

**Spinmarkierung pharmazeutischer Wirkstoffe
– sowie –
deren Bindungseigenschaften an Serum Albumin
vom Menschen**



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades

„Diplom-Chemiker“

des Fachbereichs Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Till Hauenschild

aus

Göttingen

September 2013

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von PD Dr. D. Hinderberger und Prof. Dr. H.-W. Spiess in der Zeit von Dezember 2012 bis September 2013 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz angefertigt.

Meinen Eltern und Großeltern

„Der Mensch kann in seinem kurzen und gefahrenreichen Leben einen Sinn nur finden, wenn er sich dem Dienst an der Gesellschaft widmet.“

Albert Einstein, deutsch-amerikanischer Physiker

14. März 1879 - 18. April 1955

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Pharmakologischer Nutzen verwendeter Wirkstoffe.....	4
2.1.1	Analgetika	4
2.1.2	Antikoagulantien	5
2.1.3	Narkotika.....	6
2.1.4	Urikostatika	6
2.1.5	Urikosurika	7
2.1.6	Zytostatika	7
2.1.7	Steroidhormone.....	8
2.1.8	Vitamine	8
2.1.9	Antiauxine	9
2.2	Spinmarkierung via Steglich-Veresterung	10
2.3	ESR-Spektroskopie.....	12
2.3.1	Einführung	12
2.3.2	Der Elektronenspin – ein quantenmechanisches Phänomen.....	12
2.3.3	Resonanzbedingung des freien Elektrons	13
2.3.4	CW-ESR-spezifische Wechselwirkungen.....	14
2.3.5	Auswirkungen der Rotationskorrelationszeit auf TEMPO-Spektren.....	19
2.3.6	Funktionsweise eines CW-ESR-Spektrometers.....	22
2.3.7	Nitroxidradikale zur Spinmarkierung via Steglich-Veresterung.....	25
2.3.8	Resonanzbedingung für Nitroxide und Entstehung des Nitroxidspektrums.....	27
2.4	Scatchard-Analyse.....	28
3.	Experimenteller Teil	31
3.1	Allgemeines	31
3.1.1	Materialien.....	31
3.1.2	Charakterisierungsmethoden.....	31
3.2	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Analgetika.....	34
3.2.1	2-Acetoxybenzoesäure(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-4-yl)ester (ASS-TSL).....	34
3.2.2	2-Hydroxybenzoesäure(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-4-yl)ester (SAL-TSL).....	36

3.2.3	(S)-(+)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-4-yl)ester (IBU-TSL).....	39
3.2.4	(S)-(+)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-4-yl)ester (NPX-TSL).....	40
3.2.5	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure(N-acetyl-4-aminophen-yl)ester (PCM-TSL).....	42
3.2.6	2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (DCF-TSL).....	45
3.2.7	2-[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl]essigsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (IMC-TSL).....	47
3.3	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Antikoagulantien.....	48
3.3.1	Isolierung von Phenprocoumon aus Marcumar®	48
3.3.2	2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2-oxo-3-[(RS)-1-phenylpropyl]-2 <i>H</i> -chromen-4-yl]ester (PPC-TSL).....	49
3.3.3	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2-oxo-3-[(RS)-3-oxo-1-phenylbutyl]-2 <i>H</i> -chromen-4-yl]ester (WFR-TSL).....	51
3.3.4	2-Oxo-2 <i>H</i> -chromen-3-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (CCS-TSL).....	52
3.4	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Narkotika.....	54
3.4.1	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure(2,6-diisopropylphenyl)ester (PPF-TSL).....	54
3.5	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Urikostatika.....	55
3.5.1	Isolierung von Febuxostat aus Adenuric®	55
3.5.2	(3-Cyan-4- isobutyloxyphenyl)-4-methylthiazol-5-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (FBS-TSL).....	56
3.6	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Urikosurika.....	58
3.6.1	4-(Dipropylsulfamoyl)benzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (PBC-TSL).....	58
3.6.2	2,2,6,6-Tetrapiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2,6-dibrom-4-(2-ethylbenzofuran-3-carbonyl)phenyl]ester (BBR-TSL).....	61
3.7	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Zytostatika.....	63
3.7.1	4-[Bis(2-chlorethyl)amino]benzenbutansäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (CBL-TSL).....	63
3.8	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Steroidhormone.....	65

3.8.1	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]ester (CSO-TSL).....	65
3.8.2	2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-10,13-dimethyl-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]ester (TSO-TSL).....	67
3.9	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Vitamine.....	68
3.9.1	2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(2R)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl]ester (DVE-TSL).....	68
3.9.2	Pyridin-3-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (VB3-TSL).....	70
3.9.3	5-[(3aS,4S,6aR)-2-Oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentansäure (2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl-4-yl)ester (VB7-TSL).....	71
3.9.4	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanyl]ester (VD3-TSL).....	73
3.9.5	2,2,6,6- Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-7a-methyl-1-[(E,1R,4R)-1,4,5-trimethylhex-2-enyl]-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanyl]ester (VD2-TSL).....	75
3.10	Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Antiauxine.....	76
3.10.1	2,3,5-Triiodbenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (TIB-TSL).....	76
4.	Auswertung und Diskussion der Messergebnisse.....	80
4.1	Allgemeines.....	80
4.1.1	Probenpräparationen.....	80
4.1.2	Technische Details zur Aufnahme der CW-ESR-Spektren.....	87
4.1.3	Analyse der experimentellen CW-ESR-Spektren via Simulation in EasySpin.....	87
4.1.4	Analytisches Vorgehen bei der Simulation von Mehrkomponentenspektren.....	88
4.1.5	Spektrale Zusammensetzung der gemessenen 2- bzw. 3-Komponentenspektren.....	89
4.2	Prüfung von Bindungs- und LM-Einflüssen auf Serum Albumin.....	91
4.2.1	HSA-Bindungseinfluss verwendeter TEMPO-Derivate.....	91
4.2.2	Lösungsmittel-Einflüsse auf HSA in wässriger Umgebung.....	93

4.2.3	Mechanistische Deutung der TSL-Aufnahme durch HSA.....	95
4.3	CW-ESR-Bindungsstudien TEMPO-modifizierter Pharmazeutika.....	97
4.3.1	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Analgetika.....	98
4.3.2	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Antikoagulantien.....	109
4.3.3	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Narkotika.....	113
4.3.4	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Urikostatika.....	114
4.3.5	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Urikosurika.....	116
4.3.6	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Zytostatika.....	118
4.3.7	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Steroidhormone.....	120
4.3.8	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Vitamine.....	122
4.3.9	Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Antiauxine.....	127
4.4	Abschließende Diskussion der Messergebnisse aller CW-ESR-Studien.....	129
5.	Zusammenfassung/Ausblick.....	134
6.	Literaturverzeichnis.....	138
	Anhang.....	146
	A. Symbole und Abkürzungen.....	146
	B. Danksagung.....	155
	C. Posterpräsentationen.....	157
	D. Eidesstattliche Erklärung.....	158

1. Einleitung und Zielsetzung

Bei Serum Albumin (Human Serum Albumin, kurz: HSA; graphisch visualisiert in Abb. 1, verwendete pdb-ID: 2BXM gemäß [14]) handelt es sich neben den Globulinen um das am häufigsten vertretende Transportprotein im menschlichen Blutplasma. Es regelt viele endogene Prozesse des Organismus und dient u.a. als Wirkstoffträger vieler pharmazeutischer Substanzen (s. Abb. 1).

