode mit NO bei einem Druck von 6000 hPa und Raumtemperatur 18 h umgesetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit konnte man die Bildung eines farblosen Niederschlages erkennen. Die Reaktionsmischung wurde in einen 250 mL-Stickstoffkolben überführt und sofort abgekühlt. Reste, die noch an der Rührwelle klebten wurden mit Hilfe von Isopropanol und Ether entfernt und in einen Schnappdeckelglas überführt. Der gebildete Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit, zwei Mal mit 25 mL Acetonitril und zwei Mal mit 20 mL Ether gewaschen. Anschließend wurde er zur Trocknung an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 Pa 24 h getrocknet.

Ausbeute: 1.35 g **61** (3.35 mmol, 71 %).

Elementaranalyse: C<sub>20</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (404.64) (s. auch Ergebnisse)

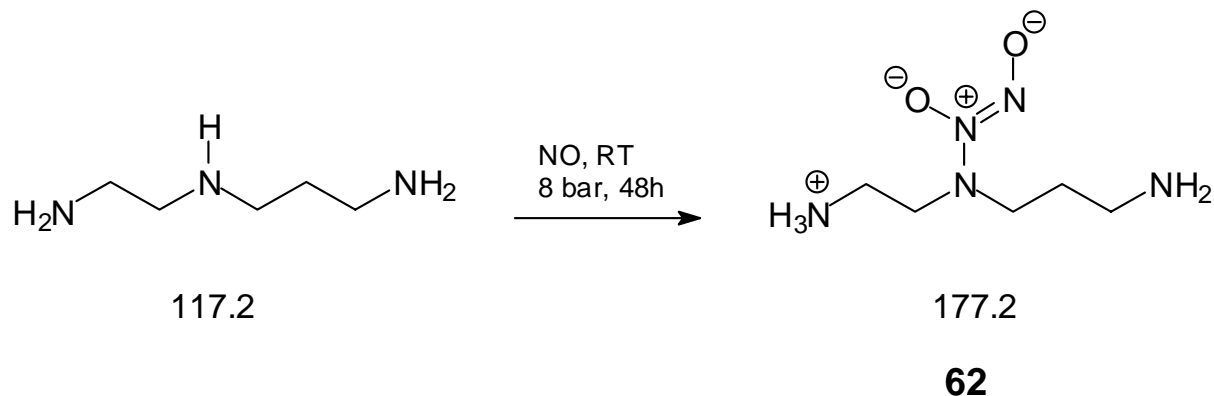
ber.	C 59.37	H 11.96	N 20.77
gef.	C 58.59	H 12.89	N 20.65



$^1\text{H-NMR}$  (3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 0.78$  (s, 9 H, H-12), 0.82 (s, 18 H, H-1), 0.92 (s, 9 H, H-5), 2.17 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, H-9), 2.34 (s, 4 H, H-4), 2.89 (br, 2 H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  (3.5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 26.0$  (3 C, C-5), 27.3 (6 C, C-1), 27.4 (3 C, C-12), 37.7 (C-11), 41.6 (2 C, C-2), 44.2 (C-6), 49.5 (2 C, C-4), 49.7 (C-9), 58.3 (C-8)

### 5.7.7 Umsetzung von *N*-2-(Aminoethyl)-propylamin mit Stickstoffmonoxid



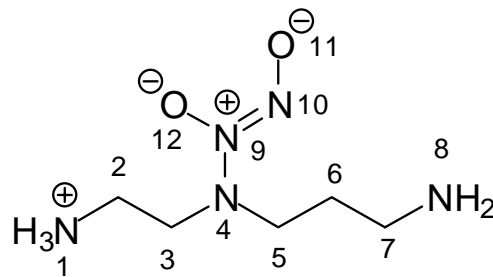
4.57 g (39.0 mmol) des Amins wurden mit 40 mL THF und 25 mL Acetonitril versetzt und nach der allg. Vorschrift zur Darstellung von NONOaten im Autoklaven bei Raumtemperatur und einem Druck von 5000 – 6000 hPa 48 h mit Stickstoffmonoxid umgesetzt. Beim Öffnen des Druckgefäßes konnte man die Bildung eines leicht rosafarbenen kristallinen Niederschlages beobachten. Die Reaktionsmischung wurde rasch in einem vorgekühlten Stickstoffkolben überführt und weiter unter Kühlung gehalten.

Mit Hilfe einer Umkehrfritte wurde der Feststoff von der Mutterlauge getrennt, vier Mal mit 20 mL Acetonitril und ein Mal mit 20 mL Ether gewaschen. Zur Trocknung wurde der Niederschlag an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 48 h angeschlossen. Die Elementar- und NMR-Analysen bestätigten die Bildung eines intermolekular stabilisierten Salzes.

Ausbeute: 4.05 g **62** (22.9 mmol, 59 %).

Elementaranalyse: C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (177.21)

ber.	C 33.89	H 8.53	N 39.52
gef.	C 34.48	H 9.42	N 38.14

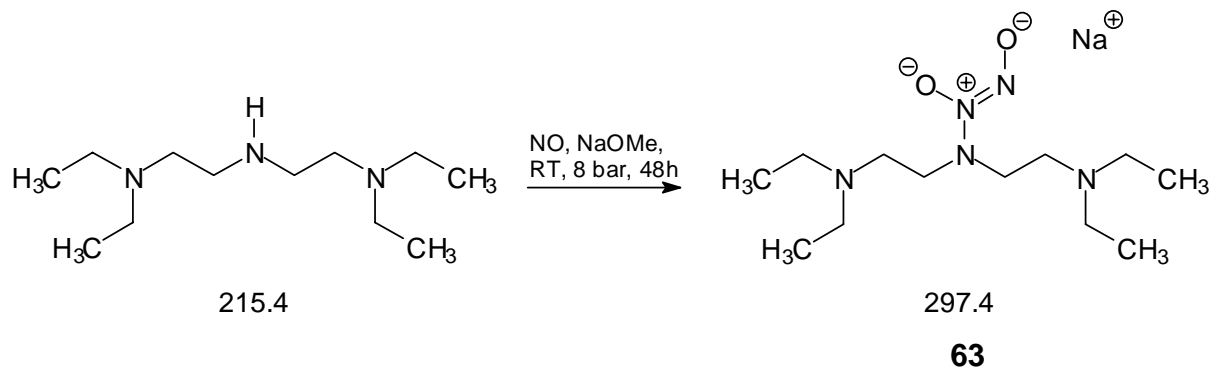


$^1\text{H-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 1.24$  (quintett,  $^3J = 7.2$  Hz, 2 H, H-6), 2.33 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-2), 2.41 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 2 H, H-7), 2.72 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2 H, H-5), 2.74 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2 H, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 29.1$  (C-6), 37.6 (C-2), 38.4 (C-7), 51.7 (C-5), 55.9 (C-3)

$^{15}\text{N-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $[\text{D}_6]$ -DMSO = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -362.1$  (N-1), -357.5 (N-8), -252.9 (N-4), -67.1 (N-9), 41.9 (N-10)

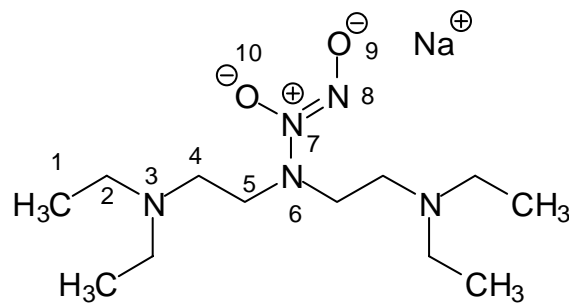
### 5.7.8 Umsetzung von *N,N,N'',N''*-Tetraethyldiethylentriamin **54** mit Stickstoffmonoxid



1.50 g (7.0 mmol) *N,N,N'',N''*-Tetraethyldiethylentriamin wurden mit 50 mL THF und 1.26 g (7.0 mmol) einer 30proz. Natriummethanolat-Lösung versetzt, wobei sich eine trübe Lösung bildete. Nach weiterer Zugabe von 10 mL Methanol wurde die Reaktionsmischung klar. Die Umsetzung mit Stickstoffmonoxid fand nach der allg. Vorschrift zur Darstellung von NONOaten im Autoklaven bei Raumtemperatur und einem Druck von 7000 – 7500 hPa 48 h statt. Bei der Öffnung des Reaktors war die Bildung eines farblos kristallinen Niederschlages festzustellen.

Der Feststoff wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge getrennt und viermal mit 20 mL Diethylether gewaschen. Zur Trocknung und Entfernung von Lösungsmittelresten wurde die Substanz an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 80 – 90 Pa 48 h angeschlossen.

Ausbeute: 900 mg **63** (3.0 mmol, 43 %).

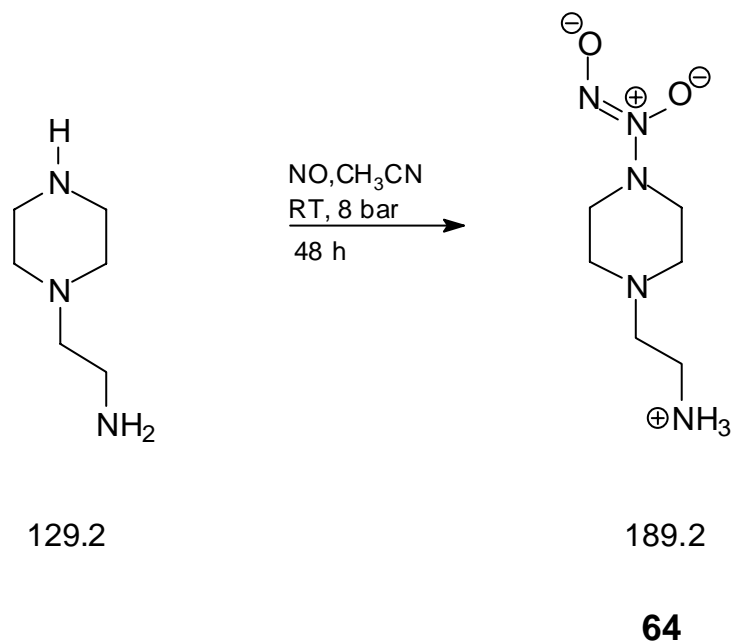


$^1\text{H-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 0.69$  (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 12 H, H-1), 2.17 (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 4 H, H-4), 2.22 (quartett,  $^3J = 7.2$  Hz, 8 H, H-2), 2.76 (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 4 H, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 10.3$  (4 C, C-1), 46.5 (2 C, C-2), 47.9 (2 C, C-5), 50.4 (2 C, C-4)

$^{15}\text{N-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $[\text{D}_6]$ -DMSO = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -336.2$  (N-3), -253.1 (N-6), -66.8 (N-7), 41.9 (N-8)

### 5.7.9 Umsetzung von 1-(2-Aminoethyl)-piperazin mit Stickstoffmonoxid<sup>[57]</sup>



6.58 g des gereinigten 1-(2-Aminoethyl)-piperazins (50.8 mmol) wurden in 65 mL Acetonitril gelöst, in den Autoklaven gegeben, mit Stickstoff gespült und mit Stickstoffmonoxid versetzt. Der Anfangsdruck betrug  $8.5 \cdot 10^5$  Pa. Der Ansatz wurde solange gefahren, bis es bei erneuter Erhöhung des Stickstoffmonoxiddruckes innerhalb von 60 min zu keiner Druckabnahme kam. Die Suspension wurde in einen vorgekühlten (0 °C) unter Schutzgas stehenden Kolben überführt und bis zur Verarbeitung im Tiefkühlfach (-20 °C) aufbewahrt. Die Substanz wurde isoliert und zusätzlich zwei Mal mit 25 mL kaltem (0 °C) Methanol und ein Mal mit 25 mL kaltem (0 °C) Ether gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Probe 3 Stunden schonend, d.h. bei geringer Temperatur (~ 10 - 20 °C) an die Vakuumpumpe (0.1 hPa) angeschlossen. Als Schutzgas während des Aufbewahrens im Tiefkühlfach diente Argon. Auf diese Weise ist ein Zerfall des Feststoffes über längere Zeiten nicht feststellbar.

Ausbeute: 8.42 g **64** (44.5 mmol, 88 %, Lit.<sup>[57]</sup> 36 %).

Schmp./Zers.: 102 – 103 °C, Lit.<sup>[57]</sup> 101 – 102 °C

Elementaranalyse: C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (189.2)

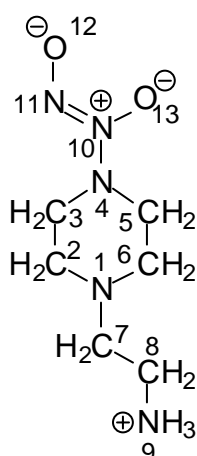
ber.: C 38.90    H 7.99    N 37.01

gef.: C 38.61    H 8.23    N 35.45

Die Banden, die das IR-Spektrum zeigt, wurden mit Hilfe der in der Literatur<sup>[49, 52, 95-98, 143]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3478-3418  $\nu$ (NH), 2300-3200  $\nu$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 2843-2530  $\nu$ (CH<sub>2</sub>), ~ 2000 (schwache Ammonium-Bande), 1652  $\delta$ (C-N-H), 1633  $\delta$ (NH<sub>2</sub>), 1574-1525  $\delta$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1462  $\delta_{as}$ (NNO, hauptsächlich  $\nu$ (N=N)), 1371-1343  $\delta$ (CH<sub>2</sub>), 1324  $\delta$ (NNO, hauptsächlich  $\nu$ (N→O)), 1175  $\nu$ (NO), 1121  $\nu$ (CN), 765  $\delta$ (NH).

Die NMR-spektroskopische Analyse von **64** ergab folgende Ergebnisse:

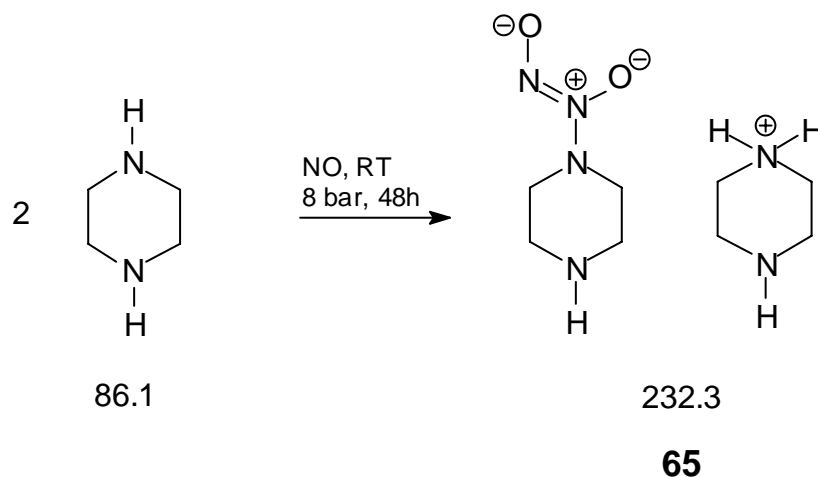


$^1\text{H-NMR}$  (0.01 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz):  $\delta = 2.31$  (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2 H, H-8), 2.45 – 2.55 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 6 H, H-2, H-6, H-7), 2.97 (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 4 H, H-3, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (0.01 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 40.1$  (C-8), 53.6 (2 C, C-2, C-6), 54.1 (2 C, C-3, C-5), 61.9 (C-7)

$^{15}\text{N-NMR}$  (4 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $[\text{D}_6]$ -DMSO = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -361.2$  (N-9), -336.6 (N-1), -253.5 (N-4), -60.8 (N-10), 36.6 (N-11)

$^{15}\text{N-CP/MAS-Festkörper-NMR}$  (Rotationsfrequenz (MAS): 5.0 kHz; Referenz: Ammoniumnitrat, 30.4 MHz):  $\delta = 53.7$  (N-11), -57.1 (N-10), -251.2 (N-4), -333.5 (N-1), -347.7 (N-9)

**5.7.10 Umsetzung von Piperazin mit Stickstoffmonoxid**<sup>[54, 55, 125]</sup>

7.99 g (92.8 mmol) aus Ethanol umkristallisiertes Piperazin wurden mit 10 mL Ethanol versetzt, dann in 55 mL Acetonitril gelöst und in ein 125 mL-Autoklav gegeben. Es wurde zwei Mal mit Stickstoff gespült und dann mit NO bei einem Druck von  $8.5 \cdot 10^5$  Pa versetzt. Nach 66 min musste der Druck nachgeregelt werden (von  $5.5$  auf  $9.5 \cdot 10^5$  Pa). Nach 22 h wurde der Versuch abgebrochen. Die Suspension wurde in einen Stickstoffkolben überführt, der im Autoklaven verbliebene Niederschlag wurde mit der Mutterlauge herausgespült und ebenfalls in den Kolben gegeben. Der Niederschlag ist farblos. Wie bei der Synthese von **65** verschwindet ein Teil des Produktes beim Überführen in den Kolben, was auf eine Zersetzung in Amin und Stickstoffmonoxid hinweist. Die Suspension wurde bis ihrer Verarbeitung im Tiefkühlfach ( $-20$  °C) aufbewahrt.

Der aus dem Autoklaven entnommene Niederschlag wurde durch eine Umkehrfritte abfiltriert, zwei Mal mit kaltem ( $\sim 0$  °C) Acetonitril und anschließend mehrmals mit jeweils 15 mL kaltem ( $\sim 0$  °C) Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde an der Vakuumpumpe (2-3 hPa) bei einer Temperatur von  $\sim 10 - 20$  °C 2 Stunden getrocknet.

Das Produkt ist ein farbloses Pulver, nach der Trocknung wurde es in einem Schlenckgefäß anfänglich unter Stickstoff und später unter Argon im Tiefkühlfach ( $T \sim -20$  °C) aufbewahrt.

Ausbeute: 5.30 g an **65** (22.8 mmol, 49 %).

## 2. Ansatz

6.38 g (74.1 mmol) Piperazin wurden in 75 mL Acetonitril gelöst und nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift mit Stickstoffmonoxid umgesetzt. Der anfängliche Druck betrug  $8.7 \cdot 10^5$  Pa, nach 21 h sank er auf  $5.1 \cdot 10^5$  Pa. Nach Erhöhung des Druckes auf  $9.5 \cdot 10^5$  Pa bemerkte man am Manometer keine Drucksenkung mehr. Der gebildete Niederschlag wurde durch eine Umkehrfritte abfiltriert, zwei Mal mit kaltem ( $\sim 0$  °C) Acetonitril und anschließend mehrmals mit jeweils 15 mL kaltem ( $\sim 0$  °C) Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde an der Vakuumpumpe (2-3 hPa) bei einer Temperatur von  $\sim 10 - 20$  °C 2 Stunden getrocknet.

Das Produkt ist farblos nach der Trocknung wurde es in einem Schlenckgefäß anfänglich unter Argon im Tiefkühlfach ( $T \sim -20$  °C) aufbewahrt.

Ausbeute: 4.94 g **65** (21.3 mmol, 57 %, Lit.<sup>[54, 55]</sup> 50 %).

Elementaranalyse:  $C_4H_9N_4O_2^- \cdot C_4H_{11}N_2^+$  (232.2) (s. auch Ergebnisse)

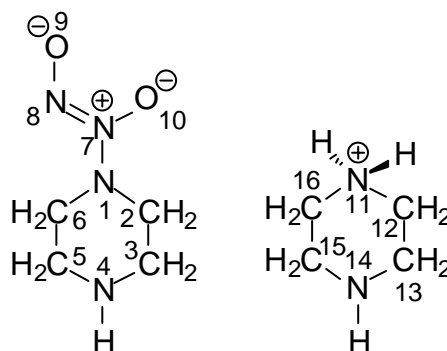
ber.: C 41.38    H 8.62    N 36.20

gef.: C 39.72    H 8.38    N 35.84

Die Banden, die das IR-Spektrum zeigt, wurden mit Hilfe der in der Literatur<sup>[49, 52, 95-98, 143]</sup> vorhandenen Daten zugeordnet.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3326  $\nu$ (NH), 3000-2100  $\nu$ ( $R_2NH_2^+$ ), 1649  $\delta$ (C-N-H), 1624  $\delta$ ( $R_2-NH_2^+$ ), 1461  $\delta_{as}$ (NNO, hauptsächlich  $\nu$ (N=N)), 1339  $\delta$ (NNO, hauptsächlich  $\nu$ (N $\rightarrow$ O)), 1252  $\nu$ (NO), 1198  $\nu$ (NO), 1095  $\nu$ (CN), 847  $\delta'_{rocking}$ ( $NH_2^+$ ), 717  $\delta_{wagging}$ (NH).

Die NMR-spektroskopische Analyse von **65** ergab folgende Ergebnisse:



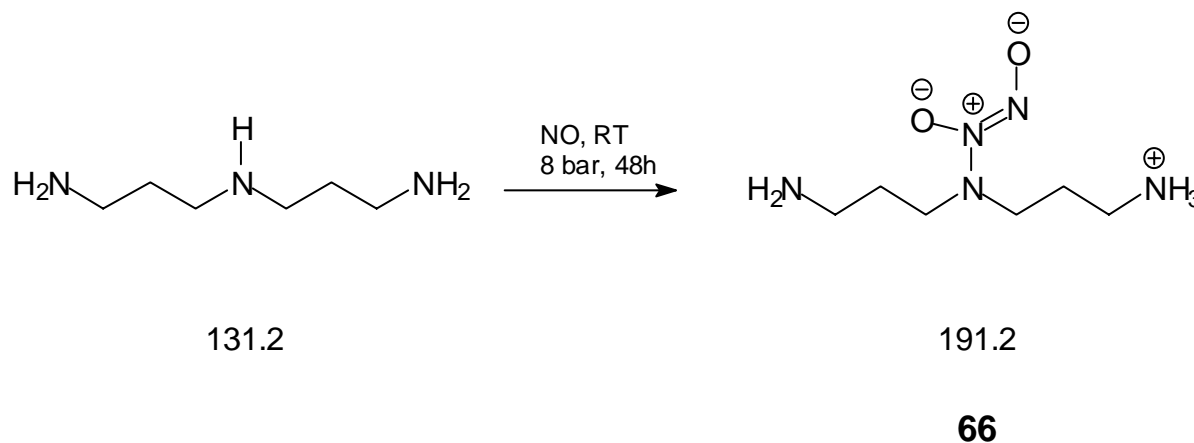
<sup>1</sup>H-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta = 2.72$  (s, 8 H, H-12, H-13, H-15, H-16), 2.96 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 4 H, H-3, H-5), 3.08 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 4 H, H-2, H-6)

<sup>13</sup>C-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta = 46.4$  (2 C, C-3, C-5), 47.6 (4 C, C-12, C-13, C-15, C-16), 54.9 (2 C, C-2, C-6)

<sup>15</sup>N-NMR (3.5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, Standard: extern 90 % Formamid in [D<sub>6</sub>]-DMSO = - 267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -349.2$  (N-4), -346.6 (N-11, N-14), -253.5 (N-1), -60.8 (N-7), 36.6 (N-8)

<sup>15</sup>N-CP/MAS-Festkörper-NMR(Rotationsfrequenz (MAS): 9.2kHz; Referenz: Ammoniumnitrat, 30.4 MHz):  $\delta = -342.9$  (N-4, N-11, N-14), -254.0 (N-1), -50.8 (N-7), 42.9 (N-8)

### 5.7.11 Umsetzung von Bis-(3-aminopropyl)-amin mit Stickstoffmonoxid<sup>[57]</sup>



4.42 g (33.7 mmol) Bis-(3-aminopropyl)-amin wurden mit 75 mL Acetonitril versetzt und nach der allg. Methode mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 hPa 18 h versetzt. Es wurden folgende Abweichungen getroffen: die Rührgeschwindigkeit wurde verringert zuerst von 450 auf  $150 \text{ min}^{-1}$ , dabei wurde der Reaktor entspannt. Anschließend wurde Stickstoffmonoxid nochmal gepresst und bei einer Rührgeschwindigkeit von  $90 \text{ min}^{-1}$  über Nacht gerührt. Nach dieser Reaktionszeit wurde der Versuch beendet und der Reaktor geöffnet. Es hatte sich ein voluminöser farbloser Niederschlag gebildet. Der Niederschlag wurde in einen 250 mL Stickstoffkolben überführt und sofort gekühlt. Niederschlagsreste klebten noch am Rotor des Reaktors. Diese Reste wurden in Isopropanol aufgenommen, in ein Schnappdeckelglas überführt und sofort gekühlt.