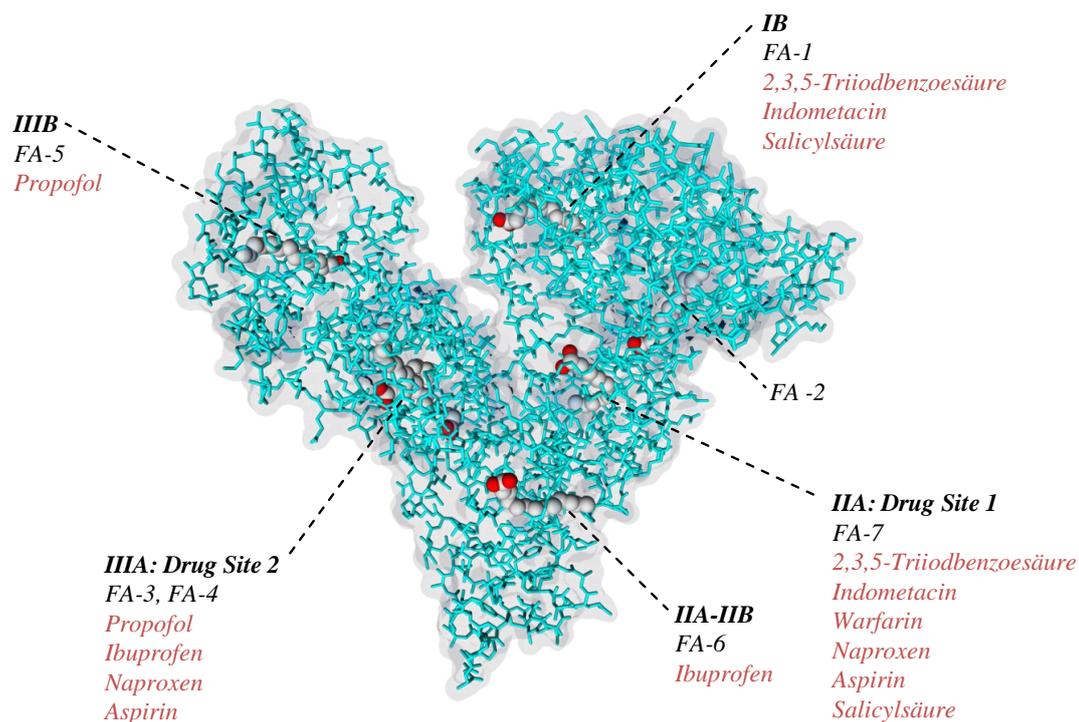


Abb. 1: Übersicht über literaturbekannte HSA-Bindungsstellen anhand röntgenkristallographischer Untersuchungen einiger bzgl. Kap. 3.2 ff. zur Synthese der TEMPO-Ester eingesetzten Wirkstoffe^[10, 11, 12, 14]. Der kristallographischen Nachweise erfolgten meist unter Beimischung von Myristinsäure, d.h. als HSA-Myristat-Ligandkomplex. Abgebildet sind die an Fettsäuren (kurz: FS, engl. FA) orientierten Bindungspositionen, die die meisten pharmazeutischen Liganden ebenfalls nutzen. Zur Verdeutlichung der Örtlichkeit der Ligand-HSA-Bindung wurden die insgesamt sieben möglichen Bindungsstellen, welche für Fettsäuren charakteristisch sind, jeweils durch Myristinsäure belegt. Die C-Atome von Myristinsäure sind mit hellgrau, die O-Atome mit rot gekennzeichnet worden.

Neben bisherigen Untersuchungsmethoden zur Ligand-Bindung unzähliger Wirkstoffe an Proteine, wie bspw. FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), XRD (Röntgenbeugung, engl. *X-ray Diffraction*) oder ITC (Isotherme Titrationskalorimetrie), eröffnet die ESR-Spektroskopie mit einer Vielfalt unterschiedlicher intrinsischer Untersuchungsmethoden, wie z.B. die

CW-ESR- oder die im modernen Zeitalter in Mainz mitentwickelte Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz-Methode (kurz: DEER, engl. *Double Electron Electron Resonance*) [23, 24], durch welche sich im Gegensatz zu der in den 40-iger Jahren entwickelten (CW)-ESR-Methode [28] im Idealfall der genaue Abstand zwischen zwei Elektronenspins¹ ermitteln lässt und somit Lokalitätsbestimmungen gebundener Wirkstoffe im Protein realisiert werden können, ein weitreichend neues Feld um Ligand-Protein-Bindungsstudien² einerseits qualitativ hochwertig durch Kontrolle vieler physikalischer sowie physiologischer Parameter durchzuführen, andererseits sogar die Bindungsprozesse beobachten und somit interpretieren zu können. In zurückliegender Zeit wurden CW-ESR-Bindungsstudien mit gesignelten Fettsäuren als verwendete Ligandensysteme durchgeführt [29].

In Anlehnung an die oben erwähnte Thematik ist die vorliegende Arbeit zu sehen, welche als Vorarbeit zur Realisierung später angedachter DEER-Messungen dient. Vorher mussten dafür wichtige Vorkehrungen getroffen werden, sodass einerseits in Form entsprechender hier spezifisch synthesespezifisch durchgeführter TEMPO-Modifizierungen ausgewählter pharmakologisch wichtiger Wirkstoffe³ via der von Steglich entwickelten Veresterungsmethode durchgeführt (s. Kap. 3.2 ff.), andererseits die synthetisierten TEMPO-Ester bzw. TEMPO Spin-Label (TSL) durch methodisches Austesten unter Verwendung der altbewährten CW-ESR-Methode (s. Kap. 4 ff) untersucht wurden.

Wichtig war hierbei vor allem die Referenzierung sowie Überprüfung der HSA-TSL-Bindung anhand CW-ESR-spektroskopischer Bindungsstudien sowie die Auswertung der im Rahmen dieser Studien aufgenommenen CW-ESR-Spektren mittels einer von Scatchard entwickelten Methode („Scatchard-Plots“, s. Kap. 2.4 ff.), welche zur graphischen Bestimmung wichtiger Bindungsparameter (s. Kap. 4.4, Tab. 14) der synthetisierten pharmazeutischen Wirkstoffe genutzt werden konnte. Um jedoch diese Art der Auswertung zu ermöglichen, mussten zuvor mittels spektraler Simulation in Easyspin [1] (vgl. Kap. 4.1.3 ff.) alle gebundenen, freien und der Vollständigkeit halber, falls vorhanden, alle mizellierten spektralen Bindungsanteile jedes separat gemessenen CW-ESR-Spektrums bestimmt werden.

¹ Durch Matthias J. N. Junk konnte bereits im Jahr 2010 in Anlehnung an seine Doktorarbeit gezeigt werden, dass Multispineffekte bei DEER-Abstandsmessungen zu ungenauen Messergebnissen führen kann [25]. Daher sollte im Idealfall der Abstand zwischen zwei Elektronenspins gemessen werden.

² Die Spinmarkierung (engl. *Spin-Labeling*) von Liganden, d.h. die kovalente Bindungsknüpfung zwischen einem Liganden, wie z.B. einer Fettsäure, und einer Spinsonde, wie bspw. TEMPO, ist zwar ein „alter Hut“ [26, 27], aber nicht die hier verwendete Methode sowie für die hier eingesetzten pharmazeutischen Liganden.

³ Insgesamt wurden dreiundzwanzig Wirkstoffe aus neun verschiedenen Wirkstoffklassen untersucht (s. Kap. 2 ff. und Kap. 3.2 ff.).

Zusammenfassend kann als Ziel der Diplomarbeit angesehen werden, die synthetisierten TEMPO-Ester in möglichst hoher Reinheit zu isolieren und anschließend die Messbedingungen so zu optimieren, sodass die CW-ESR-Bindungsstudien aller TEMPO-modifizierten Wirkstoffe (vgl. Kap. 3.2) mittels HSA unter Berücksichtigung physiologischer Parameter problemlos durchführbar sind und somit eine sinnvolle Interpretation der aufgenommenen CW-ESR-Spektren, die sich zur Bestimmung wichtiger Bindungsparameter der synthetisierten Ester eignet, überhaupt ermöglicht wird.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Pharmakologischer Nutzen verwendeter Wirkstoffe

Bezüglich Kap. 1 wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt dreiundzwanzig Wirkstoffe (Abb. 2 ff.) neun verschiedener pharmakologisch wichtiger Wirkstoffklassen gemäß ihres Bindungsverhaltens gegenüber HSA untersucht. Damit alle durchgeführten CW-ESR-Bindungsstudien bewerkstelligt werden konnten, war vorerst gemäß Kap. 3.2 ff. eine entsprechende Spinmodifikation mittels geeigneter stabilisierter Radikalsonden, hier spezifisch ausgewählter TEMPO-Derivate (4-Carboxy- bzw. 4-Hydroxy-TEMPO), von Nöten. Dennoch soll zunächst in den nachfolgenden Unterkapiteln der pharmakologische Nutzen aller verwendeten Wirkstoffe der jeweiligen Wirkstoffklassen kurz erläutert werden.

2.1.1 Analgetika

Bei den hier zur Synthese eingesetzten Analgetika, Acetylsalicylsäure (ASS), Salicylsäure (SAL), Ibuprofen (IBU), Naproxen (NPX), Paracetamol (PCM), Diclofenac (DCF) und Indometacin (IMC), abgeleitet von altgr. *ἄλγος algos* „Schmerz“, handelt es sich um Wirkstoffe, die das Schmerzempfinden je nach Dosis und pharmakokinetischem Wirkungsgrad durch Blockierung von Schmerzrezeptoren des peripheren (PNS) bzw. zentralen Nervensystems (ZNS) verringern oder gar aufheben.

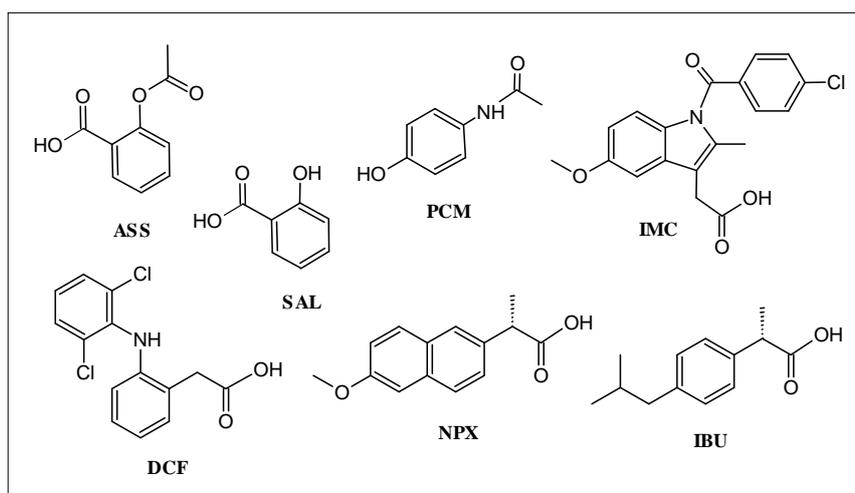


Abb. 2: Molekulare Struktur aller in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Analgetika

Hierbei zählen ASS, SAL, IBU, NPX und DCF u.a. zu den nicht-steroidalen Entzündungshemmern (engl. *non steroidal anti inflammatory drugs*, kurz: NSAID) und besitzen somit

neben schmerzlindernden Eigenschaften, ebenfalls entzündungshemmende sowie fiebersenkende Wirkung. Genauer gesagt, basiert die angesprochene Wirkungsvielfalt einerseits auf der Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX), andererseits auf der Hemmung der Biosynthese der Prostaglandine. PCM fällt hierbei aus der Reihe. Es gliedert sich nicht in die Reihe der NSAID ein und besitzt daher, neben einer stark schmerzlindernden und fiebersenkenden Wirkung, nur eine äußerst schwach ausfallende Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie entzündungshemmende Eigenschaft. Neben ASS wird PCM gerne gegen Spannungskopfschmerzen (Migräne) eingenommen [30, 31, 42].

2.1.2 Antikoagulantien

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikoagulantien, abgeleitet von lat. *anti coagulatio* „gegen Zusammenballung“, Phenprocoumon (PPC), Warfarin (WFR) sowie deren Grundkörper Cumarin, wobei zur Synthese Cumarin-3-carbonsäure (CCS) eingesetzt wurde, zählen alleamt zu den Blutungsgeringungshemmern und weisen somit neben der blutverdünnenden Wirkung fibrinolytische und antithrombotische Wirkung auf.

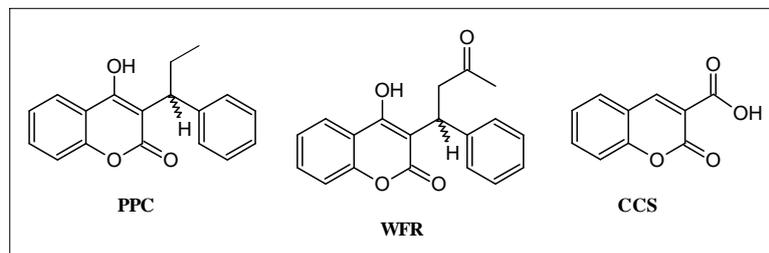


Abb. 3: Molekulare Struktur aller in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Antikoagulantien

Bezüglich der oralen Aufnahme der medizinisch wirksamen 4-Hydroxy-Cumarinderivate, WFR und PPC, wird die Antikoagulation durch regelmäßige Überprüfung des Quickwerts gesteuert. Umso größer dieser Wert, desto stärker ist die Blutverdünnung. Liegt der Wert zu hoch, kann sowohl durch orale als auch intravenöse Gabe von Vitamin K der blutverdünnenden Wirkung gegengesteuert werden. Außer den genannten Antikoagulantien (s.o) wird aus medizinischer Sicht sehr oft ASS zur Blutverdünnung aufgrund des unterschiedlichen Wirkungsmetabolismus gegenüber bspw. PPC verabreicht, da sich nach Absetzen von ASS in kürzester Zeit normale Blutgerinnungswerte wieder einstellen. Eine engmaschige Überprüfung des Quickwertes ist bei oraler Verabreichung von ASS daher überflüssig. Somit ist ASS nicht nur ein Analgetikum, sondern auch ein Antikoagulantium [39, 40, 41, 42].

2.1.3 Narkotika

Aus der Reihe der Narkotika wurde zur Spinmarkierung das Allgemeinanästhetikum Propofol (PPF) verwendet. Je nach Grad der Dosierung dient PPF primär als wichtiges Narkosemittel für Kurzzeitoperationen, wobei die Schmerz- sowie die Bewusstseinsempfindung des ZNS durch intravenöse Verabreichung binnen Sekunden ausgeschaltet wird, aus welcher der Patient bei stark erhöhter Dosis ohne Gabe eines Antidots nicht wieder erwacht. Bei geringer Dosis treten neben einer auf das ZNS beruhigenden und entspannenden Wirkung weitgehend harmlosere Begleiterscheinungen wie eine leicht euphorisierende und aphrodisierende Wirkung auf [45, 46].

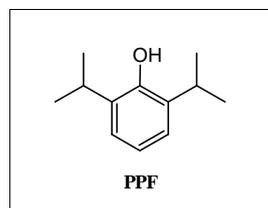


Abb. 4: Molekulare Struktur des in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Narkotikums

2.1.4 Urikostatika

Das zur Synthese verwendete Urikostatikum Febuxostat (FBS) retardiert verstärkt die Bildung von Harnsäure im menschlichen Organismus, indem präziser ausgedrückt das Metalloenzym „Xanthinoxidase“, welches den oxidativen Abbau von Hypoxanthin und Xanthin bis hin zur Harnsäure in Niere sowie der Leber steuert, äußerst selektiv gehemmt wird. Somit fallen vermehrt die beiden oben genannten Vorstufen (Hypoxanthin, Xanthin) des Purinstoffwechsels an, welche gegenüber Uraten, die sich in der Niere bevorzugt ablagern und die Bildung von Nierenstein begünstigen, schnell über die Niere ausgeschieden werden können. FBS wird daher einerseits medikamentös zur Behandlung der chronischen Hyperurikämie, andererseits zur positiven Beeinflussung einer Gichterkrankung verabreicht [43, 44].

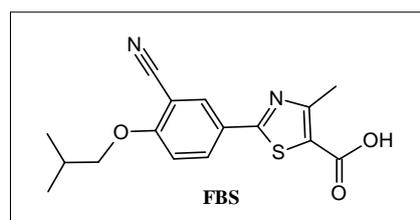


Abb. 5: Molekulare Struktur des in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Urikostatikums

2.1.5 Urikosurika

Im Gegensatz zu FBS verzögern die beiden Urikosurika, Probenecid (PBC) und Benzbromaron (BBR), durch Angriff des Harnsäure-Transportproteins URAT 1 die tubuläre Harnsäurerückgewinnung in den Nierentubuli, wodurch letztendlich der renale Ausfluss von Harnsäure gesteigert wird. PBC und BBR werden demzufolge zur Behandlung chronischer Gichtkrankungen, d.h. im Falle eines erhöhten Harnsäurespiegels im menschlichen Organismus, eingesetzt [43].

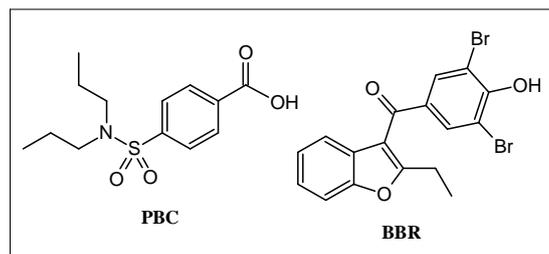


Abb. 6: Molekulare Struktur aller in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Urikosurika

2.1.6 Zytostatika

Bei dem hier verwendeten Zytostatikum, abgeleitet vom gr. Wortstamm *Cyto* „Zelle“ und *statik* „anhalten“, Chlorambucil (CBL) aus der Gruppe der Alkylantien, handelt es sich um einen pharmazeutischen Wirkstoff der das rasante zelluläre Wachstum stark einschränkt und somit die Zellteilung maßgeblich unterbindet.

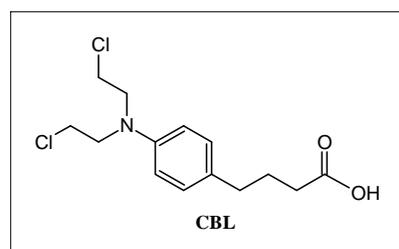


Abb. 7: Molekulare Struktur des in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Zytostatikums

Dieses Phänomen beruht auf der stark ausgeprägten Alkylierungstendenz von CBL gegenüber des Erbgutträgers DNA bzw. RNA. Durch Alkylierung der DNA- bzw. RNA-Stränge wird die Reduplikation des Erbgutträgers (DNA, RNA) unterbunden und dessen Vernetzungspotential untereinander stark erhöht, was letztlich den Zelltod aufgrund fehlender Zellvermehrung induziert. CBL wird deshalb u.a. zur Behandlung von Leukämie (Blutkrebs) sowie stark wuchernder bösartiger Lymphome genutzt [38].

2.1.7 Steroidhormone

Die in dieser Arbeit zur Synthese eingesetzten Steroidhormone, Testosteron (TSO) sowie deren ursprünglicher Grundkörper Cholesterin (CSO), handelt es sich um Steroide, abgeleitet von altgr. *στερεός* „solide“ bzw. gr. *stereós* „fest“ und *-ooides* „ähnlich“, welche hormonelle Wirkung besitzen und sich durch hervorragende Fettlöslichkeit auszeichnen. Neben der Funktion als Vorstufe für viele Steroide, wie z.B. der Gallensäure, Cholecalciferol (Vitamin D₃) um einige weitere zu nennen, ist CSO u.a. ein wesentlicher Baustein aller Zellmembranen im menschlichen Organismus und sorgt somit für entsprechende Zellstabilität.