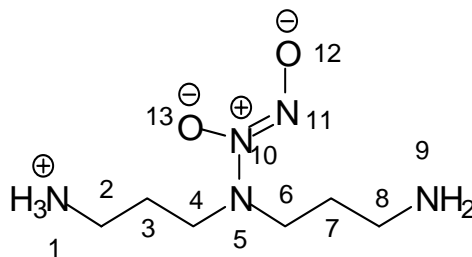
Der Niederschlag wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte vom Lösungsmittel befreit, ein Mal mit 15 mL kaltem Acetonitril und zwei Mal mit 10 mL Diethylether gewaschen. Darauf folgend wurde er zur Entfernung von Lösungsmittelresten an die Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 0.8 – 1 hPa 48 h angeschlossen.

Ausbeute: 4.95 g **66** (26 mmol, 77 %, Lit.<sup>[57]</sup> 94 %).

Schmp./Zers.: 98 - 99 °C, Lit.<sup>[57]</sup> 99 - 100 °C

Elementaranalyse: C<sub>6</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (191.23)

ber.	C 37.69	H 8.96	N 36.62
gef.	C 37.54	H 8.95	N 35.41



<sup>1</sup>H-NMR (5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 1.14 (quintett, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 4 H, H-3, H-7), 2.31 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 4 H, H-2, H-8), 2.62 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 4 H, H-4, H-6)

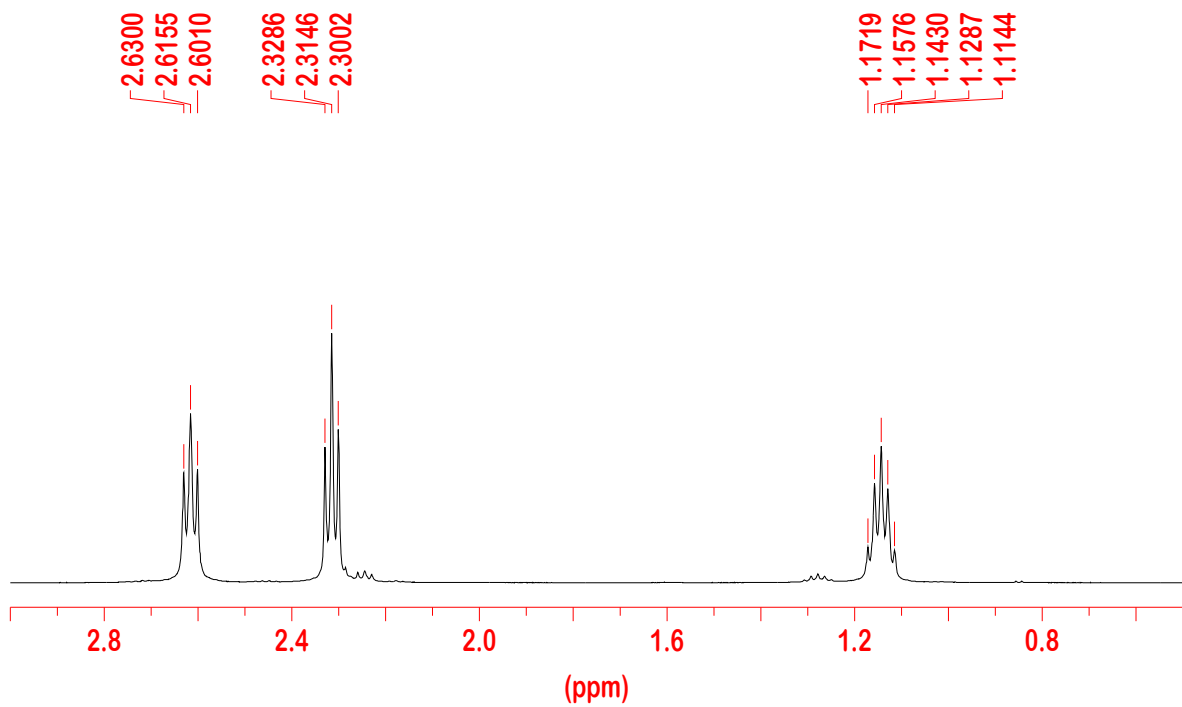


Abb. 96:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **66** in 5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz) = 31.9 (2 C, C-3, C-7), 41.2 (2 C, C-2, C-8), 54.5 (2 C, C-4, C-6)

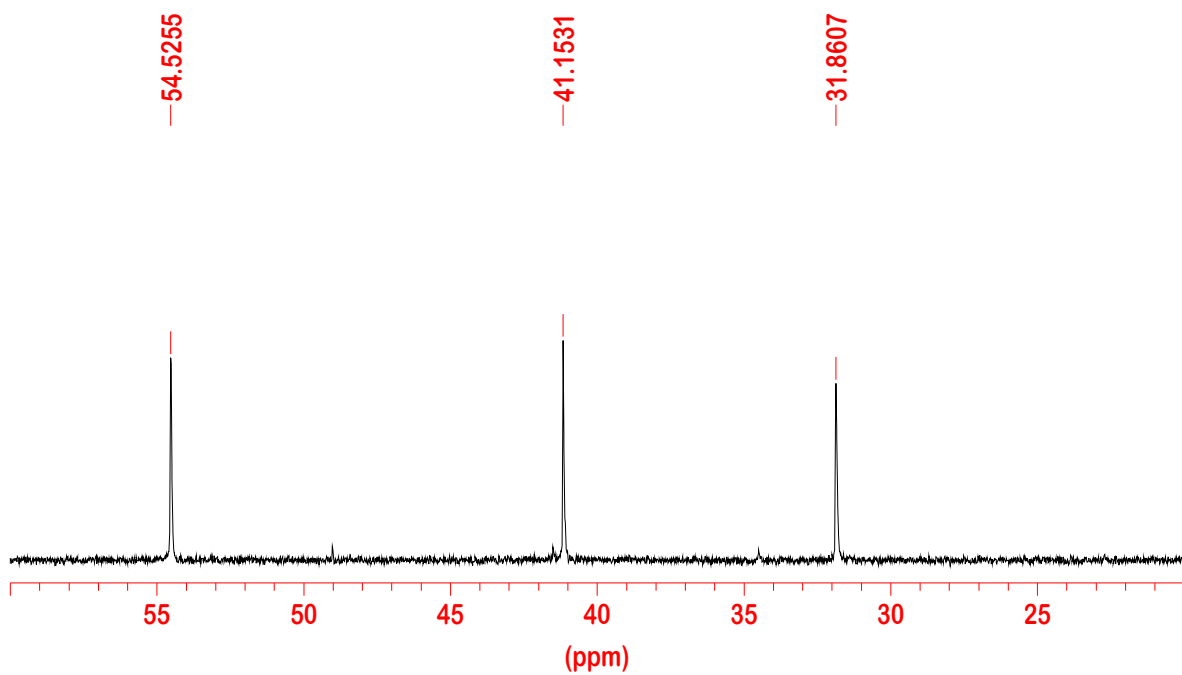


Abb. 97:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **66** in 5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz.

$^{15}\text{N}$ -NMR (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$  = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta$  = -359.09 (2 N, N-1), -250.93 (N-5), -68.8 (N-10), 40.80 (N-11)

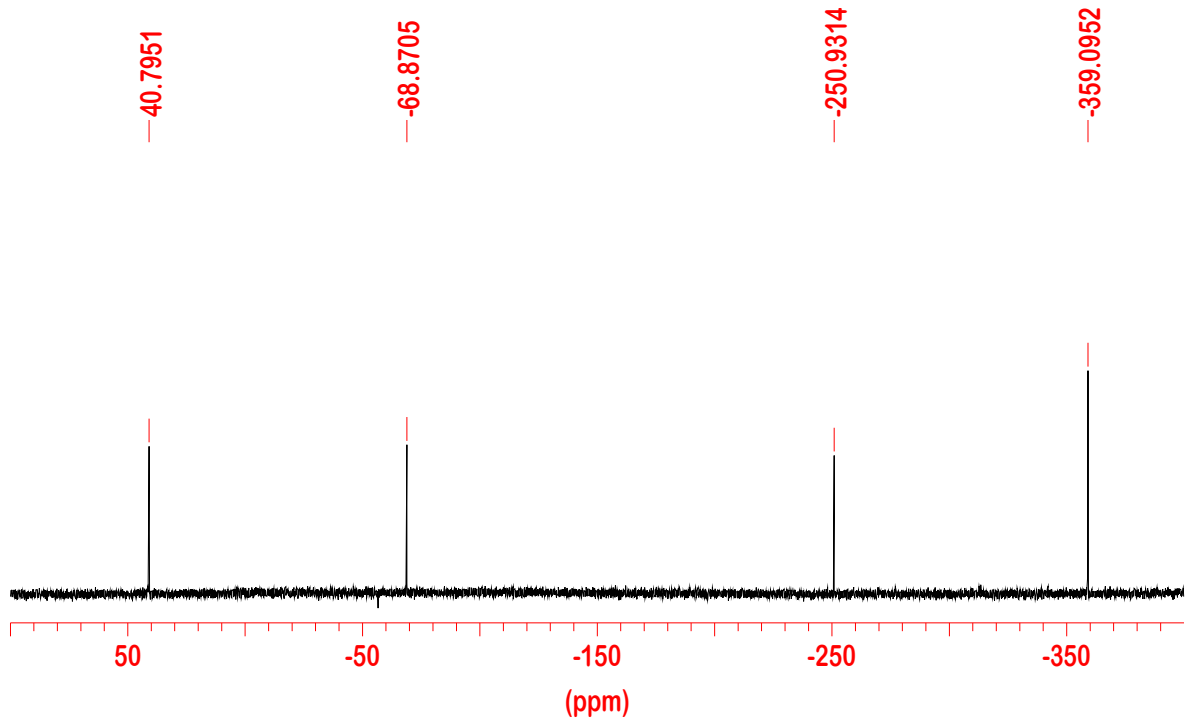
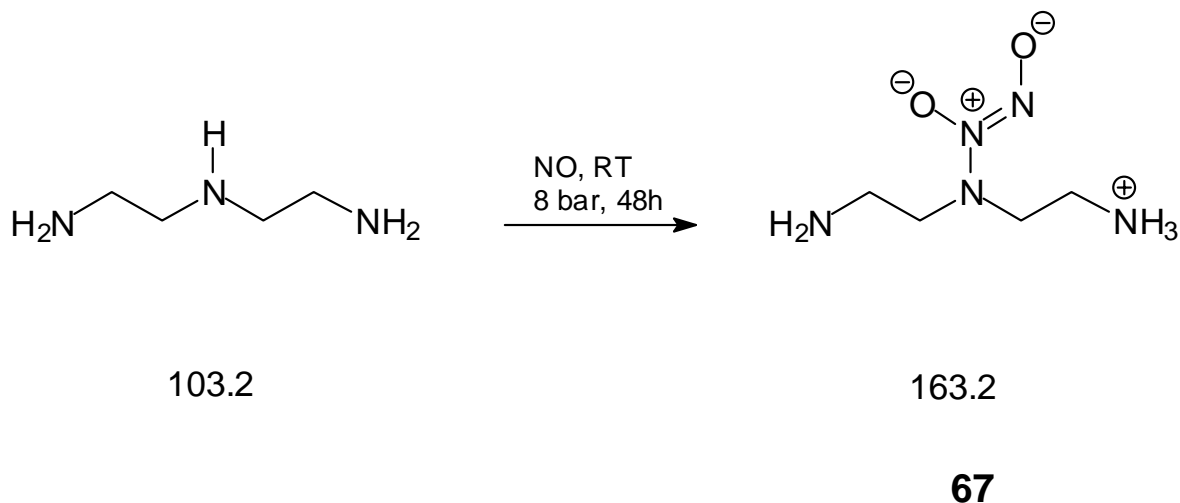


Abb. 98:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **66** in 5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$  = -267.6 ppm, 50.7 MHz.

### 5.7.12 Umsetzung von Diethylentriamin (DETA) mit Stickstoffmonoxid<sup>[57]</sup>



6.40 g (62 mmol) Diethylentriamin wurden mit 75 mL Acetonitril versetzt und nach der allg. Methode mit Stickstoffmonoxid bei Raumtemperatur und einem Druck von 6000 hPa 18 h versetzt. Bei der Umsetzung wurden folgende Abweichungen getroffen: die Rührgeschwindigkeit wurde nach 30 min verringert, zuerst von 450 auf 150 min<sup>-1</sup>, dabei wurde der Reaktor entspannt. Anschließend wurde Stickstoffmonoxid (6000 hPa) noch mal gepresst und bei einer Rührgeschwindigkeit von 90 min<sup>-1</sup> über Nacht gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde der Ansatz abgebrochen, dabei klebten noch Reste des farblosen Niederschlages am Rotor des Reaktors. Diese Reste wurden in Isopropanol aufgenommen und sofort gekühlt.

Rohausbeute: 4.80 g **67** (29.4 mmol).

### Reinigung

Nach Aufnahme eines 200 MHz-NMR-Spektrums in 4 M NaOD konnte man noch nicht umgesetztes Ausgangsamin feststellen. Zur Reinigung wurden 4.15 g (25.4 mmol) des Rohstoffes zwei Mal mit je 30 mL Acetonitril 60 min lang digeriert, anschließend mit Hilfe einer Umkehrfritte von der Mutterlauge befreit, zwei Mal mit jeweils 15 mL Diethylether gewaschen und schließlich zur Trocknung an der Öldiffusionspumpe bei Raumtemperatur und einem Druck von 0.8 - 1 hPa angeschlossen.

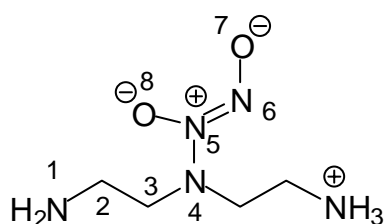
Reinausbeute: 3.28 g **67** (20.1 mmol, 80 %, Lit.<sup>[57]</sup> 90 %).

Schmp./Zers.: 108 - 109 °C, Lit.<sup>[57]</sup> 109 - 110 °C

Elementaranalyse: C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (163.2)

ber. C 29.44 H 8.03 N 42.92

gef. C 29.59 H 8.14 N 42.20



<sup>1</sup>H-NMR (5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 500 MHz):  $\delta$  = 2.13 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4 H, H-2),  
2.56 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4 H, H-3)

<sup>13</sup>C-NMR (5 M NaOD in D<sub>2</sub>O, 125 MHz):  $\delta$  = 40.2 (2 C, C-2), 59.5 (2 C, C-3)

$^{15}\text{N}$ -NMR (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$  = -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta$  = -363.8 (2 N, N-1), -258.4 (N-4), -68.7 (N-5), 40.0 (N-6)

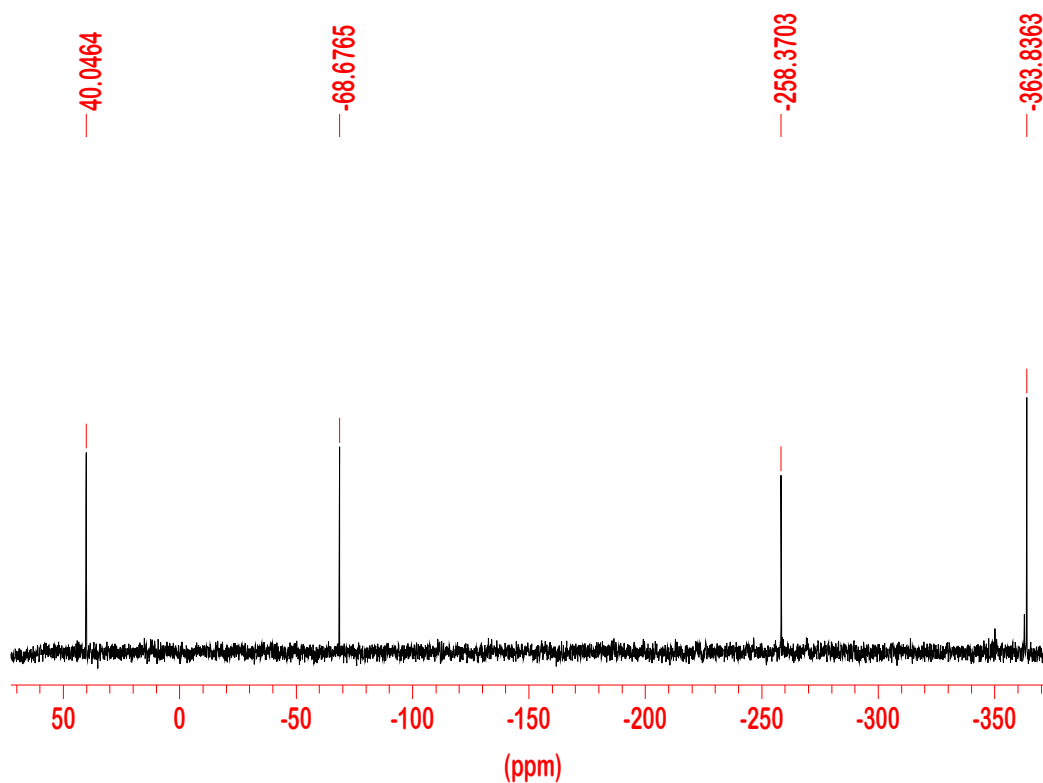


Abb. 99:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum von **67** in 5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$  = -267.6 ppm, 50.7 MHz.

Hier ist hervorzuheben, dass es in diesem Spektrum, so wie im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum des Bisguanidin-NONOats **57** auch ein Signal weniger als erwartet für die Guanidin- bzw. Endamin-Einheiten zu sehen ist. Der Grund ist die Äquivalenz dieser Gruppen im jeweiligen Molekül in alkalischer Lösung (deprotoniert).

## 5.8 UV- und Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen von NONOaten

### 5.8.1 Allgemeine Vorschrift für UV- und Fluoreszenzmessungen

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Versuche unter Schutzgas durchgeführt. Die NONOat-Stammlösungen wurden in 0.01 M NaOH hergestellt. Für die Messungen wurden dann anfangs 0.3 mL dieser Lösung mit 2.7 mL Phosphatpuffer-Lösung ( $\text{pH} = 7.36 \pm 0.03$ ) versetzt und sofort gemessen. Auf Grund einer besseren Thermostatisierbarkeit der Systeme (Küvetten) wurde das Gesamtvolumen auf 2.5 mL reduziert (0.25 mL der jeweiligen NONOat-Lösung und 2.25 mL der jeweiligen Pufferlösung). Die Kinetik des Zerfalles wurde, je nach NONOat über Zeiträume von 50 - 100 h (mindestens 6 – 7 Halbwertszeiten) verfolgt. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe des Programms Table Curve 2D v4 unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen-Gesetzes.

Vor dem jeweiligen Versuch wurden die Stammlösungen in das thermostatisierte Bad eingetaucht und mind. 30 min temperiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die entsprechenden Mengen an Pufferlösung und anderen Stammlösungen entnommen. Die notwendigen Mengen an NONOat-Maßlösungen wurden in geschlossene Gefäße überführt. Parallel zu den eigentlichen Messungen ist es notwendig, Blindwerte zu messen. Diese Blindproben setzten sich aus 0.3 mL bzw. 0.25 mL einer 0.01 M NaOH-Lösung und der jeweiligen Phosphatpufferlösung (2.7 mL bzw. 2.25 mL) zusammen.

Von großer Relevanz ist die Kontrolle der Konstanz des pH-Wertes sowohl vor als auch nach der Messung. Die Temperatur wird ebenfalls protokolliert.

Für die Fluoreszenzmessungen bei Raumtemperatur ( $22.0 \pm 2.0$  °C) wurden die 3 mL-Fluoreszenz-Küvetten verwendet. Messungen bei  $37.0 \pm 0.1$  °C wurden mit den thermostatisierbaren 1 mL Küvetten durchgeführt. Analog zu den UV-Messungen wurden die Stammlösungen, so weit wie möglich, vor den jeweiligen Messungen thermostatisiert. Die Fluoreszenz-Messungen erfolgten, wenn

nicht anders erwähnt, unter striktem Luftsauerstoff-Ausschluss. Eine absolute Schutzgasatmosphäre gewährleistet erst die Wiederholbarkeit der Versuche.

### 5.8.2 Vorbereitung der Phosphatpufferlösungen

Sämtliche hier verwendete Lösungen wurden mit Hilfe eines Gefäßes mit Bodenfritte mindestens 30 – 45 min mit Argon gespült.

Es ist wichtig, dass die Pufferlösungen frisch zubereitet werden. Je nach Pufferzusammensetzung kann es nach wenigen Tagen zu Schlierenbildung kommen. Wichtig ist auch die ständige Überprüfung des pH-Wertes sowohl vor, als auch nach der jeweiligen Messung.

Es wurden drei unterschiedliche Puffer-Lösungen verwendet. Für den pH-Bereich von 3.0 – 6.0 wurde der McIlvaine-Puffer verwendet, für den pH-Bereich von 5.8 – 8.0 ein Phosphat-Puffer und als dritter Puffer wurde ein Acetat-Puffer verwendet (3.6 – 5.6).

Der *McIlvaine-Puffer* wird aus einer 0.1 M Zitronensäure (Lösung A)- und einer 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Lösung B)-Lösung nach folgender Zusammensetzung hergestellt:  $x \text{ mL A} + (100 - x) \text{ mL B}$  bei einer Temperatur von 21 °C.

Der *Acetat-Puffer* wird aus einer 0.1 M Essigsäure (Lösung A)- und einer 0.2 M Acetat (Lösung B)-Lösung nach folgender Gleichung zusammengesetzt:  $x \text{ mL A} + y \text{ mL B}$  auf 100 mL.

Der *Phosphat-Puffer* wird aus einer 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lösung A)- und einer 0.1 M NaOH (Lösung B)-Lösung nach folgender Formel zusammengesetzt:  $50 \text{ mL A} + x \text{ mL B}$ . Eine tabellarische Zusammenfassung der genauen Volumina, bzw. der Werte für  $x$  und  $y$  je nach Pufferzusammensetzung ist in Tab. 14 zu beobachten.