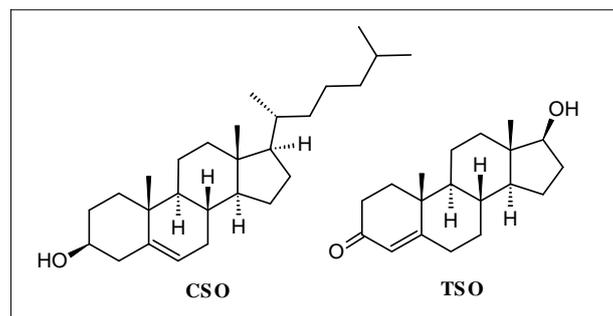


Abb. 8: Molekulare Struktur aller in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Steroide

Zudem trägt CSO durch hervorragende Bindung an Lipoproteine dazu bei, den Zellstoffwechsel zu regulieren, indem es zusammen mit bspw. Lipoproteinen wichtige Botenstoffe intra- sowie extrazellulär ein- und ausschleust [37]. TSO sorgt als männliches Sexualhormon hauptsächlich für die Regulierung des Wachstums der männlichen primären sowie sekundären Geschlechtsmerkmale. Nebenbei wirkt sich TSO anabolisch auf den Proteinstoffwechsel aus, was sich wiederum positiv auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur sowie auf das Haarwachstum auswirkt, andererseits ebenfalls für die Regulation der Körperfettverteilung sorgt [36].

2.1.8 Vitamine

Bezüglich der verwendeten Vitamine, D- α -Tocopherol (DVE, Vitamin E), D-(+)-Biotin (VB7, Vitamin B₇), Niacin (VB3, Vitamin B₃) Cholecalciferol (VD3, Vitamin D₃) und Ergocalciferol (VD2, Vitamin D₂), handelt es sich um eine organische Wirkstoffklasse, die der menschliche Organismus für essentielle überlebenswichtige Funktionen, die der intrinsische Stoffwechsel nicht selber biosynthetisch herstellen kann, benötigt. Die Klassifizierung aller Vitamine sowie auch der oben genannten, erfolgt durch Einteilung dieser in einerseits

die Gruppe der fettlöslichen (allg.: A-, K-, D- und E-Vitamine; hier: VDE, VD3 und VD2), andererseits in die Gruppe der wasserlöslichen (allg.: C- und B-Vitamine; hier: VB3, VB7).

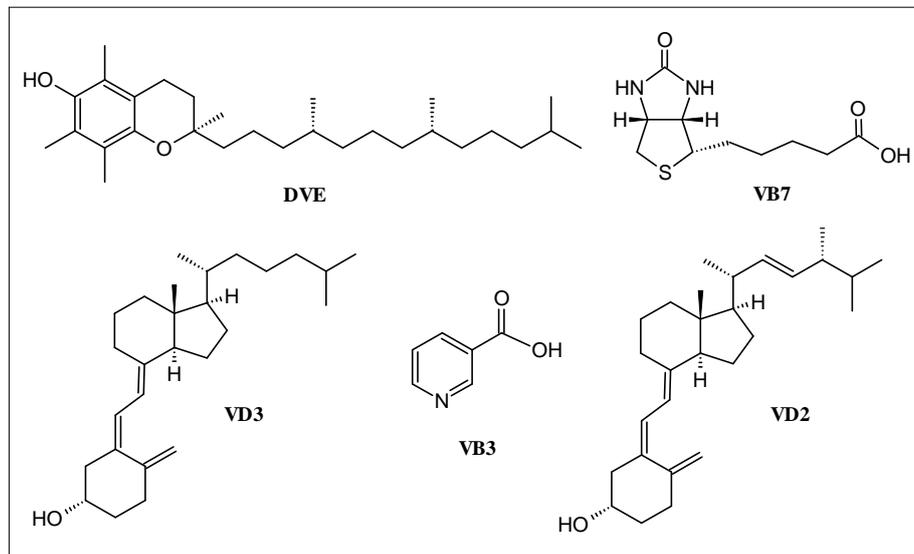


Abb. 9: Molekulare Struktur aller in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Vitamine

Da die fettlöslichen und primär in der Leber gespeicherten Vitamine zu den sog. Speichervitaminen zählen, führt eine entsprechende Überdosierung dieser, rasch zu einer sog. Hypervitaminose („Vitaminübersorgung“), wobei diese bei normaler Nahrungsaufnahme, d.h. ohne zusätzliche Gabe von Vitaminpräparaten, nicht auftritt. Hingegen besitzen die wasserlöslichen Vitamine ein Gefahrenpotential von Null, da sie über die Niere rasch wieder ausgeschieden und nicht im Körper gespeichert werden [34, 35].

2.1.9 Antiauxine

Bei 2,3,5-Triiodbenzoesäure (TIB), welches wie in Kap. 3.10 dargestellt entsprechend spinngelabelt wurde, aus der Reihe der sog. Antiauxine handelt es sich um einen rein synthetischen Wirkstoff, welcher u.a. mit zu den Phytotropinen zählt.

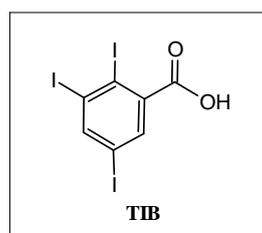


Abb. 10: Molekulare Struktur des in dieser Arbeit zur Synthese verwendeten Antiauxins

Diese Wirkstoffe hemmen gezielt den von Zelle zu Zelle ablaufenden Auxintransport, sodass die Anbindung von Auxinen an den sog. Efflux-Carrier gestört wird. Allgemein sei an dieser Stelle anzumerken, dass TIB bisher nur als Hemmstoff der pflanzlichen Wachstumsregulatoren („Auxine“) Verwendung findet. In Anbetracht dessen, dass TIB zum einen die Embryobildung von embryogenen Zellen unterdrückt, zum anderen die Zellteilung jedoch weiterhin stattfindet [32, 33], wurde bzgl. dieses Stoffes ebenfalls eine HSA-Bindungsstudie (s. Kap. 4.3.9 ff) durchgeführt, da TIB eventuell auch aus medizinischer Sicht zur Wachstumsregulation endogener Prozesse im menschlichen Organismus in ferner Zukunft dienen könnte.

2.2 Spinmarkierung via Steglich-Veresterung

Zur Spinmarkierung aller in Kap. 2.2 aufgeführten Wirkstoffe mittels geeigneter TEMPO-Derivate (4-Hydroxy- bzw. 4-Carboxy-TEMPO) wurde sich der bereits im 19. Jahrhundert (1978) entwickelten Veresterungsmethode von Wolfgang Steglich bedient [47]. Dies erwies sich im Hinblick auf Kap. 3.2 ff. als äußerst vorteilhaft, da alle auf diese Weise hergestellten TEMPO-Ester einerseits bspw. gegenüber der Esterbildung über Carbonsäurechloride unter äußerst milden Bedingungen (RT) gebildet werden konnten, andererseits teils nicht zu erwartende überdurchschnittlich hohe Ausbeuten anfielen, da die von Steglich enträtselte Methodik eigentlich zur Veresterung dimensional kleinerer Alkohole (wie. bspw. MeOH oder EtOH), bei deren Umsetzung recht hohe Ausbeuten erhalten werden konnten (vgl. Tabellen in [47]), mittels geeigneter Carbonsäuren entwickelt wurde. Als Kupplungsreagenz erwies sich hierbei Dicyclohexylcarbodiimid (kurz: DCC) sowie das zugehörige katalytisch auf die Reaktion wirkende 4-(Dimethylamino)pyridin (kurz: DMAP) Verwendung. Neben des hierfür traditionell vorgesehenen organischen Lösungsmittels (kurz: LM) Dichlormethan (kurz: DCM) musste sich je nach Löslichkeit der jeweiligen Wirkstoffe unter Umständen anderer LM, wie bspw. Dimethylformamid (DMF) oder Tetrahydrofuran (THF), bedient werden. Zur Verdeutlichung des Reaktionsmechanismus wurden die im Wesentlichen ablaufenden Reaktionssequenzen in Abb. 2 zusammengefasst. Im Hinblick auf Abb. 11 sollte zunächst betonend festgehalten werden, dass nach Bildung des gegenüber der freien Säure (**1**) reaktiveren O-Acylisoharnstoffderivates (**3**), welches durch nucleophile Deprotonierung der vorliegenden Carbonsäure (**1**) mittels DCC (**2**) gebildet wird, DMAP (**4**) eine zentrale Schlüsselposition bei der Estersynthese einnimmt. So unterdrückt DMAP (**4**) einerseits aufgrund seiner gegenüber den eingesetzten Alkoholen (R^1-OH) erhöhten Nucleophilie des

sich im Pyridinring befindlichen Stickstoffatoms die ansonsten stattfindende und Ausbeute stark mindernde 1,3-Umlagerung unter Bildung des N-Acylharnstoffderivates (**3a**), und reagiert andererseits rasch mit dem gebildeten O-Acylisoharnstoff (**3**) zunächst unter Eliminierung von DCU (engl. *Dicyclohexylurea*) zum Acyl-Komplex (**5**), wobei durch Angriff des Alkohols (R^1-OH) an dessen reaktive Carbonylgruppe unter Abspaltung von DMAP (**4**) der entsprechende TEMPO-Ester (**6**) (bzw. TEMPO Spin-Label (kurz: TSL)) letztendlich gebildet wird.

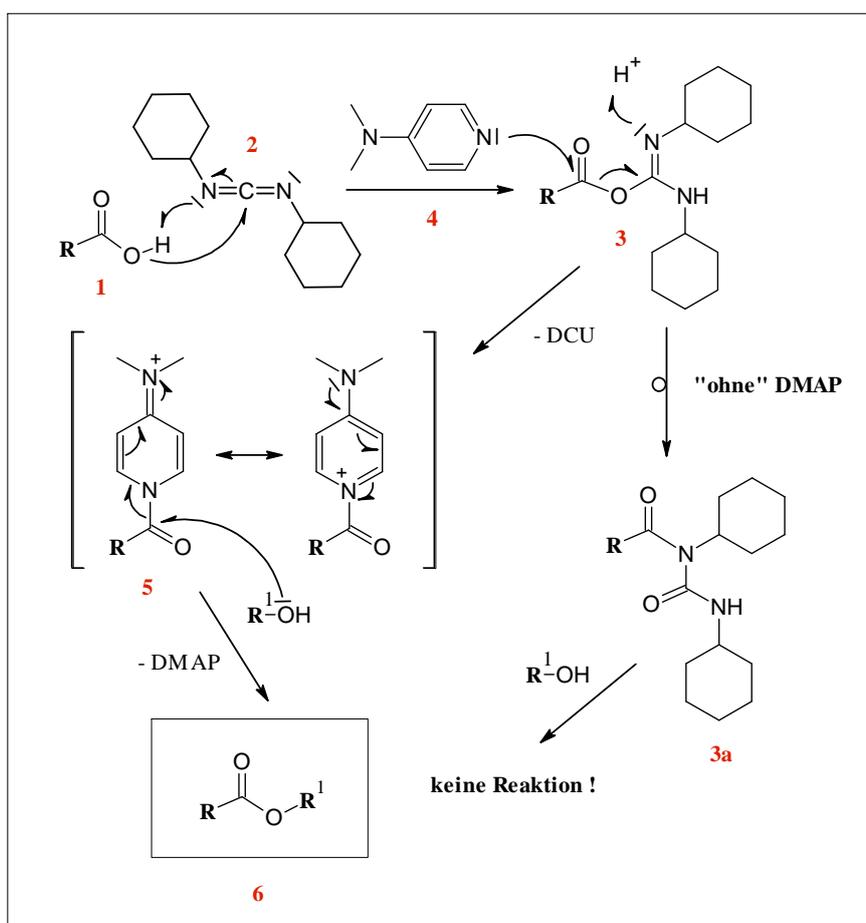


Abb. 11: Reaktionsschema der Steglich-Veresterung mit R = Wirkstoffrest und R^1 = TEMPO oder umgekehrt, je nach Reaktionsbedingung, ob die Spinmarkierung des jeweiligen Wirkstoffes an deren Carbonsäuregruppe ($-COOH$) oder Hydroxygruppe ($-OH$) durchgeführt werden musste (vgl. Kap. 2.1, Abb. 2 ff.)

Da allgemein gesehen Amine gegenüber Alkoholen eine stark erhöhte Nucleophilie besitzen, wäre durchaus eine Spinmarkierung unter Verwendung von 4-Amino-TEMPO sowie des sich speziell hierfür eignenden Kupplungsreagenzes HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) allerdings unter Ausbildung einer Amidbindung möglich gewesen.

2.3 ESR-Spektroskopie

2.3.1 Einführung

Gegenüber der heutzutage immernoch prestigeträchtigen NMR-Spektroskopie besitzt die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie, welche sich ausschließlich der Untersuchung paramagnetischer Stoffe widmet und daher auch oft als EPR-Spektroskopie (engl. *electron paramagnetic resonance*) bezeichnet wird, lange Zeit einen großen funktionellen Nachteil. Da bekanntermaßen die Elektronenpaarbildung z.B. unter Ausbildung einer chemisch kovalenten Bindung zur gegenseitigen Aufhebung von parallel (α , \uparrow) sowie antiparallel (β , \downarrow) zueinanderstehenden Elektronenspins führt, war es zeitweilig äußerst schwierig, da alle stabilen Verbindungen über einen verlängerten Zeitraum keinen verbleibenden (singulären) Elektronenspins beibehalten, diese Spins in Form eines ESR-Signals zu detektieren. Eine „Renaissance“ zur Etablierung der ESR-Spektroskopie vollbrachte E. K. Zavoisky 1945, indem er erstmals ein entsprechendes ESR-Signal durch Vermessung einer anorganischen $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Probe detektieren konnte [28]. Durch Absorption von Photonen an ungepaarten Elektronen radikalischer (paramagnetischer) Stoffe war es nun möglich, sowohl qualitativ hochwertige Angaben über deren elektronische Umgebung zu tätigen als auch präziser ausgedrückt, deren Wechselwirkungen mit umliegenden, benachbarten Atomkernen wahrzunehmen. Später und im Hinblick auf diese Arbeit ließen sich letztlich u.a. über lokale Wechselwirkungen durch Einführung stabiler, radikalischer Spinsonden (hier: 4-Carboxy- bzw. 4-Hydroxy-TEMPO) in diamagnetische Systeme (z.B. Polymere, Proteine; hier: HSA) vertiefte Einblicke bzgl. struktureller und dynamischer Eigenschaften der vielfältig vorliegenden diamagnetischen Systeme erzielen. Durchbruch war auch die Offenlegung der funktionellen Struktur und somit der Beweis des dynamischen Verhaltens von Serum Albumin mittels gezielter Fettsäuren-Beladungsstudien durch M. J. N. Junk, H.-W. Spiess und D. Hinderberger im Jahr 2010 [48].

2.3.2 Der Elektronenspin – ein quantenmechanisches Phänomen

Nachdem Zeeman 1896 im Anklang an seine Messungen über das Kerr'sche magneto-optische Phänomen durch Anlegen eines äußeren Magnet (B)-Feldes eine D-Linienverbreiterung in Form einer entsprechenden D-Linienaufspaltung in Absorptionsspektren von Natriumdampf beobachtete [49], war der nach ihm benannte Effekt noch mit Hilfe der klassischen Physik erklärbar. Ganze 26 Jahre später gelang es Stern und Gerlach die bisherigen Beobachtungen

durch ihr damals hoch innovatives Experiment, mit dem sie belegen konnten, dass Silberatome genau ein einziges ungepaartes Elektron besitzen und folgedessen neben einem magnetischen Bahndrehmoment ein magnetisches Moment μ aufweisen, genauer zu „quantifizieren“ [50, 51]. Indem sie beobachten konnten, dass sich der atomare Strahl der Silberatome innerhalb eines inhomogenen Magnetfeldes in zwei Strahlenbündel aufspaltete, war klar, dass das intrinsisch herrührende magnetische Moment μ des ungepaarten Elektrons des Silberatoms ausschließlich eine von zwei Orientierungen im B-Feld annehmen kann und schlussfolgernd quantisiert vorliegt. Im Anklang daran und hinsichtlich der Tatsache, dass rotierende Ladungen magnetische Vektorpotentiale bewirken [52], konnten im Jahr 1925 Goudsmit und Uhlenbeck mit ihrem Wissen das magnetische Momente von Drehimpulsen herrühren, somit auf die Existenz eines quantisierten Eigendrehimpuls des freien Elektrons schließen, welcher Spin oder präziser ausgedrückt Elektronenspin genannt wird [53, 54]. Quantenmechanisch bedingt, d.h. wenn zwei Spinzustände existieren, beläuft sich die Spinquantenzahl auf $s = 1/2$. Bezüglich des B-Feldes wird dem parallel orientierten Spinzustand $|\alpha\rangle$ bzw. \uparrow eine magnetische Spinquantenzahl $m_s = +1/2$, dem antiparallel orientierten Spin-zustand $|\beta\rangle$ bzw. \downarrow die Spinquantenzahl $m_s = -1/2$ zugeordnet [55].

2.3.3 Resonanzbedingung des freien Elektrons

Gemäß Gl. (2.1) und im Hinblick auf Kap. 2.3.2 ist dem Spindrehimpuls \mathbf{S} , genauso wie dem Bahndrehimpuls \mathbf{L} des freien Elektrons, ein magnetisches Moment μ beigeordnet, wobei der g-Wert des Elektrons, welcher als konstanter Korrekturterm relativistischer Effekte angesehen werden kann, bei $g \approx 2$ liegt.

$$\mu = -g\mu_B \mathbf{S} \quad (2.1)$$

Der exakte g-Wert für das freie Elektron, welcher nicht nur hochpräzise gemessen, sondern auch mittels quantenelektrodynamischer Studien mit hoher Exaktheit vorhergesagt werden konnte, beläuft sich hierbei auf einen Wert von $g_e = 2.0023193043737(82)$ [56]. Weiterhin handelt es sich im Einklang mit Gl. (2.1) bei μ_B um das sog. *Bohr'sche Magneton*, welches gemäß Gl. (2.2) komplementär alle wichtigen Naturkonstanten, wie e die Elementarladung, $\hbar = h/2\pi$ das Planck'sche Wirkungsquantum und m_e die Masse des Elektrons, in sich trägt und wie folgt definiert ist:

$$\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e}. \quad (2.2)$$

Hinsichtlich Gl. (2.2) sei erwähnt, dass μ_B vergleichsweise zur Kernmasse aufgrund seiner deutlich kleineren Elektronenmasse m_e einen wesentlich größeren Wert als das analog definierte Kernmagneton μ_K , welches hingegen für die NMR-Spektroskopie höchste Relevanz besitzt, aufweist. Darin liegt folglich auch die höhere Empfindlichkeit des ESR- gegenüber der NMR-Spektroskopie begründet. Wird folglich das Elektron in ein angelegtes Magnetfeld, wobei es sich bei \mathbf{B} um die magnetische Flussdichte des angelegten B-Feldes handelt, eingebracht, so ergibt sich ein energetischer Zusammenhang zwischen der magnetischen Spinquantenzahl m_S sowie der Stärke H des statischen Magnetfeldes B_0 .

$$E = g\mu_B B_0 m_S \quad (2.3)$$

Da die Spinquantenzahlen, je nach Orientierung im B-Feld, unterschiedliche Werte von $m_S = \pm 1/2$ annehmen, spaltet sich die Energie in zwei separate voneinander liegende Energieniveaus E_1 und E_2 auf, was durch eine Energiedifferenz beider Spinzustände, $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$, im statischen Magnetfeld B_0 wie folgt zum Ausdruck kommt:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu_L = g\mu_B B_0. \quad (2.4)$$

Wird nun Energie in Form elektromagnetischer Strahlung bei genau dieser Resonanzfrequenz, präziser ausgedrückt Larmorfrequenz ν_L , eingestrahlt, kann letztendlich der hieraus resultierende spontan eintretende Absorptionsprozess mittels einer entsprechenden Messapparatur detektiert werden. Die in Gl. (2.4) beschriebene Gleichung stellt demzufolge die Resonanzbedingung für das „ungepaarte“ Elektron dar.