Tab. 14: Volumen der jeweiligen Stammlösungen für die Puffer-Lösungen.

pH	McIlvaine-Puffer	Acetat-Puffer		Phosphat-Puffer
	x [mL]	x [mL]	y [mL]	x [mL]
2.2	98.0			
2.6	89.1			
3.0	79.5			
3.2	75.3			
3.4	71.5			
3.6	67.8	46.3	3.7	
3.8	64.5	44.0	6.0	
4.0	61.5	41.0	9.0	
4.2	58.6	36.8	13.2	
4.4	55.9	30.5	19.5	
4.6	53.25	25.5	24.5	
4.8	50.7	20.0	30.0	
5.0	48.5	14.8	35.2	
5.2	46.6	10.5	39.5	
5.4	44.3	8.8	41.2	
5.6	42.0	4.8	45.2	
5.8	39.6			3.6
6.0	36.9			5.6
6.2	33.9			8.1
6.4	30.8			11.6
6.6	27.3			16.4
6.8				22.4
7.0				29.1
7.2				34.7
7.4				39.1
7.6				42.8
7.8				45.3
8.0				46.7

*Phosphatpuffer* ( $pH = 7.4$ )<sup>[142]</sup> wurde aus 50.0 mL einer 0.1 M  $KH_2PO_4$ -Lösung und 39.1 mL einer 0.1 M NaOH-Lösung hergestellt. Die Lösung wurde mit Argon 45 min gespült. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters überprüft. Der pH-Wert der in den nachfolgenden Experimenten benutzten Phosphatpufferlösung betrug 7.35 bei einer Temperatur von 26.1 °C.

### 5.8.3 Charakterisierung von NONOaten mit Hilfe der UV-Spektroskopie

NONOate zeigen eine typische Absorptionsbande mit einem Maximum bei 248 – 253 nm. Die Abnahme dieser Bande in Pufferlösungen kann mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt werden. Das Verschwinden des Chromophors wird in der Literatur<sup>[57, 61, 77, 116]</sup> in Verbindung mit der NO-Freisetzung gebracht. Der Zerfall dieser Bande in Pufferlösungen erfolgt nach einer Kinetik 1. Ordnung. Die Auswertung dieser Daten unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes liefert den Wert für die Geschwindigkeitskonstante und daraus resultierend, den Wert für die Halbwertszeit des jeweiligen NONOats. Exemplarisch anhand des Zerfalls von Verbindung **64** in einer Phosphatpufferlösung ( $pH\ 7.4$ ) und bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C wird hier die Auswertung der gemessenen Daten dargestellt.

Abbildung 100 zeigt den Zerfall von **64** als Funktion der Zeit. Man erkennt deutlich einen isosbestischen Punkt bei  $\lambda = 230$  nm, was beweist, dass das die neue Bande verursachende Produkt direkt mit der Bande des NONOats zusammenhängt.

Die Konzentration der NONOat-Maßlösungen war  $0.98 \cdot 10^{-3}$  M (**64** in 0.01 M NaOH), wobei 0.3 mL dieser Lösung mit 2.7 mL Phosphatpuffer-Lösung versetzt und sofort vermessen wurden. Die Kinetik des Zerfalles wurde über den Zeitraum von 1-2 h verfolgt.

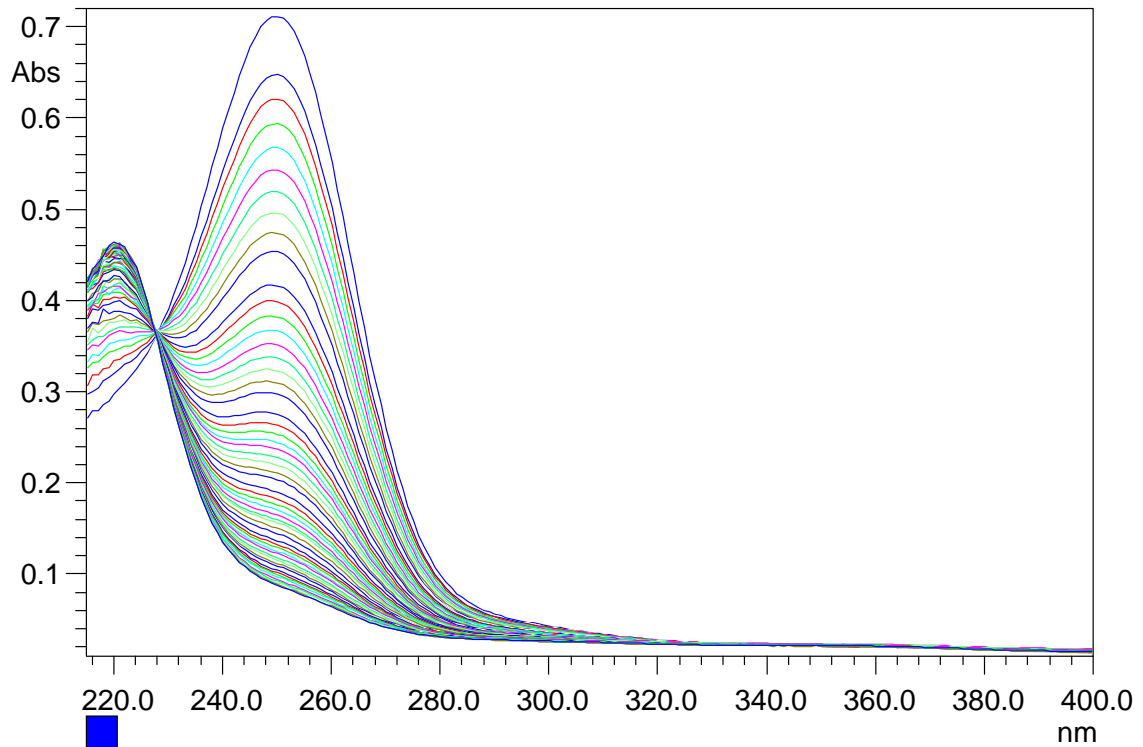


Abb. 100: Zerfall von **64** ( $0.98 \cdot 10^{-4}$  M in Phosphatpufferlösung pH 7.4) als Funktion der Zeit.  $\lambda_{\max, t=0} = 250$  nm,  $\lambda_{\max, t=\text{Ende}} = 220$  nm. Isosbestischer Punkt bei 230 nm.

Abb. 101 zeigt die Extinktion als Funktion der Zeit, worauf die logarithmische Auftragung von  $\ln(E - E_{\infty})$  gegen die Zeit als Abb. 102 folgt. Hieraus ergeben sich  $k = 0.095 \pm 0.002$  s<sup>-1</sup> und  $t_{1/2} = 7.1 \pm 0.2$  min bei  $22.0 \pm 2.0$  °C.

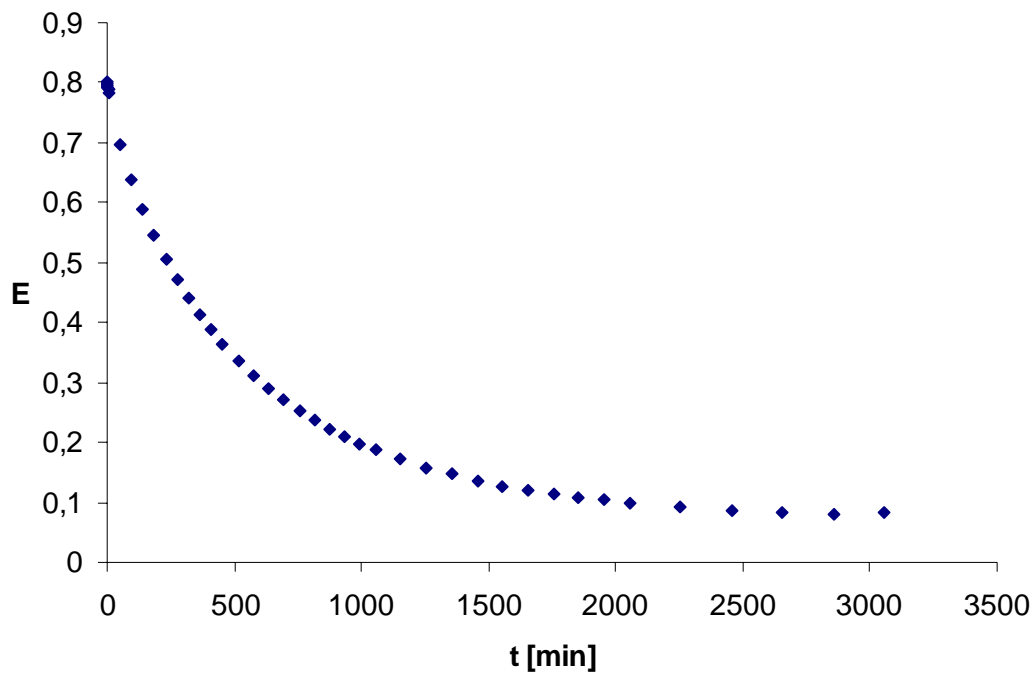


Abb. 101: Extinktion vom Zerfall von **64** ( $0.98 \cdot 10^{-4}$  M in Phosphatpufferlösung pH 7.4) als Funktion der Zeit.

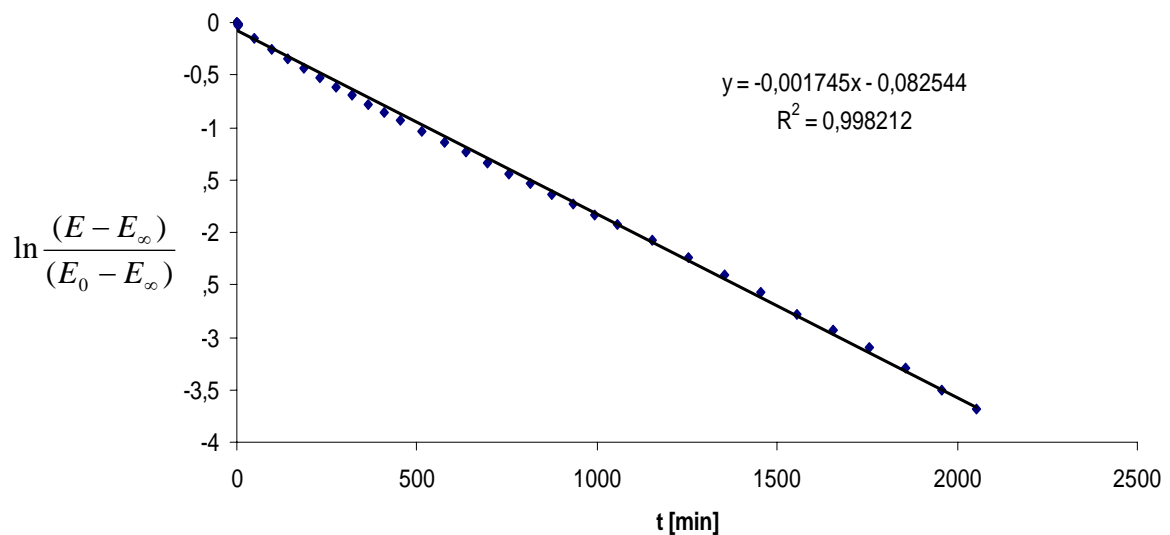


Abb. 102: logarithmierte Extinktion vom Zerfall von **64** ( $0.98 \cdot 10^{-4}$  M in Phosphatpufferlösung pH 7.4) als Funktion der Zeit. Kurve zur Bestimmung von  $k$  und  $t_{1/2}$ .

Die Ergebnisse der Messungen für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten NONOate sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Experimentell ermittelte Werte für den Zerfall der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *N*-Diazeniumdiolate unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und  $37.0 \pm 0.1$  °C) mit Ausnahme von **64** und **65**, die bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C gemessen wurden.

Verbindung	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon$ [L·mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
<b>57</b>	253.0 ± 0.5	6500 ± 50	$(2.89 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	399 ± 2
<b>58</b>	251.0 ± 0.5	7380 ± 10	$(1.72 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$	670 ± 10
<b>59</b>	251.0 ± 1.0	9350 ± 50	$(1.83 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	63.3 ± 1.8
<b>60</b>	250.0 ± 0.5	8110 ± 10	$(6.28 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	183.4 ± 0.8
<b>61</b>	251.0 ± 0.5	8670 ± 50	$(1.54 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	75.0 ± 1.0
<b>62</b>	250.0 ± 0.5	8300 ± 50	$(2.56 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	450 ± 2
<b>63</b>	250.0 ± 0.5	5360 ± 50	$(1.97 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	585 ± 2
<b>64</b>	246.0 ± 0.5	5810 ± 10	$(1.62 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$	7.1 ± 0.2
Lit. <sup>[57]</sup>	k. A.*	5800 ± 20	$2.31 \cdot 10^{-3}$	5.0
<b>65</b>	250.0 ± 0.5	7800 ± 40	$(1.10 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$	10.5 ± 0.3
Lit. <sup>[125]</sup>	252	7850	$2.20 \cdot 10^{-3}$	5.3 (37 °C)
<b>66</b>	249.0 ± 0.5	8050 ± 50	$(9.37 \pm 0.37) \cdot 10^{-5}$	123.3 ± 5.0
Lit. <sup>[57]</sup>	252	7860	$1.39 \cdot 10^{-4}$	83
<b>67</b>	250.0 ± 0.5	7600 ± 40	$(0.98 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	1180 ± 20
Lit. <sup>[57, 127]</sup>	252	7640	$0.96 \cdot 10^{-5}$	1200

\* k. A. = keine Angabe

### 5.8.4 Untersuchung des Zerfalls von NONOaten in Abhängigkeit des pH-Wertes

Die Abhängigkeit des Zerfalls vom pH-Wert in gepufferten Lösungen wurde untersucht. Die gemessenen Verbindungen **57** und **58** sind in der Abb. 103 zu sehen. Die Daten des als Vergleich dienenden langlebigen DETA/NO **67** befinden sich in der Literatur<sup>[77]</sup> und wurden hier nicht noch mal überprüft.

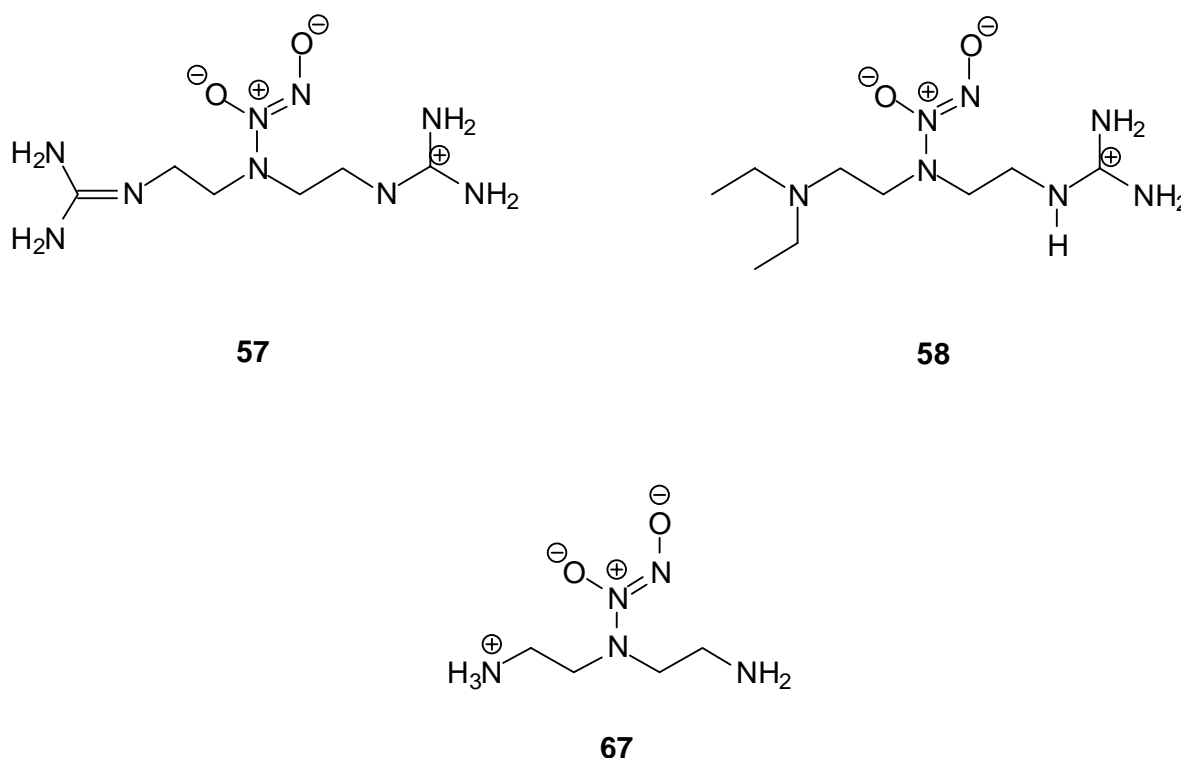


Abb. 103: Messungen der pH-Wert Abhängigkeit des Zerfalles von **57** und **58**. Verbindung **67** wurde bereits in der Literatur<sup>[77]</sup> erwähnt und hier nicht nochmal vermessen.

Die gemessenen Daten für die Verbindung **57** sind in der Tab. 16 zusammengefasst. Die Werte wurden gemäß der allg. Vorschrift zur UV- und Fluoreszenzmessungen erhalten. Die Werte für die Verbindung **58** sind in der darauf folgenden Tab. 17 zu finden.

Tab. 16: Kinetische Daten für den Zerfall der Verbindung **57** in Abhängigkeit vom pH-Wert in gepufferten Lösungen bei  $37.0 \pm 0.1$  °C.

pH	$k$ $10^{-5} [\text{s}^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]
4.00	$(1.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-2}$	0.88
4.77	$(5.44 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	2.12
4.91	$(1.59 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	7.24
5.23	$(3.33 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	3.47
5.75	$(1.11 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	10.4
6.06	$(4.87 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	23.7
6.22	$(3.54 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	32.6
6.35	$(2.90 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	39.9
6.64	$(1.76 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	65.5
6.69	$(1.28 \pm 0.60) \cdot 10^{-4}$	90.3
6.92	$(9.10 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	127.0
7.00	$(6.16 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	187.5
7.08	$(5.66 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	204.0
7.36	$(2.89 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	399.0
7.46	$(2.50 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	462.1
7.63	$(2.23 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	517.3
7.96	$(1.23 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	936.0

Tab. 17: Kinetische Daten für den Zerfall der Verbindung NGNONO **58** in Abhängigkeit vom pH-Wert in gepufferten Lösungen bei  $37 \pm 0.1$  °C.

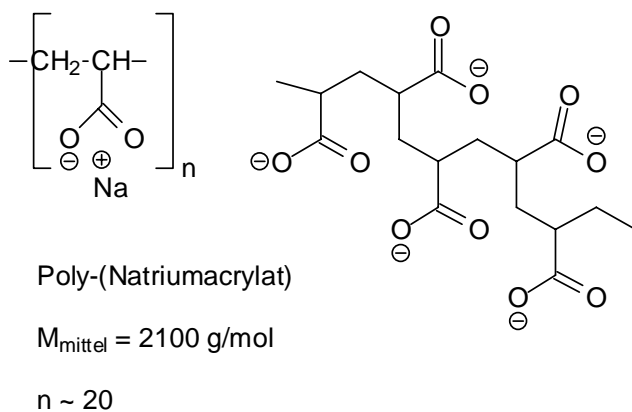
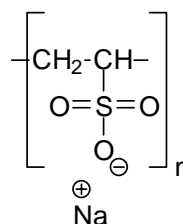
pH	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
3.99	$(8.05 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	1.44
4.33	$(3.90 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	2.96
4.58	$(2.74 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$	4.21
4.77	$(1.86 \pm 0.04) \cdot 10^{-3}$	6.22
5.23	$(8.20 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	14.1
5.46	$(5.55 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	20.8
5.61	$(4.08 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	28.3
5.83	$(1.86 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	62.2
5.92	$(1.50 \pm 0.60) \cdot 10^{-4}$	76.8
6.06	$(1.65 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	70.1
6.22	$(1.20 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	96.3
6.62	$(5.33 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	216.7
6.64	$(5.77 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	200.0
6.92	$(3.72 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	310.7
7.36	$(1.77 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	653

### 5.8.5 UV-spektroskopische Untersuchungen zum Zerfall von NONOaten (57, 58 und 65) in Anwesenheit von Ionenaustauschern

Der Zerfall der in Abb. 103 gezeigten Verbindungen wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ionenaustauscherkonzentrationen unter physiologischen Bedingungen (Phosphatpuffer, pH 7.4, 37 °C) untersucht. Ionenaustauscher besitzen ein ähnliches Aufbauprinzip, wie Proteoglykane bzw. Glykosaminglykane (GAG's), hierbei handelt es sich um polyanionischen Einheiten mit einer hohen Ladungsdichte. Die Wechselwirkung bzw. der Effekt dieser Ladungseinheiten auf den Zerfall von NONOaten unter phys. Bedingungen ist von Interesse. Der Zerfall wird mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt.

Bei den in diesen Experimenten verwendeten Ionenaustauschern handelt es sich um Poly-(natriumacrylat) und Poly-(natriumvinylsulfonat). Zusätzlich wurde parallel zu diesen Messungen und um mögliche ionische Effekte ausschließen zu können,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  als Vergleich verwendet. Ein Abschnitt dieser Polymere ist in Abb. 104 zu betrachten.

Je nach gewünschter Konzentration an Ionenaustauscher-Lösung wurde die jeweilige Menge an Austauscher gewogen und sofort mit entgaster Phosphatpufferlösung versetzt. Die Lösung wurde dann in einen Gefäß mit Bodenfritte gegeben und mindestens 30 – 45 min mit Argon gespült. Der pH-Wert der dargestellten Lösungen wurde gemessen. Eine Änderung nach Zusatz des Ionenaustauschers war nicht feststellbar. Die Lösungen mit den höchsten Konzentrationen an Poly-(natriumacrylat)-Austauscher sind nicht unendlich haltbar. Sie bilden nach 7 Tagen farblose Schlieren, die die Messungen erheblich stören können.


**70**


Poly-(natriumvinylsulfonat)

25% techn.

**71**

Abb. 104: Verwendete Ionenaustauscher, als Vergleich wurde parallel zu diesen Messungen Natriumsulfat verwendet.

### 5.8.5.1 Wechselwirkung von 57 mit Poly-(natriumacrylat) 70

Die Konzentration der NONOat-Stammlösung betrug  $6.91 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  an **57** in  $0.01 \text{ M NaOH}$ . Die Messungen wurden bei einer Temperatur von  $37.0 \pm 0.1 \text{ °C}$  durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden dann mit Hilfe des Programms TableCurve<sup>®</sup> ausgewertet. Die Korrelationskoeffizienten besitzen Werte  $r^2 > 0.99$ .

Wie bereits oben erwähnt, wurde der Zerfall nach einer Kinetik erster Ordnung ausgewertet. In Tab. 18 werden die Konzentrationen und die gemessenen Halbwertszeiten angegeben. Für die Auswertung bei mehreren gleichzeitigen Messungen mit dem Küvettenwechsler wurden die Werte bis 20 min vernachlässigt.

sigt, da die Temperierung bei der Vorbereitung der Messungen nicht mehr gewährleistet war.

Tab. 18: Daten aus den kinetischen Messungen des Zerfalls von **57** in Anwesenheit von unterschiedlichen Poly-(natriumacrylat)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[ <b>70</b> ] [mM]	$k$ $10^{-5} [\text{s}^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]
0	$2.89 \pm 0.005$	$399.5 \pm 0.7$
0.371	$4.66 \pm 0.10$	$247.9 \pm 5.3$
1.152	$5.87 \pm 0.17$	$196.9 \pm 5.6$
1.52	$6.57 \pm 0.22$	$176.0 \pm 5.9$
2.667	$7.81 \pm 0.01$	$147.9 \pm 0.2$
3.71	$7.82 \pm 0.06$	$147.7 \pm 1.2$
5.71	$8.31 \pm 0.55$	$139.4 \pm 9.3$
11.52	$8.39 \pm 0.01$	$137.8 \pm 0.1$

Die Halbwertszeit des Zerfalles als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 105 zu beobachten. Man erkennt eine Zunahme des Wertes für die Geschwindigkeitskonstanten, was einer Erniedrigung der Halbwertszeit des Zerfalls des NONOats um Faktor  $t_{1/2,\text{ohne}} : t_{1/2,[\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 400 : 138 = 2.9 : 1$  bedeutet. Das entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 66 %.

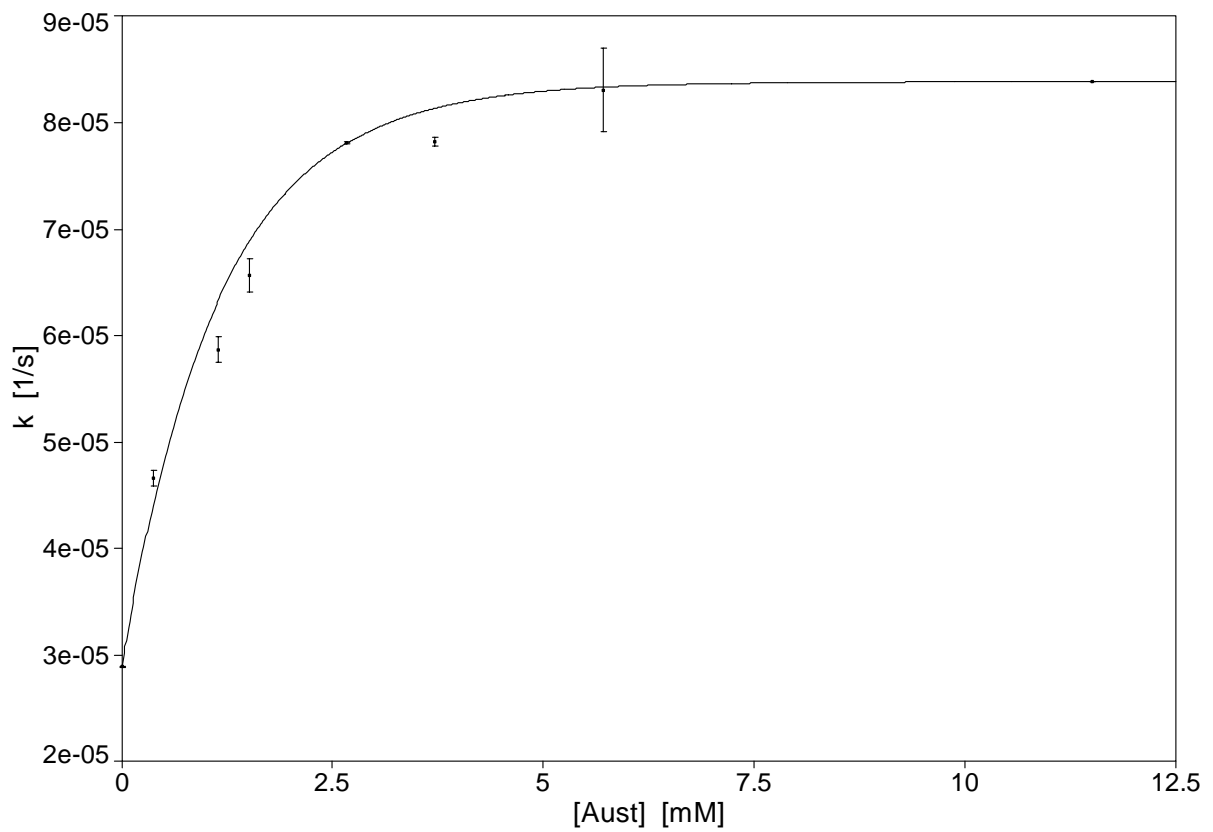


Abb. 105: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $6.91 \cdot 10^{-5}$  M Lösung von **57** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{max} = 253$  nm gemessen.

### 5.8.5.2 Wechselwirkung von 57 mit Austauscher Poly-(natriumvinylsulfonat) 71

Es wurde die Abhängigkeit der Halbwertszeit des Zerfalls von der Austauscher-Konzentration gemessen. In der Tab. 19 sind die Ergebnisse wiedergegeben.

Tab. 19: Daten aus den Messungen von 57 in Anwesenheit von unterschiedlichen Poly-(natriumvinylsulfonat)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[71] [mM]	$k$ $10^{-5} [s^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]
0	$2.89 \pm 0.005$	$399.5 \pm 0.7$
1.99	$3.89 \pm 0.04$	$296.9 \pm 2.7$
6.84	$5.07 \pm 0.16$	$228.0 \pm 7.0$
9.93	$4.97 \pm 0.24$	$233.0 \pm 11.2$
17.4	$5.17 \pm 0.11$	$223.6 \pm 5.1$
32.7	$5.32 \pm 0.26$	$217.6 \pm 10.5$

Die Halbwertszeit des Zerfalls als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 106 zu beobachten. Man erkennt eine Erniedrigung der Halbwertszeit um den Faktor  $t_{1/2, \text{ohne}} : t_{1/2, [\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 400 : 210 = 1.9 : 1$ . Das entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 48 %.

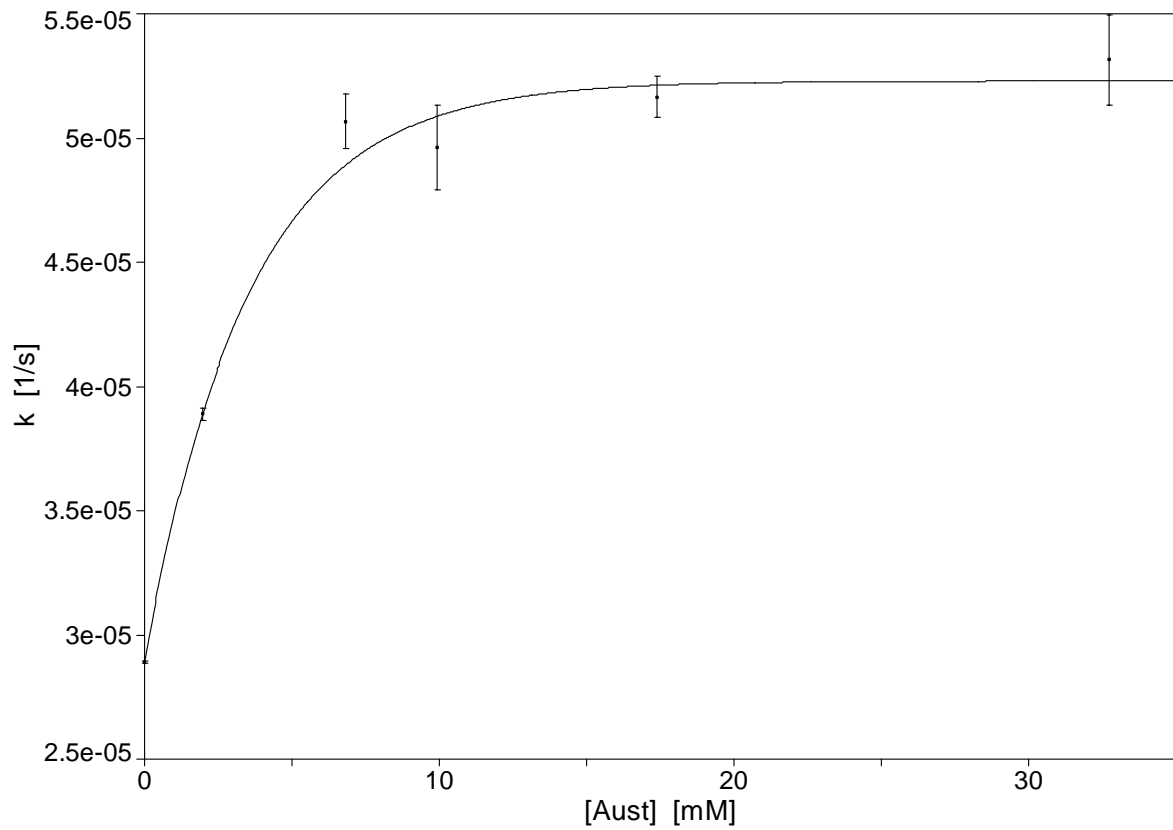


Abb. 106: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $6.91 \cdot 10^{-5}$  M Lösung von **57** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{max} = 253$  nm gemessen.

### 5.8.5.3 Wechselwirkung von **57** mit Natriumsulfat

Um sicherzustellen, dass es sich beim Zerfall in Gegenwart von Ionenaustauschern um keinen ionischen Effekt handelt, wurde der Zerfall der NONOate auch in Anwesenheit von Natriumsulfat gemessen. Folgende Tabelle gibt die Halbwertszeit des Zerfalles einer  $6.91 \cdot 10^{-5}$  M Lösung von **57** in Phosphatpuffer als Funktion der Natriumsulfatkonzentration wieder. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 253$  nm gemessen.

Tab. 20: Daten aus den Messungen für den Zerfall von **57** in Gegenwart von unterschiedlichen Natriumsulfat-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [mM]	<i>k</i> 10 <sup>-5</sup> [s <sup>-1</sup> ]	<i>t</i> <sub>1/2</sub> [min]
0	2.89 ± 0.005	399.5 ± 0.7
1.64	2.88 ± 0.007	400.5 ± 1
8.20	2.93 ± 0.04	394 ± 5
16.4	3.19 ± 0.09	362 ± 10

Bei diesen Messungen wurde ebenfalls darauf geachtet, dass sich der pH-Wert der Lösung nicht änderte. Es ist kein nennenswerter Effekt zu beobachten.

#### 5.8.5.4 Wechselwirkung von 58 mit Poly-(natriumacrylat) 70

Die Konzentration der NONOat-Maßlösung war  $1.01 \cdot 10^{-3}$  M an **58** in 0.01 M NaOH. In Tab. 21 werden neben den Konzentrationen und Halbwertszeiten des Zerfalls angegeben. Für die Auswertung bei mehreren gleichzeitigen Messungen mit dem Küvettenwechsler wurden die Werte bis 20 min vernachlässigt, da die Einhaltung der Temperatur bei der Vorbereitung der Messungen nicht gewährleistet war.

Tab. 21: Daten aus den kinetischen Messungen von **58** in Anwesenheit unterschiedlicher Poly-(natriumacrylat)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[ <b>70</b> ] [mM]	$k$ $10^{-5}$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
0	$1.77 \pm 0.006$	$651.1 \pm 2.1$
0.371	$2.00 \pm 0.03$	$576.8 \pm 8.2$
1.152	$2.56 \pm 0.02$	$450.6 \pm 4.4$
2.667	$2.78 \pm 0.04$	$415.4 \pm 6.4$
5.71	$2.82 \pm 0.04$	$409.6 \pm 5.5$
11.14	$2.80 \pm 0.03$	$412.5 \pm 4.9$
11.52	$2.82 \pm 0.02$	$409.6 \pm 2.8$

Die Halbwertszeit des Zerfalls als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 107 zu beobachten. Man erkennt eine Erniedrigung der Halbwertszeit

um den Faktor  $t_{1/2,\text{ohne}} : t_{1/2,[\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 650 : 334 = 1.95 : 1$ . Das entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 49 %.

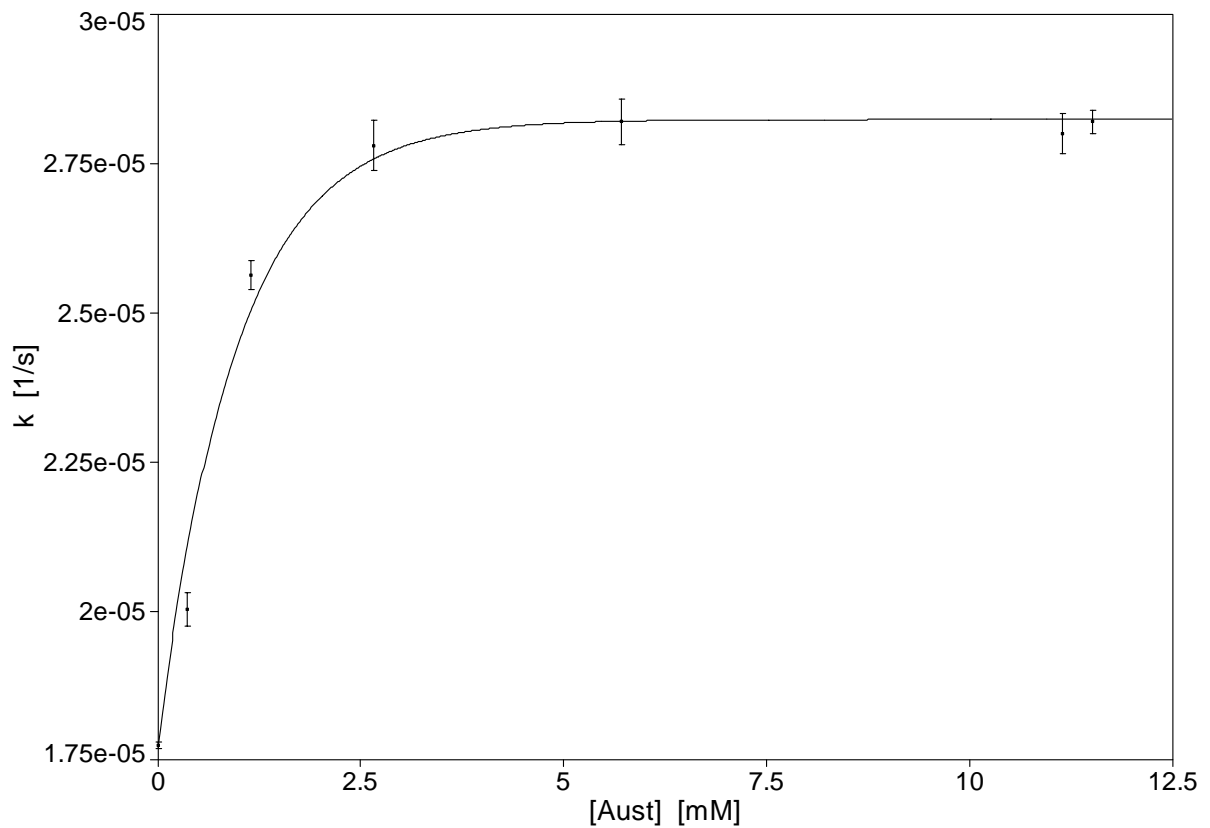


Abb. 107: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $1.01 \cdot 10^{-4}$  M Lösung von **58** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{max}} = 253$  nm gemessen.

### 5.8.5.5 Wechselwirkung von 58 mit Poly-(vinylsulfonsäure Natrium-salz) 71

Es wurde die Abhängigkeit der Halbwertszeit des Zerfalls von der Austauscher-Konzentration gemessen. Die folgende Tabelle gibt die nach der Auswertung erhaltenen Werte für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  und die Halbwertszeit wieder.

Tab. 22: Daten aus den kinetischen Messungen von 58 in Gegenwart von unterschiedlichen Poly-(vinylsulfonsäure Natrium-salz)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[71] [mM]	$k$ $10^{-5} [s^{-1}]$	$t_{1/2}$ [min]
0	$1.77 \pm 0.01$	$651.1 \pm 2.1$
1.99	$1.86 \pm 0.02$	$619.5 \pm 6.4$
6.84	$2.07 \pm 0.03$	$556.5 \pm 9.2$
9.93	$2.14 \pm 0.03$	$540.0 \pm 7.1$
17.4	$2.17 \pm 0.01$	$532.0 \pm 2.3$
32.7	$2.18 \pm 0.01$	$531.0 \pm 1.4$

Die Halbwertszeit des Zerfalls als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 108 zu beobachten. Man erkennt eine Erniedrigung der Halbwertszeit um Faktor  $t_{1/2, \text{ohne}} : t_{1/2, [\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 650 : 532 = 1.22 : 1$ . Dies entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 18 %.

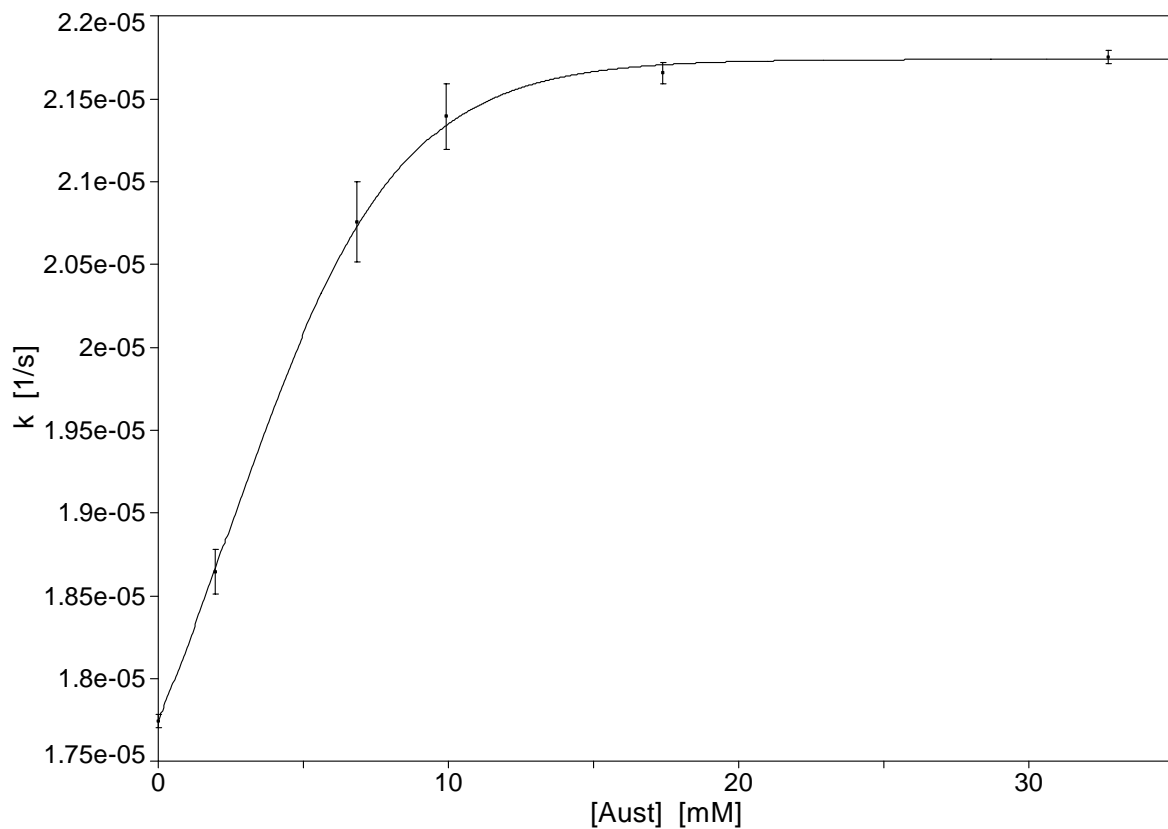


Abb. 108: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $1.01 \cdot 10^{-4}$  M Lösung von **58** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 253$  nm gemessen.

### 5.8.5.6 Wechselwirkung von 58 mit Natriumsulfat

Analog zu 5.8.5.3 wurde auch hier die Abhängigkeit der Halbwertszeit des Zerfalls von der Natriumsulfatkonzentration gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 23 zu finden.

Tab. 23: Daten aus den Messungen für den Zerfall von **58** in Gegenwart von unterschiedlichen Natriumsulfat-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] [mM]	<i>k</i> 10 <sup>-5</sup> [s <sup>-1</sup> ]	<i>t</i> <sub>1/2</sub> [min]
0	1.77 ± 0.01	651.1 ± 2.1
1.64	1.77 ± 0.01	652.5 ± 5.0
8.20	1.78 ± 0.03	651.1 ± 10.0
16.4	1.82 ± 0.01	635.7 ± 5.0

### 5.8.5.7 Wechselwirkung von **67** mit dem Austauscher Poly-(natriumacrylat)

Bei **67** handelt es sich um ein nach Literatur synthetisiertes NONOat. Die Konzentration der NONOat-Maßlösung betrug  $1.40 \cdot 10^{-3}$  M an **67** in 0.01 M NaOH. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 24 zu beobachten.

Tab. 24: Daten aus den kinetischen Messungen von **67** in Gegenwart unterschiedlicher Poly-(natriumacrylat)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[ <b>70</b> ] [mM]	$k$ $10^{-5}$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [min]
0	$0.978 \pm 0.022$	$1182 \pm 26$
0.371	$1.11 \pm 0.05$	$1035 \pm 49$
1.152	$1.64 \pm 0.05$	$705 \pm 21$
2.667	$1.94 \pm 0.05$	$595 \pm 14$
5.71	$2.18 \pm 0.03$	$530 \pm 6$
11.14	$2.19 \pm 0.02$	$526 \pm 5$
11.52	$2.20 \pm 0.03$	$525 \pm 7$

Die Halbwertszeit als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 109 zu beobachten. Man erkennt eine Erniedrigung der Halbwertszeit des Zerfalls um Faktor  $t_{1/2, \text{ohne}} : t_{1/2, [\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 1163 : 523.3 = 2.2 : 1$ . Dies entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 55 %.