2.3.4 CW-ESR-spezifische Wechselwirkungen

In Anlehnung an Kap. 2.3.2 weist der quantisierte Eigendrehimpuls des freien Elektrons die gleichen charakteristischen Eigenschaften eines Drehmomentes auf, sodass neben den ESR-spezifischen Wechselwirkungen, die durch Anlegung eines äußeren B-Feldes resultieren, ebenso die Wechselwirkungen anderer magnetischer Momente, welche intrinsisch der Probe herrühren, mit berücksichtigt werden müssen. Allgemein geht es bei der Durchführung der ESR-Spektroskopie um die interpretatorische Begutachtung wichtiger ESR-spezifischer Parameter, welche durch die in diesem Unterkapitel beschriebenen, verschiedenen Wechselwirkungen kompaktiert aufgezeigt werden sollen. Die Wechselwirkungen eines Spinsystems bzgl. seiner mehrdimensionalen Umgebung werden aus rein quantenmechanischer Sicht durch den sog. Spin-Hamiltonoperator \hat{H}_S beschrieben [23, 57], wobei die

einzelnen Terme in \hat{H}_S (s. Gl. (2.5)) in chronologischer Reihenfolge entsprechend ihres energetischen Beitrags und somit in ihrer Häufigkeit des Auftretens der nachfolgend beschriebenen Wechselwirkungen geordnet wurden. Der effektive Spin-Hamiltonoperator \hat{H}_S ist komplementär gegeben durch:

$$\hat{H}_S = \hat{H}_{EZ} + \hat{H}_{NFS} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_{KZ} + \hat{H}_{KQ} + \hat{H}_{ee}, \quad (2.5)$$

wobei es sich bei \hat{H}_{EZ} um den \hat{H} der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung, bei \hat{H}_{HF} um den \hat{H} der Hyperfeinwechselwirkung, bei \hat{H}_{NFS} um den \hat{H} der Nullfeldaufspaltung, bei \hat{H}_{KZ} um den \hat{H} der Kern-Zeeman-Wechselwirkung, bei \hat{H}_{KQ} um den \hat{H} der Kern-Quadrupol-Wechselwirkung und bei \hat{H}_{ee} um den \hat{H} der Elektron-Elektron-Wechselwirkung handelt.

Fortfolgend sei erwähnt, dass ausschließlich auf die Wechselwirkungsterme eingegangen wurde, die für die vorliegende Arbeit bzgl. der CW-ESR-Experimente relevant waren, sodass die Terme \hat{H}_{KQ} und \hat{H}_{NFS} vernachlässigt wurden. Diese beiden Arten der Wechselwirkungen kommen bspw. unter Verwendung der DEER oder NMR-Methode zum Tragen, wo vermehrt dipolare Wechselwirkungen bzw. Kopplungen eine Rolle spielen.

a) Elektron-Zeeman-Wechselwirkung

Bei hinreichend hohen B-Feldern stellt die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung \hat{H}_{EZ} die dominierende aller auftretenden Größen des effektiven Spin-Hamiltonoperators dar. Sie ist gegeben durch

$$\hat{H}_{EZ} = \mu_B \mathbf{B} \mathbf{g} \hat{S}, \quad (2.6)$$

wobei es sich in diesem Fall bei \hat{S} um den Drehimpulsoperator des freien Elektrons (bzw. Spindrehimpulsoperator) handelt. Diese Art der Wechselwirkung veranlasst in Gegenwart eines B-Feldes die Aufspaltung der Energieniveaus der Elektronenspins im gerade vorliegenden Spinsystem. Diese bildete sie sozusagen das „Grundfundament“ für die Entdeckung von Stern und Gerlachs durchgeführten Experiments, da sie die Zerlegung des Silberatomstrahls in zwei spektrale Strahlenbündel bewirkte. Durch den Befund, dass der Spindrehimpulsoperator sowie das B-Feld richtungsabhängig sind, ist die typische Darstellungsform von \mathbf{g} gemäß Gl. (2.1) die eines Tensors. Unter zur Hilfenahme von Euler-

winkeln kann folglich eine Diagonalisierung des obliegenden g -Tensors mit seinen Eigenwerten g_{xx} , g_{yy} und g_{zz} zu einer sog. Einheitsmatrix erfolgen. Liegt das jeweilige Spinsystem in Lösung vor, erfolgt aufgrund schnell voranschreitender molekularer Rotationen eine Mittelung der drei Tensorwerte zu einem isotropen g -Faktor, dem g_{iso} -Wert, welcher sich wie folgt berechnen lässt:

$$g_{iso} = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}). \quad (2.7)$$

b) Hyperfeinwechselwirkung

Einen weiteren sehr wichtigen Energiebeitrag liefert die Wechselwirkung des magnetischen Momentes des Elektronenspins mit J magnetischen Momenten i benachbarter Kernspins \mathbf{I} , die sog. Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{HF} , welche wie folgt definiert ist:

$$\hat{H}_{HF} = \hat{H}_{FK} + \hat{H}_{KE} = \sum_i^J \hat{S} \mathbf{A}_i \hat{\mathbf{I}}_i \text{ mit } i = 1, 2, \dots, J. \quad (2.8)$$

\mathbf{A}_i symbolisiert gemäß Gl. (2.8) den sog. Hyperfeinkopplungstensor des i -ten Kerns. Die Hyperfeinwechselwirkung beleuchtet einerseits das magnetische Umfeld des Elektrons, wodurch andererseits tiefere strukturelle Einblicke über das gerade untersuchte Spinsystem gewonnen werden können. Sie verursacht daher eine weitere Aufspaltung der jeweiligen Energieniveaus. D.h. jedes vorhandene Energieniveau des Elektrons spaltet sich erneut für jeden sich im System befindlichen bzw. neu hinzukommenden Kern in $(2I+1)$ weitere Unter-niveaus auf. Die Hyperfeinwechselwirkung setzt sich also aus zwei Anteilen zusammen und lässt sich dementsprechend in einen isotropen Anteil \hat{H}_{FK} sowie einen dipolaren anisotropen Anteil \hat{H}_{KE} untergliedern. Nächst der Hypothese, dass Dipole lokalisiert und punktförmig vorliegen, tritt neben der dipolaren Wechselwirkung zwischen den Elektronenspins (s. Kap 2.3.3 unter d)) ebenso eine dipolare Kopplung zwischen Kern- und Elektronenspin \hat{H}_{KE} auf. Gemäß Gl. (2.9) lässt sich der dipolare Kopplungstensor \mathbf{T} wie folgt berechnen:

$$\hat{H}_{KE} = \sum_i \hat{S} \mathbf{T}_i \hat{\mathbf{I}}_i. \quad (2.9)$$

Der isotrope Anteil der Hyperfeinwechselwirkung \hat{H}_{HF} , die sog. Fermi-Kontaktwechselwirkung \hat{H}_{FK} , lässt sich entsprechend Gl. (2.10) berechnen zu:

$$\hat{H}_{FK} = \sum_i A_{isoj} \hat{S} \hat{I}_i, \quad (2.10)$$

wobei \hat{H}_{FK} die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante A_{iso} beinhaltet. Dies rührt daher, dass sich in Lösung aufgrund der schnellen Eigendynamik der Radikalsonden der anisotrope Anteil, genauer der Dipolkopplungstensor \mathbf{T} sich zu Null herausmittelt und ausschließlich der isotrope Anteil A_{iso} gemessen wird. In Anlehnung an Gl. (2.7) kann ebenfalls durch Mittelung der drei A-Tensorwerte A_{xx} , A_{yy} und A_{zz} die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante A_{iso} gemäß Gl. (2.11) wie folgt berechnet werden:

$$A_{iso} = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}). \quad (2.11)$$