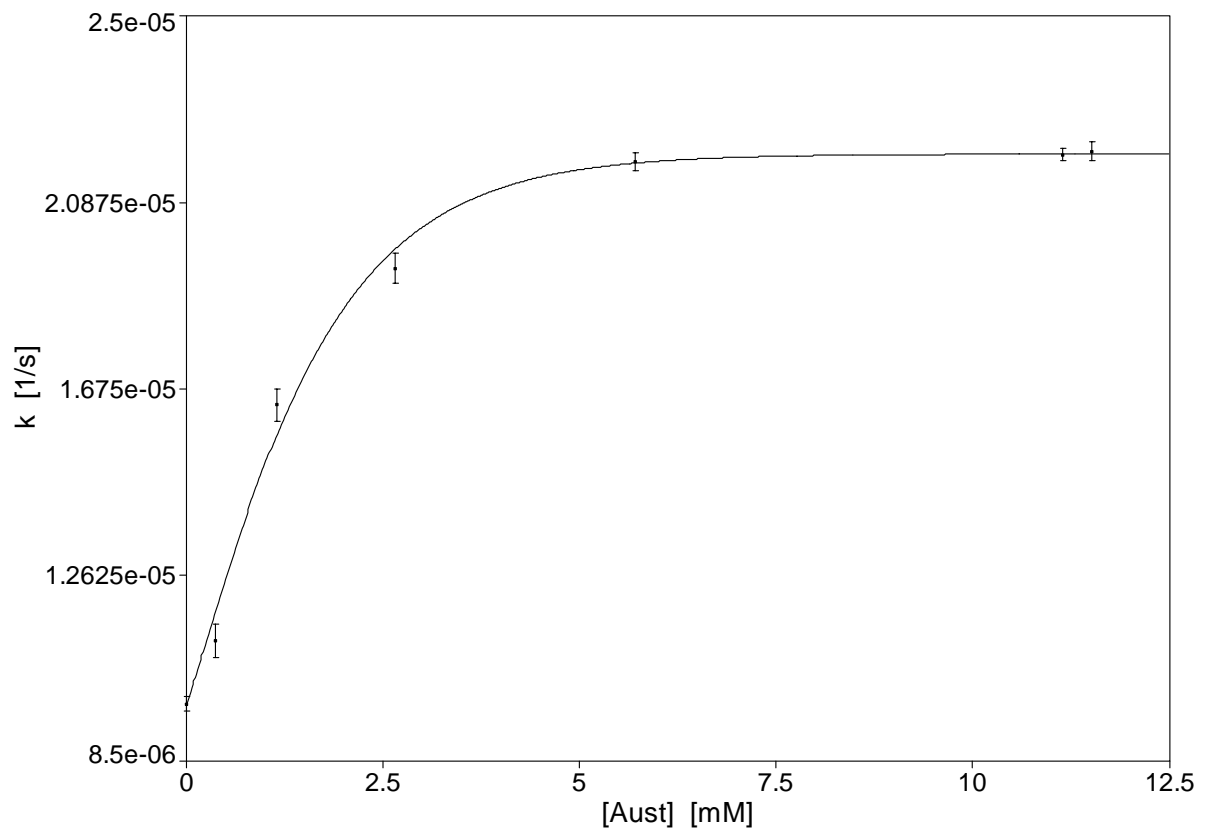


Abb. 109: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $1.40 \cdot 10^{-4}$  M Lösung von **67** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{max} = 253$  nm gemessen.

### 5.8.5.8 Wechselwirkung von 67 mit Poly-(natriumvinylsulfonat)

Tab. 25: Daten aus den kinetischen Messungen von 67 in Gegenwart von unterschiedlichen Poly-(vinylsulfonsäure Natriumsalz)-Konzentrationen. Es wurde bei einer Wellenlänge von 253 nm, in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen.

[Austauscher]	$k$	$t_{1/2}$
[mM]	$10^{-5} [s^{-1}]$	[min]
0	$0.98 \pm 0.02$	$1182 \pm 26$
1.99	$1.04 \pm 0.01$	$1109 \pm 12$
6.84	$1.14 \pm 0.01$	$1016 \pm 8$
9.93	$1.16 \pm 0.01$	$995 \pm 8$
17.4	$1.17 \pm 0.005$	$988 \pm 4$
32.7	$1.17 \pm 0.004$	$990 \pm 4$

Die Halbwertszeit des Zerfalls als Funktion der Austauscher-Konzentration ist in Abb. 110 zu beobachten. Man erkennt eine Erniedrigung der Halbwertszeit um Faktor  $t_{1/2, \text{ohne}} : t_{1/2, [\text{Austauscher}]_{\text{max}}} = 1163 : 985 = 1.2 : 1$ . Das entspricht einer Erniedrigung der Halbwertszeit um 15 %.

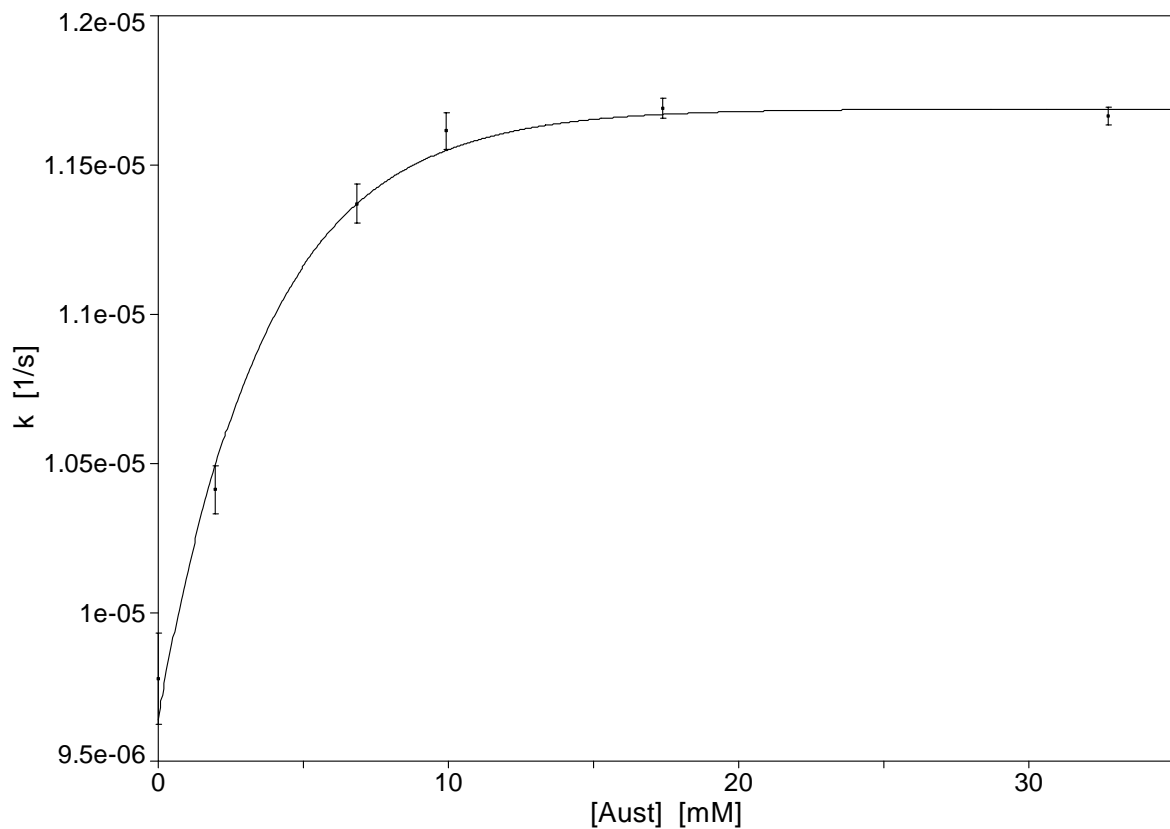
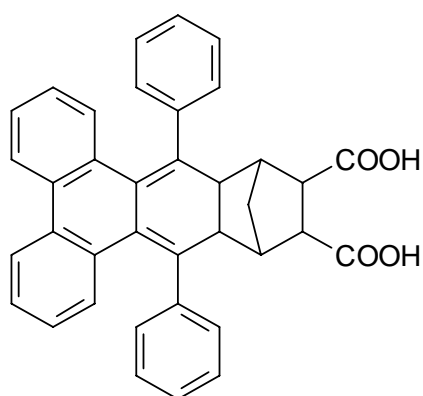
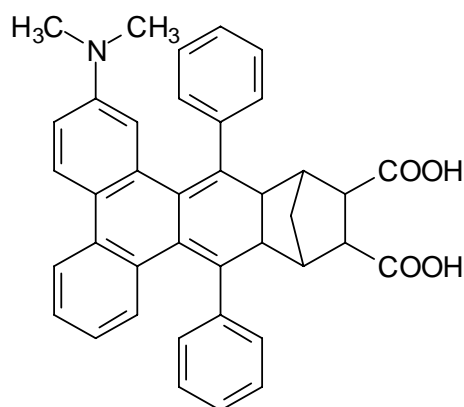


Abb. 110: Geschwindigkeitskonstante  $k$  als Funktion der Ionenaustauscherkonzentration für eine  $1.40 \cdot 10^{-4}$  M Lösung von **67** in Phosphatpufferlösung pH 7.4 und bei  $37.0 \pm 0.1$  °C. Die Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 253$  nm gemessen.

## 5.9 Fluoreszenz-Messungen

Ziel dieser Untersuchungen war es, mit Hilfe von Fluoreszenzsonden die Menge an freigesetztem Stickstoffmonoxid während des Zerfalls von *N*-Diazoniumdiolaten zu quantifizieren. Bei den Verbindungen **72** und **73** handelt es sich um Fluoreszenzsonden, die in der Lage sind, Stickstoffmonoxid direkt und quantitativ unter Bildung eines fluoreszenzfähigen Produkts abzufangen.<sup>[131-136, 145]</sup> Das Prinzip der FNOCT-Methode (Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap) wurde bereits in Kap. 3.7 ausführlich erklärt.

**72****73**

Bei den untersuchten NONOaten handelt es sich um die Verbindungen **57**, **58** und **64**. Verbindung **64** wurde bereits während der Diplomarbeit studiert und im Rahmen dieser Arbeit konnten die Messungen und Ergebnisse sowohl reproduziert als auch gesichert werden. **57** und **58** sind langlebige Stickstoffmonoxid-Donatoren aus der Familie der Guanidin-NONOate. Für die Messungen wurden hauptsächlich Phosphatpufferlösungen verwendet. **64** wurde bei einer Temperatur von  $22.0 \pm 2.0$  °C, während Verbindungen **57** und **58** bei  $37.0 \pm 0.1$  °C gemessen wurden.

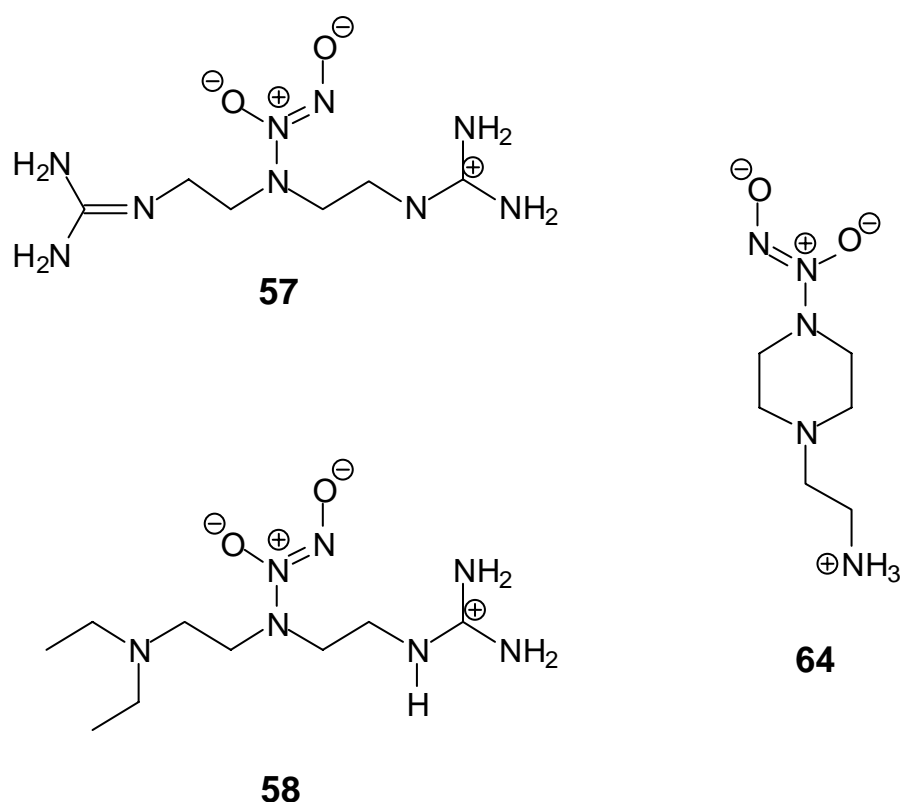


Abb. 111: Verwendete *N*-Diazoniumdiolate zur quantitativen Bestimmung der freigesetzten Menge an Stickstoffmonoxid während des Zerfalls mit Hilfe der FNOCT-Methode.

### 5.9.1 Herstellung der Fänger- und anderen verwendeten Stammlösungen

Die Konzentration von **72** und **73** in den Stammlösungen in DMSO betrug jeweils 5.0 mM. Zunächst wurde in einem zuvor ausgeheizten Stickstoffkolben die notwendige Menge an Fänger unter Schutzgas eingewogen und mit trockenem DMSO versetzt. Dann wurden die Lösungen aliquotiert und in kleinen Eppendorf-Behältern im Tiefkühlfach aufbewahrt. Kurz vor jeder Messung wurden die Behälter auf Raumtemperatur aufgetaut und die erforderliche Menge FNOCT-Lösung in DMSO mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und zu Phosphatpuffer gegeben.

Zusätzlich wurden als Reduktionsmittel eine 0.1 M Ascorbinsäure- und eine 5.0 mM Glutathion-Lösung verwendet. Bei der Anwendung von **73** war es not-

wendig ein Lösungsvermittler zu benutzen: 10proz. Pluronic F 127-Lösung in DMSO (200 mg Pluronic in 900 mL DMSO).

### 5.9.2 Herstellung der gesättigten wässrigen Stickstoffmonoxidlösung

Um sauerstofffreie Lösungsmittel zu erhalten, wurden 20.0 mL Wasser in ein Gefäß mit Bodenfritte überführt und ca. 30 - 45 min mit Argon bzw. Stickstoff gespült, anschließend wurde die Lösung mit Stickstoffmonoxid ca. 45 min begast. Im Vergleich zu anderen Gasen wie N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und CO besitzt Stickstoffmonoxid eine relativ niedrige Löslichkeit in Wasser ( $1.96 \cdot 10^{-3}$  M bei 25 °C und  $p_{\text{NO}} = 1$  atm).<sup>[146, 147]</sup> Die Proben wurden stets mit Hilfe einer Mikroliterspritze über ein Septum entnommen.

### 5.9.3 Bestimmung der aus 64 in Pufferlösung freigesetzten Menge an Stickstoffmonoxid mit dem Fänger 72

Verbindung **72** zeigte bereits Fluoreszenz, was auf eine teilweise Zersetzung des Fängers unter Ausbildung des Phenanthren-Chromophors hindeutete. Aus diesem Grund war eine Eichung mit Hilfe von wässrigen Lösungen bekannten Stickstoffmonoxid-Gehaltes notwendig.

#### 5.9.3.1 Kalibrierung der Fluoreszenzmessung

Die Kalibrierung der Fluoreszenzmessung erfolgte in Gegenwart von Ascorbinsäure mit Hilfe einer bei  $22.0 \pm 2.0$  °C gesättigten Stickstoffmonoxid-Lösung. Die Notwendigkeit der Ascorbinsäure ergab sich aus der Tatsache, dass

das Primärprodukt des Stickstoffmonoxidabfangs mit **72** ein Nitroxid-Radikal ist, das nicht fluoresziert und durch Ascorbinsäure zum Hydroxylamin reduziert werden muss. Verschiedene Konzentrationen an Ascorbinsäure wurden zunächst getestet, um eine reproduzierbare Kalibrierung zu erzielen: die Messungen mit einer Ascorbinsäurekonzentration von 50  $\mu\text{M}$  verliefen nicht zufrieden stellend, so dass die Ascorbinsäurekonzentrationen erhöht werden mussten. Erst bei einer Ascorbinsäurekonzentration von 1 mM konnten die Ergebnisse reproduziert werden.

In eine 3 mL Fluoreszenzküvette wurden 30  $\mu\text{L}$  einer 0.1 M Ascorbinsäure-Lösung (1 mM) und die für ein Gesamtvolumen von 3.0 mL berechnete Menge an Phosphatpuffer (pH 7.4) vorgelegt. Parallel dazu wurde mit Hilfe einer Mikroliter-spritze die gewünschte Menge an NO-Stammlösung entnommen und in die Phosphatpufferlösung gespritzt. Schließlich konnte die notwendige Menge an Stammlösung des Fängers **72** zugegeben werden. Tab. 26 zeigt die eingesetzten Mengen und Konzentrationen.

Tab. 26: Konzentrationen an Stickstoffmonoxid, Fänger und Ascorbinsäure bei der Kalibrierung der Fluoreszenzmessung bei einem pH-Wert von 7.4 und einer Temperatur von  $22.0 \pm 0.1$  °C.

NO-Lsg. [ $\mu\text{M}$ ]	Fänger <b>72</b> [ $\mu\text{M}$ ]	Ascorbinsäure [mM]
2.0	20.0	1.0
4.0	40.0	1.0
6.0	60.0	1.0
6.67	66.7	1.0

Die Messungen erfolgten mit einem zehnfachen Überschuss an Fänger **72**, um einen quantitativen Abfang des Stickstoffmonoxids zu gewährleisten.<sup>[134, 135]</sup>

Tab. 27 und Abb. 112 geben die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten in relativen Einheiten als Funktion der Stickstoffmonoxid-Konzentration wieder.

Tab. 27: Relative Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Stickstoffmonoxid (s. Tab. 26) zur Pufferlösung des Fängers 72.

NO-Lsg. [ $\mu\text{M}$ ]	Intensität
2.0	2785 $\pm$ 30
4.0	4016 $\pm$ 30
6.0	5463 $\pm$ 50
6.67	6212 $\pm$ 50

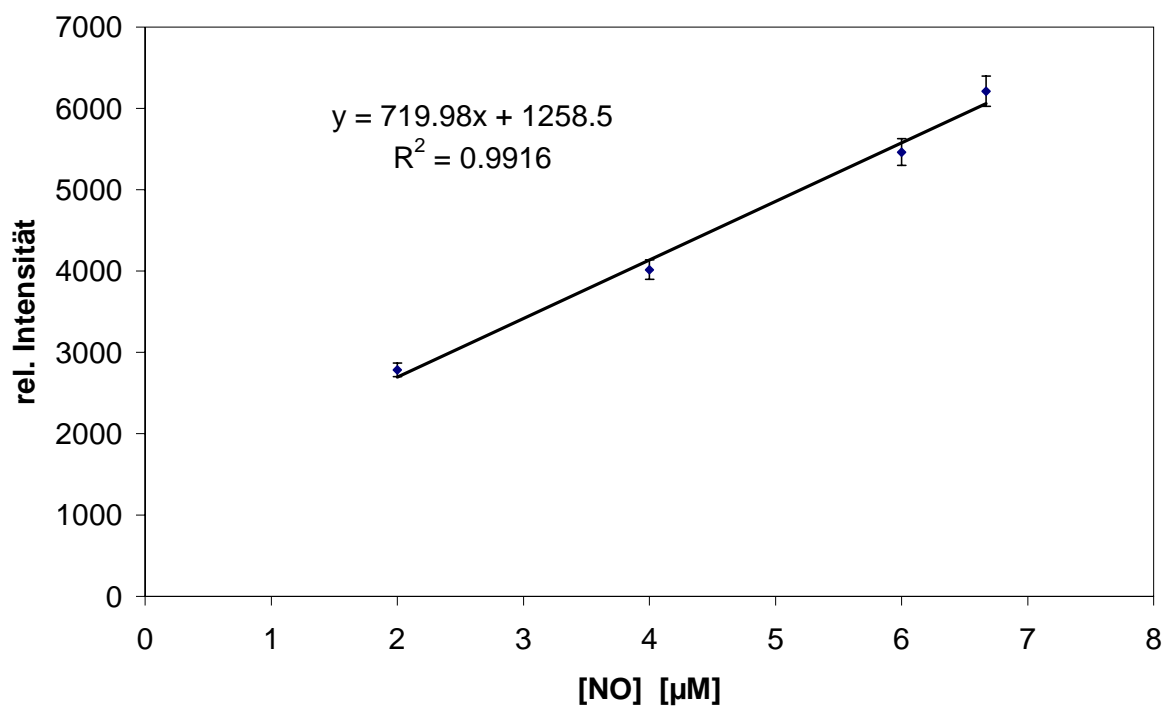


Abb. 112: Auftragung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Stickstoffmonoxid-Konzentration.

### 5.9.3.2 Zerfall von **64** in Anwesenheit des Fängers **72**

Die Konzentration an NONOat in den Stammlösungen betrug 0.98 mM in 0.01 M NaOH. Die Konzentration des NONOats während der Messungen war 5  $\mu$ M, während die Fänger-Konzentration 50  $\mu$ M betrug. Die Ascorbinsäure-Konzentration lag bei 1 mM. In Tab. 28 sind die verwendeten Konzentrationen noch mal aufgeführt.

Tab. 28: Konzentrationen der eingesetzten Verbindungen zur quantitativen Erfassung der aus **64** freigesetzten Stickstoffmonoxid-Menge in Phosphatpufferlösung (pH 7.4) bei  $22.0 \pm 2.0$  °C.

NONOat <b>64</b>	Fänger <b>72</b>	Ascorbinsäure
[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[mM]
5.0	50	1.0

Die Endfluoreszenz hat eine relative Intensität von 6690 - 6990, was einem Wert von 7.53 - 7.96  $\mu$ M NO entspricht. Daraus errechnet sich, dass pro mol NONOat **64** 1.50 - 1.59 mol NO-Moleküle abgespalten wurden. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, so dass das Ergebnis reproduziert werden konnte.

#### 5.9.4 Bestimmung der aus **57** und **58** in Pufferlösung freigesetzten Menge an Stickstoffmonoxid mit dem Fänger **73**

Die Bestimmung der freigesetzten NO-Menge für die NONOate **57** und **58** erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe der Fluoreszenzsonde **73**. Folgende Bedingungen wurden dabei gewählt: streng anaerobe Bedingungen mit Argon als Schutzgas bei einer immer konstant gehaltener Fänger-Konzentration ( $50 \mu\text{M}$ ). Als Reduktionsmittel wurde Glutathion ( $50 \mu\text{M}$ ) und als Lösungsvermittler eine 10 % Pluronic-Lösung verwendet. Die NONOat-Konzentrationen wurden zwischen  $12.5 - 75 \mu\text{M}$  variiert. Unter diesen Bedingungen sollte der Fänger maximal  $50 \mu\text{M}$  NO detektieren können, was zu einer maximalen Intensität führen musste. Sollten die NONOate **57** und **58** in der Lage sein Stickstoffmonoxid quantitativ freizusetzen, so sollte gemäß ihrer Stöchiometrie eine  $25 \mu\text{M}$ -NONOat-Konzentration die gleiche Fluoreszenzintensität erreichen.

Für die Messungen wurden temperierbare Küvetten (1mL) aus Quarzglas der Firma Hellma verwendet, die über einen Thermostaten der Firma Julabo mit VE-Wasser auf  $37.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert wurden.

##### *Messung von **57** mit dem Fänger **73***

Verbindung **57** besitzt eine Halbwertszeit von 400 min, gemessen mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Dieser Befund führte zu der Wahl von anderen pH-Werten, um die Messzeiten zu verkürzen. Optimale Bedingungen wurden in Phosphatpufferlösung bei einem pH-Wert von  $6.22 \pm 0.03$  gefunden. Die Temperatur betrug  $37.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Und unter streng anaeroben Bedingungen konnte bei diesem pH-Wert eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

Abb. 113 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bei unterschiedlich gewählten NONOat-Konzentrationen. Die Bedingungen wurden konstant gehalten, das heißt:  $50 \mu\text{M}$  Fänger **73** ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$ ) wurden in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von

50  $\mu\text{M}$  Glutathion als Reduktionsmittel und 10 % Pluronic als Lösungsvermittler verwendet.

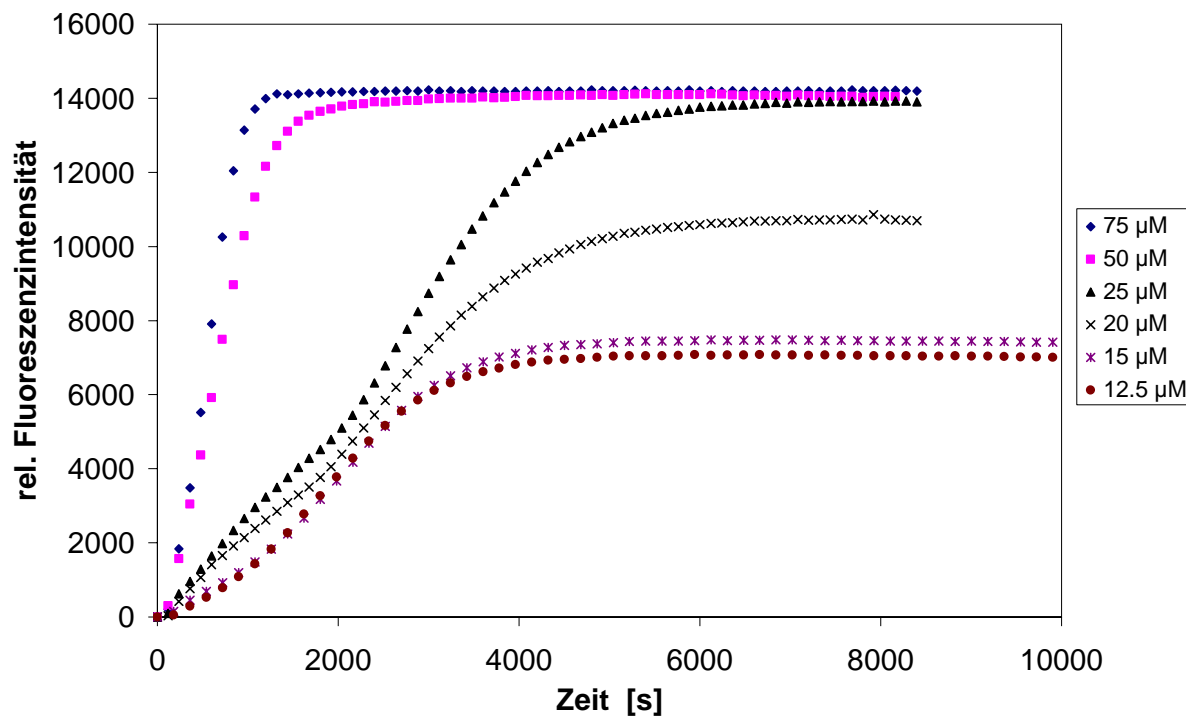


Abb. 113: Untersuchung des Zerfalls von **57** in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  **73** bei 37  $^{\circ}\text{C}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$ ) in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an **57** verwendet: -♦- 75  $\mu\text{M}$ , -■- 50  $\mu\text{M}$ , -▲- 25  $\mu\text{M}$ , -x- 20  $\mu\text{M}$ , -\* 15  $\mu\text{M}$  und -●- 12.5  $\mu\text{M}$ .

Tab. 29 zeigt die verwendeten NONOat-Konzentrationen und die dazugehörigen maximalen Fluoreszenzintensitäten unter den oben genannten Bedingungen. Bei NONOat-Konzentrationen von 50 und 75  $\mu\text{M}$  wurde die maximale Intensität erreicht, eine 25  $\mu\text{M}$  NONOat-Konzentration war ebenfalls in der Lage diese Intensität zu erreichen, so dass eine quantitative Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus **57** stattgefunden haben muss.

Tab. 29: Auflistung der maximalen Fluoreszenzintensitäten bei den Messungen von unterschiedlichen Konzentrationen an **57** in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  **73** bei 37 °C ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$ ) in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic.

NONOat <b>57</b> [ $\mu\text{M}$ ]	Fluoreszenzintensität
0	0
12	6970 $\pm$ 100
12.5	7000 $\pm$ 100
15	7500 $\pm$ 100
20	10700 $\pm$ 200
25	14000 $\pm$ 200
50	14300 $\pm$ 200
75	14200 $\pm$ 200

Die Auftragung der Fluoreszenzintensitäten als Funktion der NONOat-Konzentrationen (Abb. 114) zeigt eine lineare Korrelation, die durch den Achsen-schnittpunkt geht. Dies ist ein zusätzlicher Beweis für die quantitative Stickstoff-monoxid-Freisetzung aus **57**. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r^2 = 0.992$ . Aus der Korrelation ergibt sich der Wert von  $2.00 \pm 0.05 \text{ Mol NO pro Mol } \mathbf{57}$ .

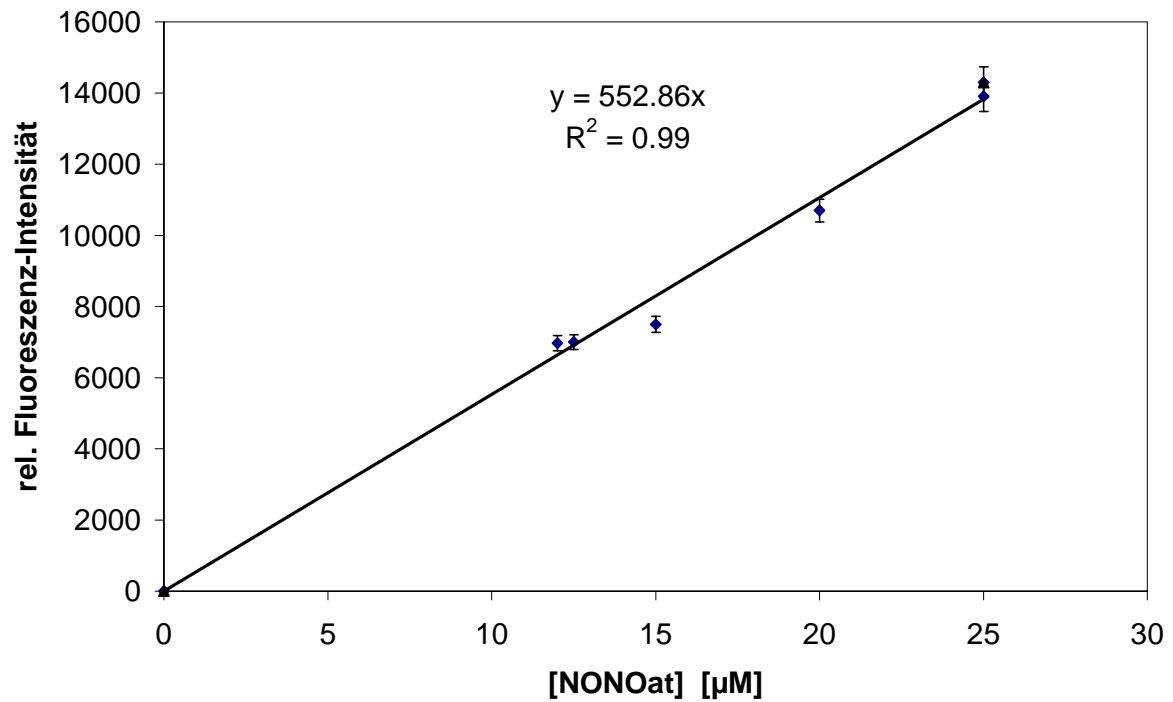


Abb. 114: Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der NONOat-Konzentration in Anwesenheit von 50 µM Fänger **73** bei 37 °C ( $\lambda_{exc} = 321$  nm,  $\lambda_{em} = 451$  nm), in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50 µM Glutathion und 10 % Pluronic. Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0.992$ .

### Messung von **58** mit dem Fänger **73**

Bei den Untersuchungen mit **58** wurden bis auf den pH-Wert die gleichen Bedingungen eingehalten, die für die Messungen mit **57** gewählt wurden. Der pH-Wert lag bei  $5.92 \pm 0.03$ , die Temperatur bei  $37.0 \pm 0.2$  °C. **58** besitzt eine Halbwertszeit von 670 min, gemessen mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie unter physiologischen Bedingungen (pH 7.36 und 37 °C).

Abb. 115 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit bei unterschiedlichen NONOat-Konzentrationen. Folgende Bedingungen wurden auch hier stets konstant gehalten: 50  $\mu\text{M}$  Fänger **73** ( $\lambda_{\text{exc}} = 321$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 451$  nm), gelöst in Phosphatpufferlösung (pH 5.92) unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Glutathion als Reduktionsmittel und 10 % Pluronic als Lösungsvermittler.

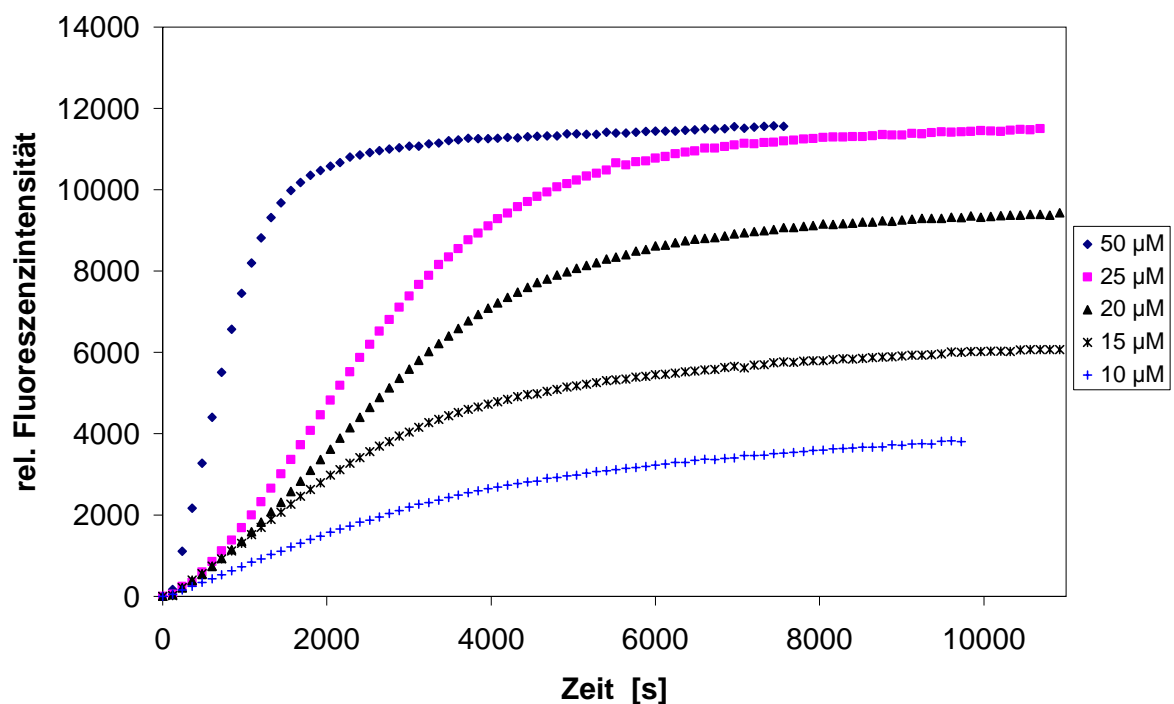


Abb. 115: Untersuchung des Zerfalls von **58** in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  **73** bei 37 °C ( $\lambda_{\text{exc}} = 321$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 451$  nm), in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an **58** verwendet: -♦- 50  $\mu\text{M}$ , -■- 25  $\mu\text{M}$ , -▲- 20  $\mu\text{M}$ , -x- 15  $\mu\text{M}$  und -\*- 10  $\mu\text{M}$ .

Tab. 30 gibt eine Übersicht über die verwendeten NONOat-Konzentrationen und die dazugehörigen maximalen Fluoreszenzintensitäten. Bei einer NONOat-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  wurde die maximale Intensität erreicht, eine 25  $\mu\text{M}$  NONOat-Konzentration konnte ebenfalls diesen Wert erreichen. Es sollte also auch in diesem Fall eine quantitative Freisetzung von Stickstoffmonoxid stattgefunden haben.

Tab. 30: Auflistung der maximalen Fluoreszenzintensitäten bei den Messungen von unterschiedlichen Konzentrationen an **58** in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  **73** bei 37 °C ( $\lambda_{\text{exc}} = 321 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$ ) in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic.

NONOat <b>58</b> [ $\mu\text{M}$ ]	Fluoreszenzintensität
0	0
10	4000 $\pm$ 100
15	6100 $\pm$ 100
10	9300 $\pm$ 100
25	11400 $\pm$ 200
50	11560 $\pm$ 200

Auch hier liefert die Auftragung der Fluoreszenzintensität als Funktion der NONOat-Konzentration (Abb. 116) eine lineare Korrelation, die durch den Achsen Schnittpunkt geht. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r^2 = 0.99$ . Aus diesen Daten ergibt sich ein Betrag von  $2.00 \pm 0.07 \text{ Mol NO pro Mol } \mathbf{58}$ , was ebenfalls für eine quantitative Freisetzung von Stickstoffmonoxid spricht.

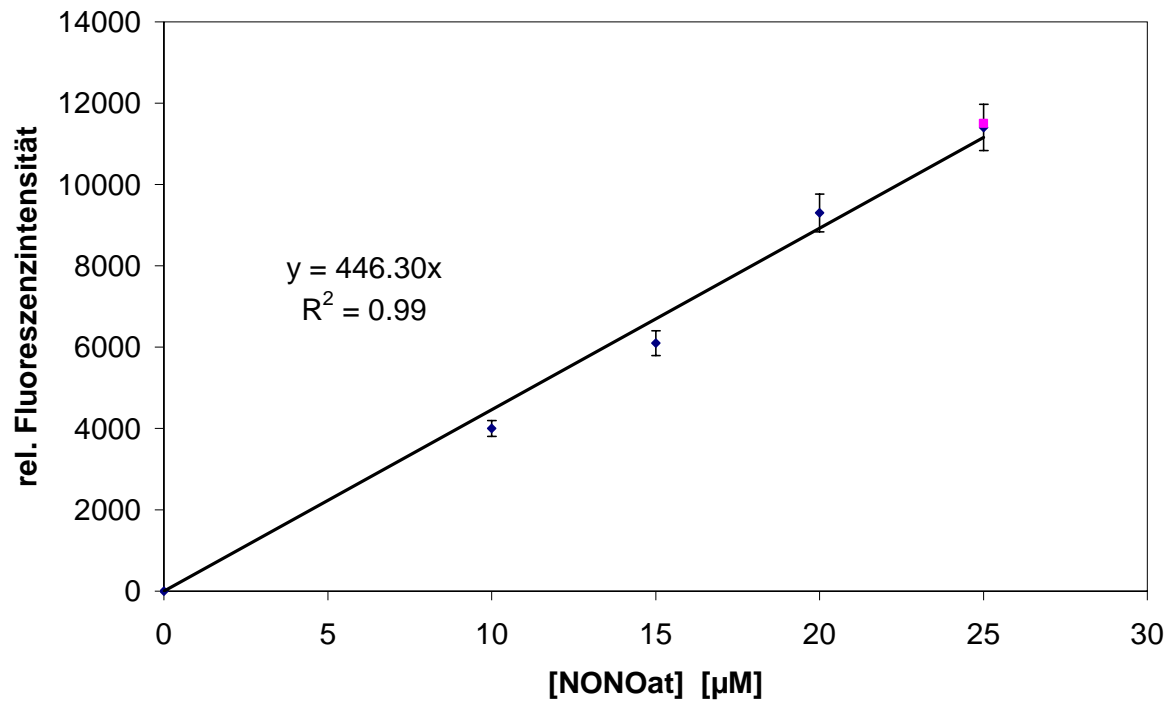


Abb. 116: Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der NONOat-Konzentration in Anwesenheit von 50 µM Fänger **73** bei 37 °C ( $\lambda_{exc} = 321$  nm,  $\lambda_{em} = 451$  nm), in Phosphatpufferlösung (pH 6.22) und unter Zusatz von 50 µM Glutathion und 10 % Pluronic. Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0.991$ .

## 5.10 Produktanalyse des Zerfalls von 1-(2-Aminoethyl)-piperazindiazoniumdiolat **64**

Die Produktanalyse des Zerfalles von 1-(2-Aminoethyl)-piperazindiazoniumdiolat **64** erfolgte sowohl vom Feststoff ausgehend als auch in Lösung mit Hilfe der GC, GC-MS und GC-IR. Es wurde unter aeroben und unter streng anaeroben Bedingungen (Schutzgas: Argon) gearbeitet.

### 5.10.1 Zerfall unter anaeroben Bedingungen

#### *Zerfall vom Feststoff ausgehend*

200 mg (1.06 mmol) **64** wurden in einem zuvor ausgeheiztem N<sub>2</sub>-Kolben überführt und unter einem leisen Ar-Strom stehen gelassen. Nach 7 Tagen bildete sich eine farblose Flüssigkeit, die mit Hilfe der Gas-Chromatographie (Säule: BPX35, Länge = 30 m, Durchmesser = 0.22 mm, Filmdicke = 0.25 µm) untersucht wurde. Es wurde nur eine Komponente, die auf Grund der Retentionszeit (Vergleich mit authentischem Amin) als 1-(2-Aminoethyl)-piperazin **64** identifiziert wurde. Die GC-MS- und GC-IR-Analysen bestätigten diesen Befund.

#### *Zerfall in Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.4)*

1.49 g (7.8 mmol) **64** wurden in 15 mL Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.4) gelöst und in einem Stickstoffkolben bei Raumtemperatur (22.0 ± 2.0 °C) unter einem leisen Ar-Strom stehen gelassen. Nach 18 h wurde die Probe mit Hilfe der GC unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, untersucht. Es wurden zwei Signale detektiert, von denen eines auf Grund der Retentionszeit (Vergleich mit authentischem Amin) als 1-(2-Aminoethyl)-piperazin **43** identifiziert wurde. Die GC-MS-Analyse bestätigte die Zuordnung. Durch Vergleich mit in den Bibliotheken zur Verfügung stehenden Daten konnte das Ausgangsamin eindeutig identifiziert werden.

Die zweite Verbindung konnte mit der GC-MS-Analyse nicht endgültig identifiziert werden. Die GC-IR-Spektroskopie ergab für diese Verbindung für Nitrosamine typische intensive Banden in den Bereichen:  $1473\text{--}1429\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{NO})$  und  $1056\text{--}1015\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{NN})$ .<sup>[35]</sup> Die gefundenen Banden befinden sich bei  $1489\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{NO})$  und  $982\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{NN})$ .

Flächenprozent: 79 % **43** und 20 % Nitrosamin **74**

Für das Ausgangsamin ergibt das GC-IR-Spektrum folgende Banden:

GC-IR [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2948  $\nu(\text{CH}_2)$ , 2818  $\nu(\text{C-NH}_2)$ , 1623  $\delta(\text{C-N-H})$ , 1453  $\delta(\text{CH}_2)$ , 1144  $\nu(\text{C-N})$ , 767  $\delta(\text{sek. N-H})$ .

Für das Nitrosamin wurden folgende Banden beobachtet (Abb. 117):

GC-IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2955  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , 2927  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ , 2815  $\nu(\text{N-CH}_2)$ , 1624  $\delta(\text{C-N-H})(\text{NH}_2)$ , 1489  $\nu(\text{NO})$ , 1449  $\delta(\text{CH}_2)$ , 1353  $\delta_{\text{wagging}}(\text{CH}_2)$ , 1139  $\nu(\text{CN})$ , 1076  $\nu(\text{NN})$ .

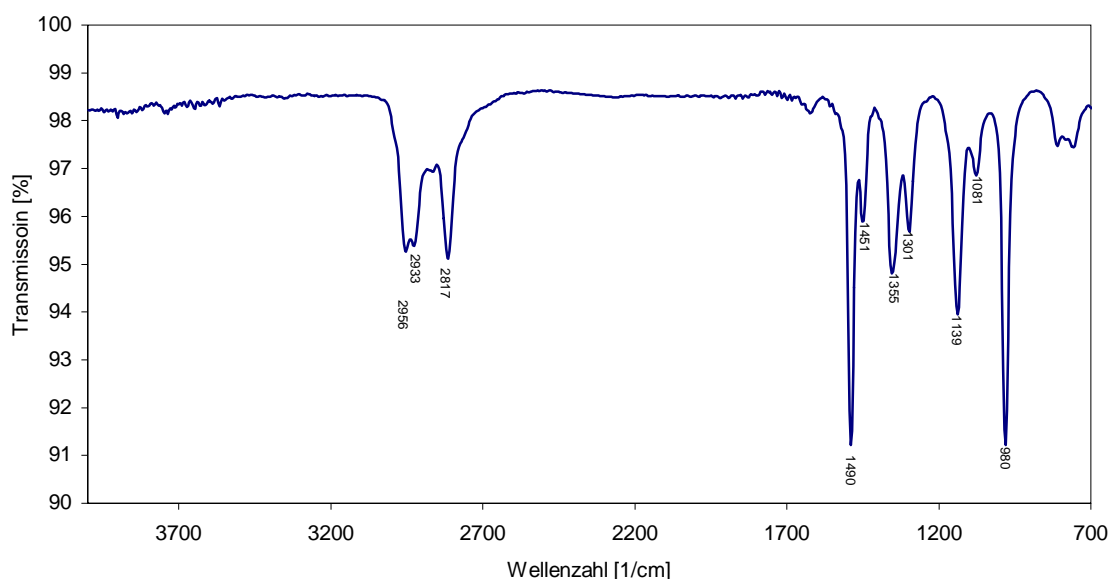


Abb. 117 : GC-IR-Spektrum des Nitrosamins aus dem Zerfall von **64** in Phosphatpufferlösung (pH 7.4).

In einem weiteren Versuch wurden 1.20 g (6.3 mmol) **64** 14 Tage unter ähnlichen Bedingungen zerfallen gelassen. Die Auswertung der GC- und GC-MS-

Analyse zeigte eine fast vollständige Zurückbildung des Ausgangsamins. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich das Nitrosamin zu Amin und salpetriger Säure zersetzt.

#### *Zerfall in Wasser*

100 mg (0.53 mmol) **64** wurden in 2.0 mL entgastem Wasser gelöst und in einem Stickstoffkolben bei Raumtemperatur ( $22.0 \pm 2.0$  °C) unter einem leisen Ar-Strom stehen gelassen. Nach 18 h wurde die Probe mit Hilfe der GC, GC-MS und GC-IR untersucht. Die Ergebnisse sind praktisch identisch zu den Analysen in Phosphatpuffer-Lösung.

Flächenprozent: 80 % **43** und 19 % Nitrosamin **74**

#### **5.10.2 Zerfall unter aeroben Bedingungen**

##### *Zerfall vom Feststoff ausgehend*

200 mg (1.06 mmol) **64** wurden in einem offenen Kolben bei Raumtemperatur ( $22.0 \pm 2.0$  °C) 7 Tage an der Luft stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Bildung eines gelb-braunen Rückstandes beobachtet. GC-Analysen ergaben eine Mischung aus mehreren Produkten. Als Hauptprodukt wurde durch Vergleich der Retentionszeiten mit authentischem Amin 1-(2-Aminoethyl)-piperazin **43** identifiziert. Als zweites Hauptprodukt ließ sich durch GC-MS und GC-IR-Analysen das Nitrosamin **74** erkennen.