Hingegen sei an dieser Stelle noch anzumerken, dass konträr zu den ESR-Messungen in Lösung die separate Bestimmung isotroper und anisotroper Anteile hinsichtlich eines obliegenden Festkörpers möglich. Allerdings kann bei sehr großen Abständen zwischen Kern und Elektron der isotrope Anteil aufgrund der Tatsache, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des freien Elektrons am Kernort gegen Null geht, grundlegend vernachlässigt werden. Es existiert dann nur noch die anisotrope Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Kern- und Elektronenspin \hat{H}_{KE} . Auf diese Weise kann letztlich durch direktes Messen dieser kleinen Hyperfeinkopplungen, was hinsichtlich dieser Arbeit noch nicht gemacht wurde, aber möglichst schnell durch eine Feinbestimmung mittels W-Bandmessungen der synthetisierten TEMPO Spin-Label nachgeholt werden soll, der Abstand zwischen Kern und Elektron hoch sensitiv bestimmt werden. Resultierend kann festgehalten werden, dass alle Terme des Spin-Hamiltonoperators \hat{H}_s , die den Drehimpulsoperator \hat{S} des freien Elektrons beinhalten, sowohl die Aufspaltung als auch die Lage aller im ESR-Spektrum auftretenden Linien empfindlich beeinflussen. Hingegen tangieren Terme des \hat{H}_s , welche unvermischt Kernspins vorweisen, wie bspw. die Kern-Zeeman-Wechselwirkung oder die nicht diskutierte Kern-Quadrupol-Wechselwirkung, das ESR-Spektrum nur augenscheinlich dann, falls die Hochfeldnäherung für Kernspins außer Kraft gesetzt wird.

c) Kern-Zeeman-Wechselwirkung

Wie die Elektronenspins wechselwirken auch alle Kernspins mit dem äußeren B-Feld und erfahren somit eine Zeeman-Aufspaltung. Allerdings wird die Kern-Zeeman-Wechselwirkung \hat{H}_{KZ} meist in guter Näherung als isotrop aufgefasst, da der anisotrope Anteil selbst im

Kernfrequenzspektrum paramagnetischer Stoffe nicht mehr hoch aufgelöst erscheint. Für J Kerne ist \hat{H}_{KZ} definiert durch:

$$\hat{H}_{KZ} = \sum_i^J g_K^i \mu_K \mathbf{B} \hat{\mathbf{I}} \quad \text{mit } i = 1, 2, \dots, J, \quad (2.12)$$

wobei g_K^i den g-Faktor des i-ten Kerns, $\hat{\mathbf{I}}$ den Kernspinoperator (bzw. Drehimpulsoperator der freien Kerne) und μ_K das Kernmagneton darstellt.

d) Elektron-Elektron-Wechselwirkung

Für die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen gelten genauso wie für die dipolaren Wechselwirkung durch Nullfeldaufspaltung, welche bzgl. der hier durchgeführten CW-ESR-Messungen irrelevant sind und daher nicht weitergehend beleuchtet wurden, für Systeme mit einem Gesamtspin von $S \geq 1$. Diese unterteilen sich gegenüber den bisher erörterten Wechselwirkungen in zwei weitere schwache Wechselwirkungen, wie die Heisenberg-Spinaustauschwechselwirkung [58] (\hat{H}_{Exch}) sowie die dipolaren Wechselwirkung zwischen den Elektronenspins [23] (\hat{H}_{EE}). Allgemein tritt ein mittels der Quantenelektrodynamik erklärbarer Spinaustausch genau dann auf, wenn sich zwei freie Elektronen sehr stark aneinander annähern. Bildlich gesprochen wäre dies der Fall, wenn beide Elektronen quasi gepaart vorliegen würden, d.h. eine feste Bindung eingehen und somit dem Gesamtsystem Stabilität verleihen würden. Ist folglich die „Bindung“ bzw. Annäherung beider Elektronen besonders ausgeprägt, sind alle Elektronenspins antiparallel ausgerichtet und das CW-ESR-Signal verschwindet. Demzufolge ist der Heisenberg-Austausch nur augenscheinlich wahrzunehmen, wenn eine schwache Wechselwirkung durch Überlapp der Orbitale paramagnetischer Zentren zwischen beiden Elektronenspins S_1 und S_2 vorherrscht. Die Heisenberg-Austauschwechselwirkung \hat{H}_{Exch} ergibt sich definitionsgemäß zu:

$$\hat{H}_{Exch} = \hat{S}_1 \mathbf{J} \hat{S}_2 = \mathbf{J}_{12} \hat{S}_1 \hat{S}_2. \quad (2.13)$$

Der letzte Term von Gl. (2.13) besitzt ausschließlich für organische Radikale Gültigkeit. Dies liegt darin begründet, dass der anisotrope Anteil des Austauschensors \mathbf{J} vollständig vernachlässigt werden kann. Im Einklang zu den bereits diskutierten Hyperfeinwechselwirkungen \hat{H}_{HF} steht auch die Dipol-Dipol-Kopplung freier Elektronen \hat{H}_{EE} . Statt der Wechsel-

wirkung zwischen \hat{S} und \hat{I} wird hierbei die Wechselwirkung zwischen dem Spindrehimpulsoperator \hat{S} und dem Nullfeldaufspaltungstensor D beschrieben.

$$\hat{H}_{EE} = \hat{S}D\hat{S} = 2\hat{S}_1D\hat{S}_2, \text{ wobei } \hat{S} = \sum \hat{S}_i. \quad (2.14)$$

Der mathematische Zusammenhang kann aber dennoch in Gl. (2.14) eingesehen werden. Die dipolare Wechselwirkung zwischen den Elektronenspins spielt aber hinsichtlich der durchgeführten CW-ESR-Bindungsstudien in flüssiger Umgebung keine entscheidende Rolle, da sie sich in Lösung aufgrund schneller Molekülrotationen der TEMPO-Ester meist herausmittelt.

2.3.5 Auswirkung der Rotationskorrelationszeit auf TEMPO-Spektren

Die Rotationskorrelationszeit τ_R stellt neben dem charakteristischen isotropen 3-Linienspektrum für Nitroxide einen weiteren individuellen „Fingerabdruck“ dieser im dynamischen Sinne dar und wurden für die hier jeweiligen vermessenen synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL), auch TEMPO-Ester genannt, in Kap. 3.2 ff mit aufgeführt. Definitionsgemäß handelt es sich bei τ_R um die Zeit, die das Spinsystem benötigt, um einen vorherigen Zustand in „Vergessenheit“ geraten zu lassen. Mathematisch präziser ausgedrückt, handelt es sich bei τ_R um eine temporäre Konstante beim Abklingen der Korrelationsfunktion einer Größe bezüglich stochastisch ablaufender Prozesse. Seit ihrer Vorstellung durch Freed können durch Spinmarkierungen u.a. organischer Substanzen deren molekulare Eigendynamiken durch die Ermittlung solcher Korrelationszeiten experimentell erforscht werden [59]. Ganz zu Anfang konnten die Rotationskorrelationszeiten nur im *ns*-Bereich ermittelt werden. Hingegen ist heutzutage eine prägnantere Bestimmung bis in den *ps*-Bereich möglich. Im Hinblick auf die 3-Linienspektren von Nitroxiden (hier: der synthetisierten TSL) besitzt die molekulare Rotationsdynamik enormen Einfluss auf die Form gemessener CW-ESR-Spektren und macht sich durch Anhebung bzw. Absenkung des Hochfeldpeaks in Form eines zunehmenden isotropen bzw. anisotropen Charakters jeweiliger 3-Linienspektren der Nitroxide bemerkbar. Zur Verdeutlichung dieses Phänomens soll Abb. 12 und Abb. 13 dienen. Im Vergleich zu den gezeigten 4-Hydroxy-TEMPO Spektren nimmt die Rotationskorrelationszeit bei den gemessenen BBR-TSL Spektren deutlich größere Werte an, was durch die verlangsamte Eigendynamik bzw. Einschränkung der Bewegungsfreiheit des TEMPO Spin-Labels von Benzbromaron durch Absenkung des Hochfeldpeaks und somit einer Verschiebung der bei unterschiedlicher Temperatur gemessenen BBR-TSL-Spektren in den anisotropen Bereich zum Ausdruck kommt.

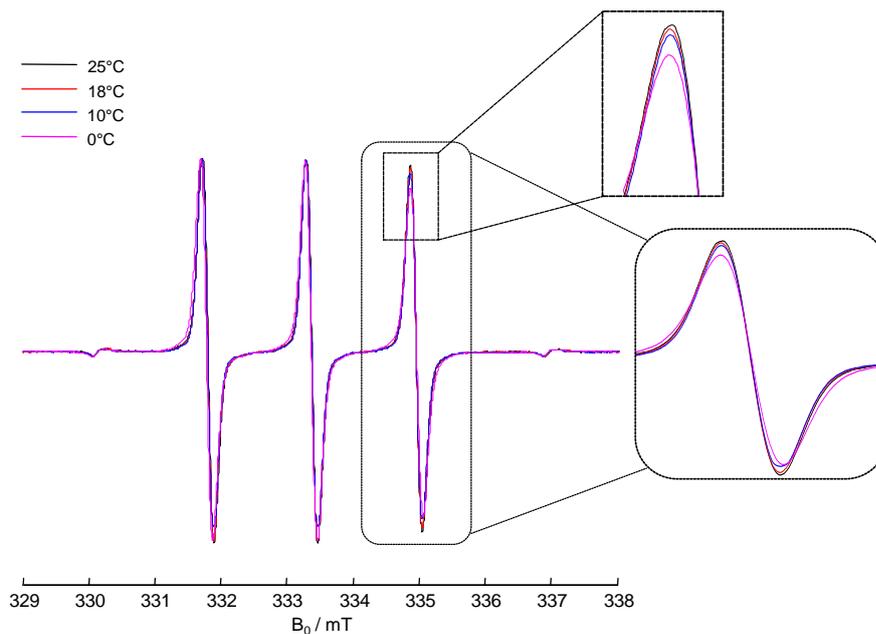


Abb. 12: Temperaturabhängige Messung der CW-ESR-Spektren von 4-OH-TEMPO bei einer Stammkonzentration von 1 mM in DMSO unter Verwendung eines Mn-Standards. Zur Verdeutlichung der Auswirkung von τ_R wurden der Hochfeldpeak des aufgenommenen Gesamtspektrums sowie dessen Maximum in stark vergrößerter Form ebenfalls abgebildet.