Flächenprozent: 80 % **43** und 19 % Nitrosamin **74**

##### *Zerfall in Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.4) und Wasser*

Jeweils 200 mg (1.06 mmol) **64** wurden in 2 mL Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.4) und Wasser gelöst und in offenen Kolben bei Raumtemperatur ( $22.0 \pm 2.0$  °C) stehen gelassen. Nach 18 h wurden die Proben mit Hilfe der GC, GC-MS

und GC-IR untersucht. Es wurden hauptsächlich zwei Komponenten identifiziert: Ausgangsamin **43** und das Nitrosamin **74**.

Flächenprozent in Phosphatpuffer (pH 7.4): 80 % **43** und 20 % Nitrosamin **74**

Flächenprozent in Wasser: 80 % **43** und 20 % Nitrosamin **74**

### 5.10.3 NMR-spektroskopische Untersuchungen zum Zerfall von **64**

Die NMR-Spektroskopie wurde zur Aufklärung und Quantifizierung des Zerfallmechanismus vom **64** bei  $25.0 \pm 0.5$  °C herangezogen. Als externer Standard wurde 1,4-Dioxan verwendet. Beispielhaft wird hier eine Messung unter anaeroben Bedingungen in deuterierter Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) beschrieben. Sämtliche hier beschriebene Schritte erfolgten unter Schutzgas-Atmosphäre. Als erstes wurden die deuterierten Salze hergestellt und daraus die notwendigen Lösungen in D<sub>2</sub>O angesetzt. Die deuterierten Puffer-Lösungen wurden entgast.

23.3 mg (0.26 mmol) 1,4-Dioxan wurden in 2.0 mL *d*-Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) gelöst ([1,4-Dioxan] = 0.131 M). 18.9 mg (0.1 mmol) **64** wurden unter Schutzgas in ein NMR-Röhrchen gewogen und mit 1.0 mL der 1,4-Dioxan-Puffer-Lösung versetzt. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden nach 5, 36, 93, 133, 305 und 410 min aufgenommen. Bei der letzten Messung wurden zusätzlich <sup>13</sup>C- und Korrelationsspektren aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der <sup>13</sup>C-Signale wurden auf 1,4-Dioxan referenziert.

Beim Zerfall entstanden zwei Produkte: das Ausgangsamin **43** und das Nitrosamin des 1-(2-Aminoethyl)-piperazins **74**. Je ein Signal für das Amin und das Nitrosamin waren vorhanden, die frei von Überlagerungen waren. Diese wurden für die Auswertung der Spektren herangezogen. Bei diesen Signalen handelt es sich einmal um ein Triplett bei  $\delta = 4.25$  ppm (t, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, 2 H, H-5), das zum Nitrosamin gehört und ein weiteres Triplett bei  $\delta = 3.19$  ppm (t, <sup>3</sup>J = 5.1 Hz, 4 H, H-3, H-5), das dem Amin gehört. Das Singulett des 1,4-Dioxans ist bei  $\delta =$

3.70 ppm zu beobachten. In Abb. 118 ist das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nach 410 min zu beobachten.

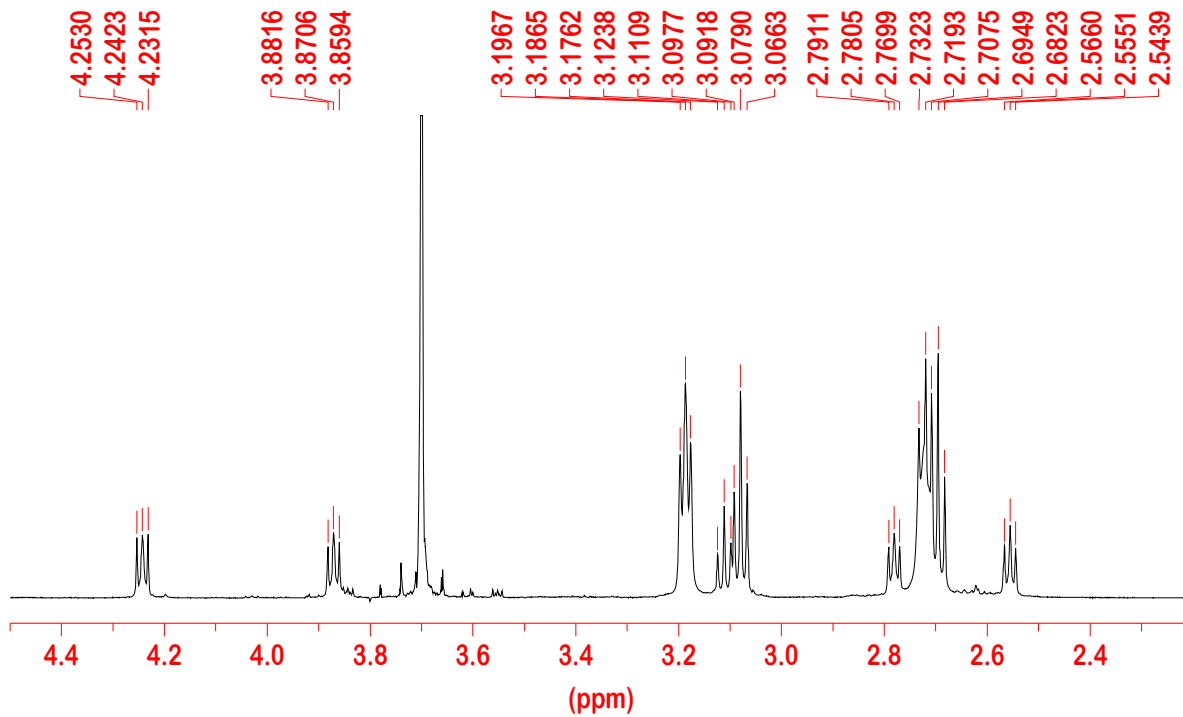
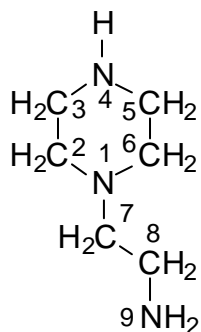


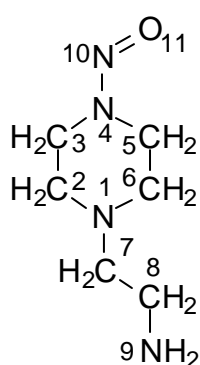
Abb. 118:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Zerfalls von **64** unter anaeroben Bedingungen in deuterierter Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) mit 1,4-Dioxan als Standard bei  $25.0 \pm 0.5$  °C nach 410 min.

Die Auswertung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums ergab:



$^1\text{H-NMR}$  (*d*-Phosphatpuffer (pD 7.2), 500 MHz):  $\delta = 2.69$  (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 2 H, H-7), 2.74 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 4 H, H-2, H-6), 3.08 (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 2 H, H-8), 3.19 (t,  $^3J = 5.1$  Hz, 4 H, H-3, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (*d*-Phosphatpuffer (pD 7.2), 125 MHz, bezogen auf 1,4-Dioxan = 66.65 ppm):  $\delta = 36.1$  (C-8), 43.3 (2 C, C-3, C-5), 49.4 (2 C, C-2, C-6), 53.9 (C-7)

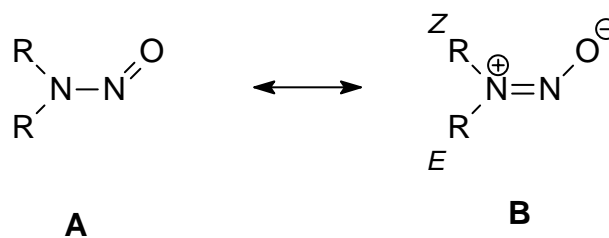


## 74

$^1\text{H-NMR}$  (*d*-Phosphatpuffer (pD 7.2), 500 MHz):  $\delta = 2.55$  (t,  $^3J = 5.5$  Hz, 2 H, H-2), 2.72 (t, 2 H, H-7), 2.78 (t,  $^3J = 5.3$  Hz, 2 H, H-6), 3.11 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2 H, H-8), 3.87 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2 H, H-3), 4.24 (t,  $^3J = 5.4$  Hz, 2 H, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (*d*-Phosphatpuffer (pD 7.2), 125 MHz, bezogen auf 1,4-Dioxan = 66.65 ppm):  $\delta = 36.28$  (C-8), 40.30 (C-5), 49.94 (C-3), 50.83 (C-7), 52.23 (C-6), 53.42 (C-2)

Bei der Zuordnung der Signale, die den C-3- und C-5-Atomen gehören, wurde die Literatur hinzugezogen.<sup>[148]</sup> Dabei zeigen die Spektren von zweifach substituierten *N*-Nitrosaminen aufgrund der Anwesenheit der mesomeren Formen **A** und **B** mit einem partiellen N=N-Doppelbindungscharakter getrennte Signale für die jeweiligen Substituenten. Man erwartet für den *Z*-ständigen Substituenten eine geringere chemische Verschiebung im Vergleich zu der des *E*-ständigen Substituenten.



Nach 410 min wurde ausgehend aus einer 0.1 M NONOat-Konzentration folgende Zusammensetzung gefunden:

Ausgangsammin **43**: 69 % (68.3 mM bezogen auf Standard)

Nitrosamin **74**: 31 % (31.3 mM bezogen auf Standard)

Sämtliche Messungen wurden nach dem gleichen Schema durchgeführt. Bei den Messungen unter aeroben Bedingungen wurde mit normalen luftgesättigten Lösungen gearbeitet. Tabelle 31 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 31: Zusammenfassung der quantitativen NMR-Messungen mit 1,4-Dioxan als Standard unter aeroben und anaeroben Bedingungen, sowohl in  $\text{D}_2\text{O}$  als auch in  $d$ -Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $25.0 \pm 0.5$  °C bezogen auf  $[\mathbf{64}] = 1$  M.

Lösungsmittel	Zerfallsbedingung	$n_{[\text{Amin}]} \mathbf{43}$	$n_{[\text{Nitrosamin}]} \mathbf{74}$
		[M]	[M]
$d$ -Phosphatpuffer	anaerob	0.70 – 0.80	0.20 – 0.30
$\text{D}_2\text{O}$	anaerob	0.70 – 0.80	0.20 – 0.30
$d$ -Phosphatpuffer	aerob	0.60 – 0.65	0.35 – 0.40
$\text{D}_2\text{O}$	aerob	0.60 – 0.65	0.35 – 0.40

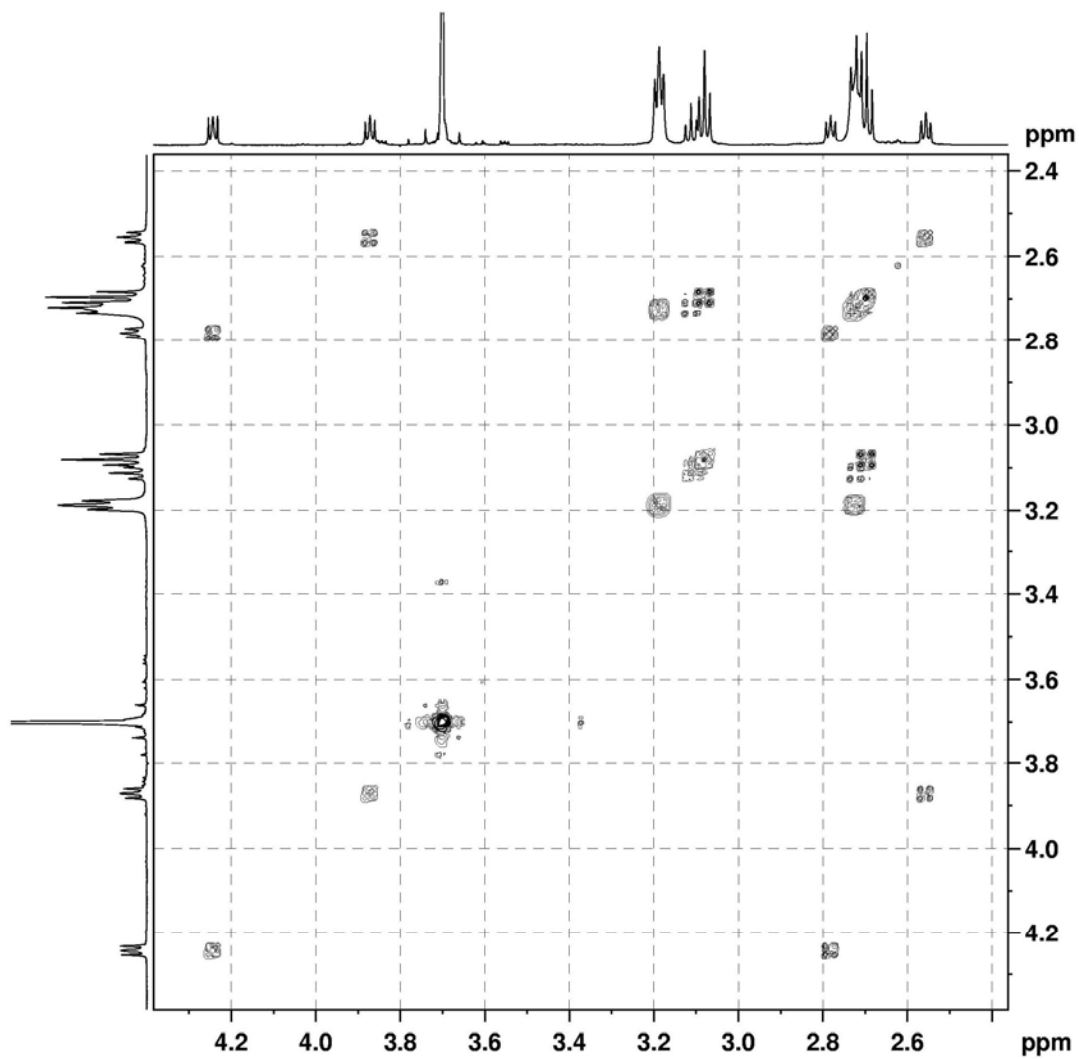


Abb. 119: 500 MHz  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY 90-Spektrum des Zerfalls von **64** in deuterierter Phosphatpuffer-Lösung (pD 7.2) bei  $25.0 \pm 0.5$  °C nach 410 min unter anaeroben Bedingungen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] R. F. Furchgott, J. V. Zadawski, *Nature* **1980**, 288, 373.
- [2] L. J. Ignarro, H. Lipton, J. C. Edwards, *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **1981**, 218, 739.
- [3] S. Moncada, R. M. J. Palmer, *Pharmacol. Rev.* **1991**, 43, 109.
- [4] E. Culotta, D. E. Koshland, *Science* **1992**, 258, 1862.
- [5] R. Rawls, *Chem. Eng. News* **1998**, 19, 13.
- [6] D. J. Stuehr, N. S. Kwon, C. F. Nathan, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6259.
- [7] M. Hecker, T. Billiar, *Methods in Nitric Oxide Research*, (Hrsg. M. Feelisch, J. S. Stamler), Willey-Verlag Chichester, **1996**.
- [8] P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A. Janczuk, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1091.
- [9] L. Keefer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, 43, 585.
- [10] I. L. Megson, *Drugs of the Future* **2000**, 25, 701.
- [11] Y. C. Hou, A. Janczuk, P. Wang, *Current Pharmaceutical Design* **1999**, 5, 417.
- [12] M. Feelisch, J. S. Stamler, *Methods in Nitric Oxide Research*, (Hrsg. M. Feelisch, J. S. Stamler), Willey-Verlag Chichester, **1996**.
- [13] J. Saavedra, T. Billiar, D. Williams, L. Keefer, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1947.
- [14] H. Davy, *Bibl. Br. Sci. Arts* **1802**, 20, 350.
- [15] E. Frankland, *Justus Liebig Ann. Chem.* **1856**, 99, 342.
- [16] J. Hrabie, L. Keefer, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1135.

- [17] J. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 76, 1176.
- [18] N. Furman, W. Mason, J. S. Pekola, *Anal. Chem.* **1949**, 21, 1328.
- [19] L. Francesconi, G. Cusmano, *Gazz. Chim. Ital.* **1909**, 3911, 115.
- [20] G. Southan, A. Srinivasan, C. George, L. Keefer, *Chem. Commun.* **1998**, 1191.
- [21] E. Müller, H. Metzger, *Chem. Ber.* **1956**, 89, 396.
- [22] F. Klages, H. Sitz, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 2606.
- [23] W. Traube, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, 29, 1884.
- [24] V. N. Yandovskii, G. M. Frolova, I. V. Tselinskii, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1982**, 18, 441.
- [25] V. N. Yandovskii, V. S. Kuznetsov, I. V. Tselinskii, G. M. Frolova, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1982**, 18, 445.
- [26] V. N. Yandovskii, T. I. Doshchechkin, I. V. Tselinskii, V. S. Kuznetsov, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1983**, 19, 427.
- [27] V. N. Yandovskii, B. V. Gidasov, I. V. Tselinskii, *Dokl. Chem. (Engl. Transl.)* **1986**, 289, 256.
- [28] V. N. Yandovskii, B. V. Gidasov, I. V. Tselinskii, *Dokl. Chem. (Engl. Transl.)* **1986**, 289, 278.
- [29] V. N. Yandovskii, B. V. Gidasov, I. V. Tselinskii, V. S. Kuznetsov, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1987**, 23, 7.
- [30] J. Hrabie, E. Arnold, M. Citro, C. George, L. Keefer, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5745.
- [31] D. W. Shoeman, H. T. Nagasawa, *Nitric Oxide* **1998**, 2, 66.
- [32] L. Chow, S. C. Chen, C. D. W. L., *Can. J. Chem.* **1970**, 48, 157.
- [33] K. S. Pillay, S. C. Chen, T. Mojelsky, L. Chow, *Can. J. Chem.* **1970**, 53, 3014.

- [34] H. H. Quon, L. Chow, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2349.
- [35] N. Y. Wang, F. T. Bonner, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 1863.
- [36] G. C. Lancini, E. Lazzari, A. Diena, *Farmaco. Ed. Sci.* **1969**, *24*, 169.
- [37] A. K. Tyagi, D. A. Cooney, *Adv. Pharmacol. Chemother.* **1984**, *20*, 69.
- [38] H. Iinuma, N. Yagisawa, S. Shibahara, Y. Suhara, S. Kondo, K. Maeda, et. al., *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 2099.
- [39] T. A. Bhat, W. Clegg, H. MAskill, W. Elsegood, E. D. Menner, P. C. Miatt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 1435.
- [40] T. A. Alston, D. J. T. Porter, H. J. Bright, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4069.
- [41] L. N. Kubrina, L. M. Yakubovich, A. F. Vanin, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.* **1988**, 844.
- [42] L. N. Kubrina, L. M. Yakubovich, A. F. Vanin, *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR (Engl. Transl.)* **1988**, 533.
- [43] A. F. Vanin, Y. P. Vedernikov, M. E. Galagan, S. M. Ignatov, L. N. Kubrina, I. V. Malenkova, P. I. Mordvintsev, R. G. Kostyanovskii, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.* **1991**, 136.
- [44] A. F. Vanin, Y. P. Vedernikov, M. E. Galagan, S. M. Ignatov, L. N. Kubrina, I. V. Malenkova, P. I. Mordvintsev, R. G. Kostyanovskii, *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 223269t.
- [45] A. D. McGill, W. Zhang, J. Wittbrodt, J. Wang, H. Schlegel, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 405.
- [46] A. T. Balaban, R. E. Garfield, M. J. Lesko, W. A. Seitz, *Org. Prep. Proceed. Int.* **1998**, *30*, 439.
- [47] D. S. Bohle, J. A. Imonigie, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5685.
- [48] E. Arnold, L. Keefer, J. Hrabie, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8421.
- [49] R. S. Drago, F. E. Paulik, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 96.

- [50] R. Longhi, R. O. Ragsdale, R. S. Drago, *Inorg. Chem.* **1962**, *i*, 768.
- [51] R. S. Drago, B. Karstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *83*, 1819.
- [52] R. S. Drago, B. Karstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1819.
- [53] R. S. Drago, R. O. Ragsdale, D. Eyman, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4337.
- [54] E. L. Reilly, US Patent 3153094, USA, **1964**.
- [55] E. L. Reilly, *Chem. Abstr.* **1965**, *62*, 5192.
- [56] C. M. Maragos, D. Morles, D. A. Wink, J. Saavedra, L. Keefer, e. al., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3242.
- [57] J. Hrabie, J. Klose, L. Keefer, D. A. Wink, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1472.
- [58] Y. P. Artsybasheva, I. V. Tselinskii, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1987**, *23*, 1056.
- [59] H. Zhang, G. Annich, J. Miskulin, M. E. Meyerhoff, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1485.
- [60] R. O. Ragsdale, B. Karstetter, R. S. Drago, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 420.
- [61] L. Keefer, J. Saavedra, e. al., *Nitric Oxide* **2001**, *5*, 377.
- [62] J. Saavedra, T. Dunams, J. Flippen-Anderson, L. Keefer, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6134.
- [63] J. Saavedra, L. Keefer, et. al., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3090.
- [64] L. R. Makings, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6282.
- [65] J. Saavedra, P. J. Shami, W. L. Y., K. M. Davies, L. Keefer, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 261.
- [66] X. Tang, M. Xian, M. Trikha, K. V. Honn, P. G. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2625.
- [67] X. Wu, X. Tang, M. Xian, P. G. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3779.

- [68] J. Saavedra, M. N. Booth, J. Hrabie, K. M. Davies, L. Keefer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5124.
- [69] J. Hrabie, J. Saavedra, J. E. Roller, L. Keefer, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 838.
- [70] K. A. Mowery, M. H. Schoenfish, J. Saavedra, L. Keefer, M. E. Meyerhoff, *Biomaterials* **2000**, *21*, 9.
- [71] J. Saavedra, D. L. Mooradian, K. A. Mowery, M. Schoenfish, M. Citro, K. M. Davies, M. E. Meyerhoff, L. Keefer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 751.
- [72] D. J. Smith, S. M. L., *J. Controlled Release* **1998**, *51*, 153.
- [73] D. C. Roselle, D. J. Smith, *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 747.
- [74] D. C. Roselle, D. J. Smith, *Controlled Release* **1998**, *51*, 131.
- [75] W. Rao, D. J. Smith, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1846.
- [76] K. S. Bohl, J. L. West, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2273.
- [77] K. M. Davies, D. Wink, J. Saavedra, L. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5473.
- [78] M. Reynolds, M. C. Frost, M. E. Meyerhoff, *Free Radical Biology & Medicine* **2004**, *37*, 926.
- [79] D. J. Smith, D. Chakravarthy, J. Hrabie, M. Citro, J. Saavedra, K. M. Davies, D. L. Mooradian, L. Keefer, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1148.
- [80] M. Batchelor, S. Reoma, P. S. Fleser, S. Merz, M. E. Meyerhoff, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5153.
- [81] S. Gagliardi, V. Arrighi, R. Ferguson, M. Telling, *Physica B* **2001**, *301*, 110.
- [82] K. A., J. F. Douglas, A. Nakatani, E. J. Amis, *Polymer* **2000**, *41*, 8455.
- [83] H. Zhang, G. Annich, J. Miskulin, S. Merz, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5015.

- [84] M. C. Frost, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1348.
- [85] J. H. Short, U. Biermacher, D. A. Dunnigan, T. Leth, *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 275.
- [86] J. H. Short, D. Darby, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 833.
- [87] J. H. Short, D. Darby, *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 848.
- [88] M. Villaroya, L. Gandía, M. G. López, A. García, J. Alvarez-Builla, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 1177.
- [89] C. Dardonville, R. Brun, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2296.
- [90] B. Rathke, *Ber.* **1881**, *14*, 1774.
- [91] L. C. Raiford, W. T. Daddow, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 1552.
- [92] F. L. Scott, D. G. O'Donovan, J. Reilly, *ibid.* **1953**, *75*, 4053.
- [93] J. Bell, *J. Chem. Soc.* **1926**, 1216.
- [94] G. W. Watt, R. G. Post, *Ind. Eng. Chem.* **1953**, *45*, 846.
- [95] G. Gattow, T. Kuhlmann, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1982**, *494*, 134.
- [96] C. L. Angell, N. Sheppard, A. Yamaguchi, T. Shimanouchi, T. Miyazawa, S. Mizushima, *Trans. Faraday Soc.* **1957**, *53*, 589.
- [97] M. Hesse, M. Maier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Georg Thieme-Verlag Stuttgart, **1995**.
- [98] H. Günzler, H. Bock, *IR-Spektroskopie*, 2. Auflage ed., VCH-Verlag Weinheim, **1990**.
- [99] S. T. Howard, J. A. Platts, M. Coogan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **2002**, *2*, 899.
- [100] S. Berger, S. Braun, H. Kalinowski, *NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen*, 2. Auflage ed., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1992**.
- [101] K. Kanamori, A. H. Cain, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4979.

- [102] K. Kanamori, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4698.
- [103] S. T. Howard, J. A. Platts, M. P. Coogan, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, *2*, 899.
- [104] S. Berger, S. Braun, H. Kalinowski, *15N-NMR-Spektroskopie*, 2. Auflage ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, **1992**.
- [105] P. Gund, *J. Chem. Educ.* **1972**, *49*, 100.
- [106] J. Klein, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2733.
- [107] T. Ohwada, A. Itai, T. Ohta, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7036.
- [108] T. Ohwada, A. Itai, T. Ohta, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2349.
- [109] N. S. Mills, J. Shapiro, M. Hollingsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1263.
- [110] L. Pauling, *The Nature of Chemical Bond*, 3rd. Edition, Cornell University Press Ithaca New York, **1960**.
- [111] T. Nishimura, K. Kitajama, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1590.
- [112] P. J. Taylor, A. R. Wait, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1986**, *11*, 1765.
- [113] W. J. Jones, *Trans. Faraday Soc.* **1959**, *55*, 524.
- [114] W. Marckwald, F. Struwee, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 457.
- [115] A. Horstmann, L. Menzel, R. Gäbler, A. Jentsch, *Nitric Oxide* **2002**, *6*, 135.
- [116] J. Hrabie, L. Keefer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1135.
- [117] L. Brinchi, P. Di Profio, R. Germani, G. Savelli, N. Spreti, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 930.
- [118] A. Marxer, K. Miescher, *Helv. Chim. Acta* **1951**, *34*, 924.
- [119] S. M. Kupchan, G. Bondesson, A. P. Davies, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 65.

- [120] H. Schultheiss, E. Fluck, *Z. Naturf.* **1977**, 32b, 257.
- [121] M. J. Akhtar, J. A. Balschi, F. T. Bonner, **1982**, 21, 2216.
- [122] P. K. Battacharyya, B. P. Dauley, *J. Chem. Phys.* **1973**, 59, 5820.
- [123] J. B. Lambert, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 4087.
- [124] Y. L. Chow, J. Polo, *Org. Magn. Reson.* **1981**, 15, 200.
- [125] J. Hrabie, J. E. Saavedra, *Org. Preparations and Procedures Int.* **1999**, 31, 189.
- [126] L. Keefer, *Chemtech.* **1998**, 28, 30.
- [127] D. L. Mooradian, T. C. Hutsell, L. K. Keefer, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1995**, 25, 674.
- [128] A. Dutton, J. Fukuto, K. N. Houk, *Inor. Chem.* **2004**, 43, 1039.
- [129] H. G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 915.
- [130] H. G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 891.
- [131] M. Bätz, H. G. Korth, R. Sustmann, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1555.
- [132] M. Bätz, H. G. Korth, R. Sustmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1501.
- [133] M. Bätz, *Doktorarbeit*, Universität-GH Essen, **1997**.
- [134] P. Meineke, *Doktorarbeit*, Universität-GH Essen, **1999**.
- [135] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. G. Korth, R. Sustmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1738.
- [136] V. Stennert, *Doktorarbeit*, Universität Essen, **2003**.
- [137] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menendez, R. Goodfellow, P. Granger, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40, 489.

- [138] G. J. Martin, M. L. Martin, J.-P. Gouesnard, *15N-NMR Spectroscopy*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1981**.
- [139] G. C. Levy, R. L. Lichter, *Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, John Wiley & Sons New York Chichester, **1979**.
- [140] A. Ramarmurthi, R. S. Lewis, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 408.
- [141] T. J. Hansen, A. F. Croisy, L. K. Keefer, *IARC Sci. Publ.* **1982**, *41*, 21.
- [142] Küster, Thiel, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, 103. Auflage ed., Walter de Gruyter Verlag Berlin, **1985**.
- [143] D. H. Williams, I. Fleming, *Strukturaufklärung in der Organischen Chemie*, 2. Auflage ed., Thieme Verlag Stuttgart, **1991**.
- [144] R. A. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 1607.
- [145] M. Bätz, H. G. Korth, P. Meineke, R. Sustmann, *Methods Enzymol.* **1998**, *301*, 532.
- [146] S. Snyder, *Nature* **1994**, *372*, 504.
- [147] J. N. Armor, *J. Chem. Eng.* **1974**, *19*, 82.
- [148] H.-O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *13C-NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1984**.

## 7 Anhang

Anhang 1: Verschiedene Stickstoffmonoxid-Donatoren und ihre Eigenschaften.<sup>[12]</sup> In dieser Tabelle befinden sich Informationen über Verbindungen bzw. Verbindungsklassen, die in der Lage sind Stickstoffmonoxid und verwandte Stickstoffoxide zu erzeugen. Die Stabilität/Reaktivität gegenüber Licht, Luftsauerstoff oder Wasser sowie die optimalen Lagerungsbedingungen werden ebenfalls aufgeführt.

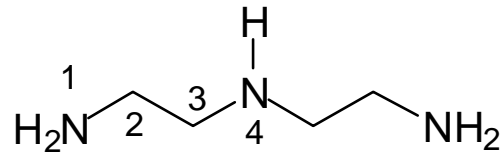
Verbindungs-klasse	Erzeugte NO-Spezies				Empfindlichkeit /Reaktivität			Lagerungsstabilität (Bedingungen)		
	NO	NO <sup>-</sup>	NO <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Licht	O <sub>2</sub>	Hydrolyse (pH)	reine Verbindung	Aufbewahrung in Lösung	Wasserlöslichkeit
NONOate (N-Diazeniumdiolate)	+	(+)	(+)	-	(+)	+	+	+	+	++
							(<10)	(unter Schutzgas, -80 °C)	(unter SG, 4 °C, pH ~ 12)	
<i>O</i> -Nitro und <i>O</i> -Nitrosoverbindungen										
Organische Nitrate	+	-	-	+	-	-	+(>7)	+(RT)	+(RT)	+, -
Organische Nitrite	+	-	+	-	-	-	+(<4, >7)	+(4 °C)	+(RT, org. Lösungsmittel)	-

*N*-Nitrosoverbindungen

<i>N</i> -Nitrosamine	+	-	(+)	-	+	-	(+)	+ (4 °C bis RT)	+ (4 °C)	+, -
<i>N</i> -Hydroxy- <i>N</i> -Nitrosamine	+	-	(+)	-	+	-	(+)	+ (4 °C)	+ (4 °C)	++
<i>N</i> -Nitrosamide und <i>N</i> -Nitrosoguanidine	+	-	(+)	-	+	-	+(<4, >7)	+ (-20 °C)	+ (4 °C, DMSO, EtOH)	+
<i>N</i> -Nitrosohydrazine	+	-	(+)	-	+	+	+ (<5)	+ (unter SG, -80 °C)	+ (unter SG, 4 °C)	+
<i>N</i> -Nitrosimine	+	+	(+)	-	+	-	?	+ (RT)	+ (4 °C)	(+)
Hydroxylamine	+	+	-	-	?	+	+ (>19)	+ (RT)	+ (unter SG, pH 6-9)	++
<i>N</i> -Hydroxyguanidine	+	+	-	-	?	?	+	+ (- 20 °C)	instabil	++

RT = Raumtemperatur, SG = Schutzgas, ++ = sehr gut, + = gut, (+) = wahrscheinlich, - = ungünstig, ? = unbekannt

Anhang 2: In D<sub>2</sub>O aufgenommene NMR-Spektren von Diethylentriamin.



<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): δ = 2.75 (t, AA'BB', 4 H, H-3), 2.84 (t, AA'BB', 4 H, H-2)

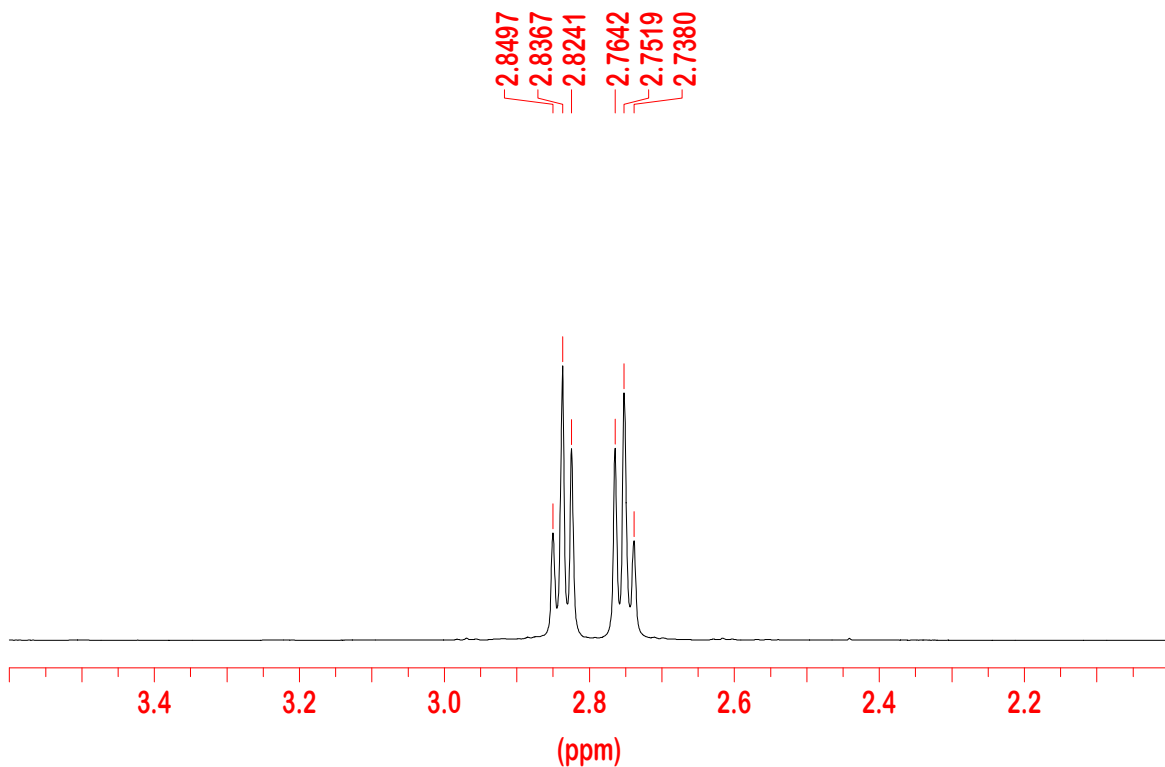


Abb. 120: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Diethylentriamin in D<sub>2</sub>O.

$^{13}\text{C}$ -NMR (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz):  $\delta = 40.4$  (2 C, C-3), 59.2 (2 C, C-2)

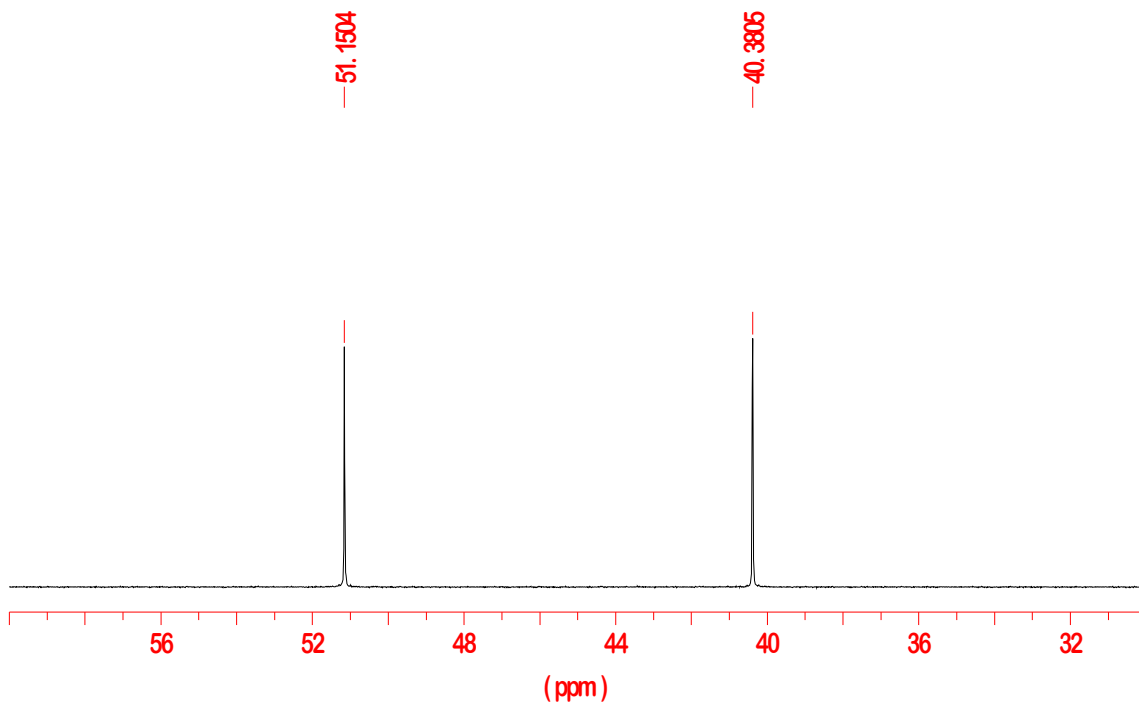


Abb. 121:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Diethylentriamin in  $\text{D}_2\text{O}$ .

$^{15}\text{N}$ -NMR (5 M NaOD in  $\text{D}_2\text{O}$ , Standard: extern 90 % Formamid in  $\text{DMSO-d}_6$   
= -267.6 ppm, 50.7 MHz):  $\delta = -360.8$  (2 N, N-1), -348.0 (N-4)

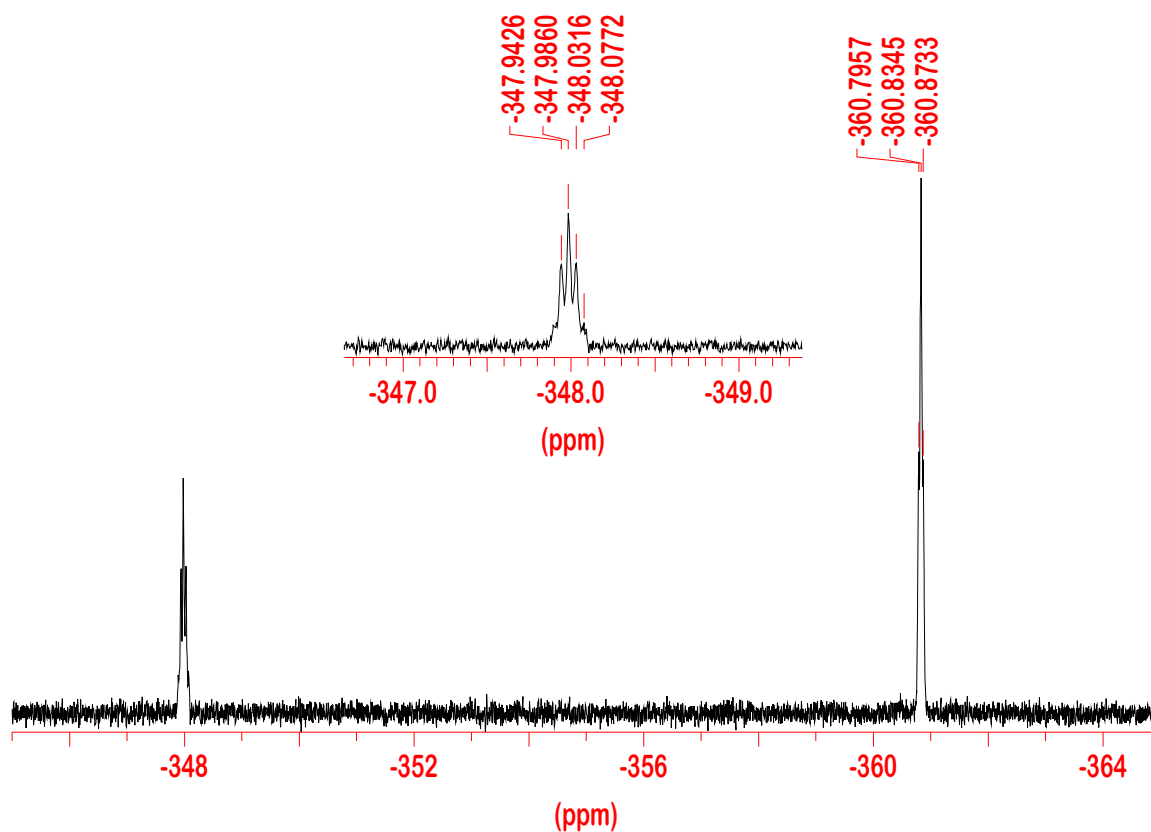
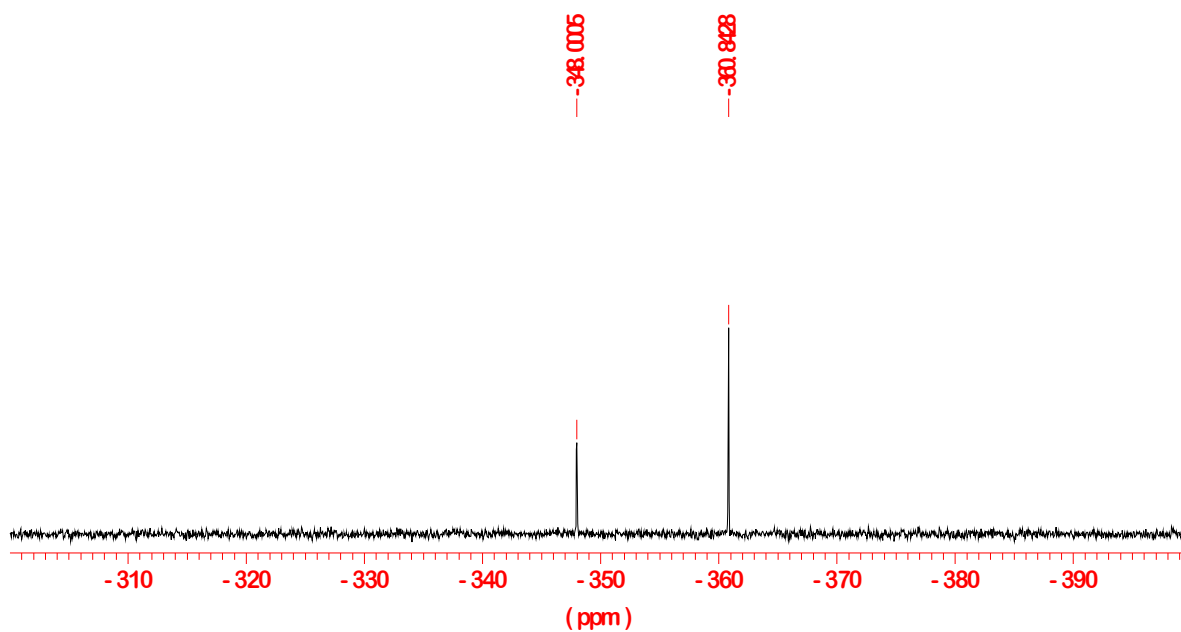


Abb. 122:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von Diethylentriamin in  $\text{D}_2\text{O}$ . Das untere Spektrum ist das entkoppelte Spektrum, mit dessen Hilfe die Zuordnung der Signale getroffen wurde



## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Tommy Pozo Vila  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: bolivianisch  
Geburtsdatum: 14.09.1971  
Geburtsort: La Paz - Bolivien

### Ausbildung

1977 – 1988 Besuch der Jesuitenschule „San Ignacio“ mit dem Abschluss „Abitur in allgemeiner Hochschulreife“  
La Paz - Bolivien

1989 – 1990 Besuch der Militärischen Hochschule „Jose Antonio de Sucre“  
Fachrichtung: Allgemeine Ingenieurwissenschaften  
La Paz - Bolivien

1989 – 1990 Wehrdienst an der Militärischen Hochschule  
La Paz - Bolivien

1990 Bewerbung und Gewinn des Förderungsprogramms für Führungskräfte der Carl Duisberg Gesellschaft. Stipendium von 1990 bis 1999

August 1990 Einreise in die Bundesrepublik Deutschland

August – Oktober 1990 Sprachkurs  
Saarbrücken und Radolfzell am Bodensee

Oktober 1990 – Juli 1991 Praktikum bei der Firma Röhm  
Darmstadt

Oktober 1991 – Februar 1992 Besuch des Studienkollegs  
Fachrichtung: Allgemeine Hochschulreife  
Schwerpunkt: Technik  
Krefeld

Sommersemester 1992 Einschreibung an der Universität GH-Essen

Oktober 1992 – März 2000 Studium der Chemie DI (Chemie-Ingenieurwesen) und Chemie DII (Chemie) an der Universität GH-Essen

Juni 1995 Diplom-Chemie-Ingenieur-Vorprüfung

Januar 1996 Diplom-Chemiker-Vorprüfung

Juni 1999 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung

Juli 1999 – Februar 2000 Diplomarbeit im Fach Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. R. Sustmann  
Thema: Synthese und Charakterisierung von konformativ stabilisierten NONOaten

Januar 2000 Diplom-Chemie-Ingenieur-Hauptprüfung

Juni 2000 Beginn der Promotion zum Dr. rer. nat.  
Thema: Synthese und Untersuchung von neuen *N*-Diazeniumdiolaten (NONOate)