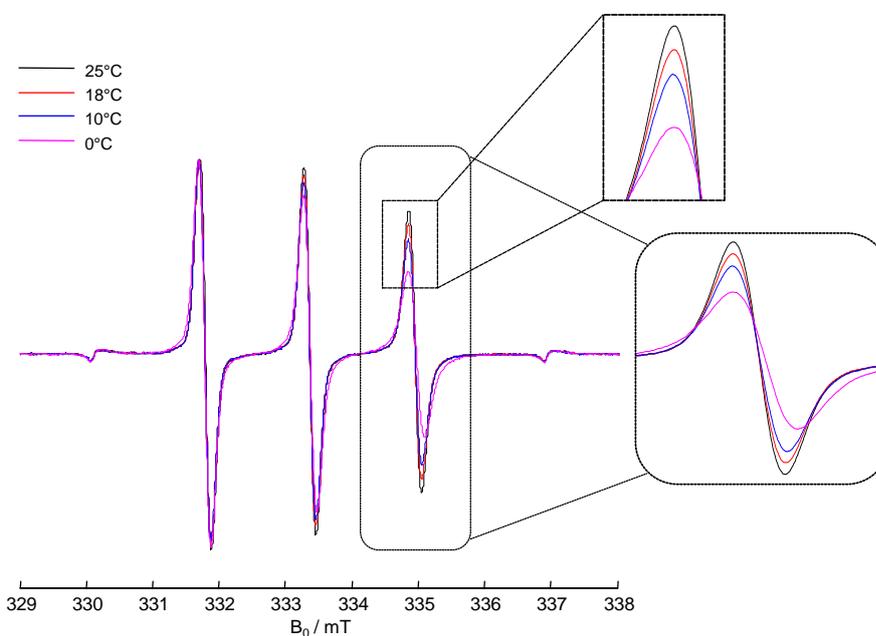


Abb. 13: Temperaturabhängige Messung der CW-ESR-Spektren von BBR-TSL bei einer Stammkonzentration von 1 mM in DMSO unter Verwendung eines Mn-Standards. Zur Verdeutlichung der Auswirkung von τ_R wurden der Hochfeldpeak des aufgenommenen Gesamtspektrums sowie dessen Maximum in stark vergrößerter Form ebenfalls abgebildet.

Bei den aufgenommenen 4-Hydroxy-TEMPO Spektren handelt es sich hingegen um (nahezu) isotrope CW-ESR-Spektren. Dieser Unterschied im isotropen bzw. anisotropen Verhalten der jeweiligen Spektren beider stabilisierten Radikale liegt darin begründet, dass durch die Spinmodifikation mittels Benzbromaron (BBR) nicht nur die molekulare Masse der Endverbindung BBR-TSL, welche in Kap. 3.6.2 plakativ dargestellt wurde, gegenüber dem unmodifizierten TEMPO Spin-Label deutlich erhöht ist, sondern das sich auch aufgrund der molekularen Dimension von BBR-TSL und somit u.U. sterischen Hinderung in der Eigendynamik dieser Verbindung die stark verlangsamte Rotation durch eine stark erhöhte Korrelationszeit τ_R , was letztlich durch Absenkung des Hochfeldpeaks zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 13), bemerkbar macht. Weiterhin sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass hinsichtlich der isotropen Molekülbewegung die Rotationskorrelationszeit wie folgt definiert ist:

$$\tau_R = \frac{1}{6D_r}, \quad (2.15)$$

Wobei es sich bei D_r um den Rotationsdiffusionskoeffizienten handelt. Unter Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung lässt sich τ_R mit der Viskosität η , der Temperatur T sowie mit dem hydrodynamischen Radius R_H des gerade rotierenden Moleküls gemäß Gl. (2.16) in Beziehung setzen [60], welcher sich folglich durch Umstellen von Gl. (2.16) sowie unter der Annahme, dass alle Moleküle sich perfekt kugelförmig verhalten, berechnen lässt.

$$\tau_R = \frac{4\pi\eta R_H^3}{3k_B T}, \quad (2.16)$$

Diese Näherung gilt streng genommen nur für unmodifizierte Nitroxidradikale, wie bspw. TEMPO. Für modifizierte Radikalsonden, wie die in dieser Arbeit hergestellten TSL, gilt diese Näherung nicht mehr, da die molekulare Aufweitung durch die Spinmarkierung des zur Synthese eingesetzten Wirkstoffe deutlich zunimmt und somit von einer kugelförmigen Einheit nicht mehr ausgegangen werden sollte. Abschließend bzgl. dieses Kapitels sollte jedoch noch festgehalten werden, dass neben den Dynamikstudien mittels τ_R ebenso Aussagen über das chemische Umfeld der verwendeten radikalischen Sonden, wie z.B. die hier verwendeten TEMPO-Derivate, sowie der synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) getroffen werden können [60]. Angesichts dessen wirken sich differente Umfelder äußerst unterschiedlich auf die elektronische Struktur des gerade verwendeten Labels aus, indem es zu gravierenden Änderungen der ^{14}N -Hyperfeinaufspaltungen A_{ii} , insbesondere dem A_{zz} -

Wert, kommen kann. Ebenfalls wirken sich diese Änderungen auch auf die Werte des g -Tensors (g_{xx} , g_{yy} und g_{zz}) aus. Allerdings sind die Änderungen in der elektronischen Struktur meist nur minimal, was sich jedoch auf den spektralen Verlauf dennoch gravierend auswirken kann. Beispielhaft gesprochen kommt es bei ein und derselben paramagnetischen, radikalischen Verbindung bei verändertem pH-Wert, Polarität des Lösungsmittels als auch Hydrophobizität zu Änderungen ihrer elektronischen Struktur. Daher wurde bei allen hier durchgeführten Bindungsstudien darauf geachtet, durch Wahl des Lösungsmittels, die Hydrophobizität des TSL in Lösung einerseits zu kontrollieren, andererseits pH-Wert jeder präparierten Probe ebenfalls konstant zu halten. Dies war besonders wichtig, da sich bei Änderung des pH-Wertes besonders eine Änderung des g_{xx} -Wertes aufgrund mehr oder weniger ausgeprägter H-Brückenbindungen des N-O-Atoms der modifizierten Nitroxide zu den einzelnen LM-Molekülen bemerkbar machen würde. Hingegen würde sich durch eine Polaritätsänderung der A_{zz} -Wert aufgrund Änderungen in der molekularen Struktur durch Solvatationseffekte maßgeblich ändern.

2.3.6 Funktionsweise des CW-ESR-Spektrometers

Ganz zu Anfang sei erwähnt, dass in der ESR-Spektroskopie die Messung eines ESR-Signals auf zwei verschiedene Arten erfolgen kann. Einerseits kann das die Messung des Signals dadurch erfolgen, wenn das elektromagnetische Wechselfeld kontinuierlich, d.h. die Mikrowellen (MW)-Frequenz ν konstant gehalten und das B-Feld (bzw. B_0) variiert wird, andererseits dadurch, wenn gepulst auf die Probe eingestrahlt wird, wie bspw. beim DEER-Experiment. Da alle relevanten Wechselwirkungen des Spinsystems viel schneller erfolgen als die Änderung des B-Feldes kann der Spin-Hamiltonoperator \hat{H}_S (vgl. Kap. 2.3.3 ff.) als zeitunabhängig angesehen werden [60]. Weiterhin sollte im Vorhinein darauf hingewiesen sein, dass in der ESR-Spektroskopie immer mit MW-Strahlung gearbeitet wird. In Abb. 14 ist der schematische Aufbau eines CW-ESR-Spektrometers wiedergegeben, wobei im Folgenden das Funktionsprinzip näher erläutert werden soll. Zunächst wird die Mikrowelle mittels einer geeigneten Quelle, meist eine Gunndiode, einem Halbleiterelement zur Mikrowellenerzeugung, erzeugt. An einem meist rechteckigen Hohlraumresonator wird diese unter Rückkopplung frequenzstabilisiert, wodurch sie somit konstant und phasenstabilisiert vorliegt. Weiterhin wird durch zwei Kanäle kanalisiert, einem Mess- und einem Referenzarm. In Messarm wird die MW durch einen Regler (Abschwächer, engl. *attenuation*) gedämpft, um eine Absättigung der Spinübergänge zu verhindern. Der Referenzarm, welcher mit einem

weiteren MW-Abschwächungsregler (engl. *bias*) bestückt ist, optimiert dieser die MW-Leistung, um die MW-Diode, welche die MW an den phasensensitiven Detektor (kurz: PSD) weiterleitet, entsprechend ihrer Funktion zu positionieren.

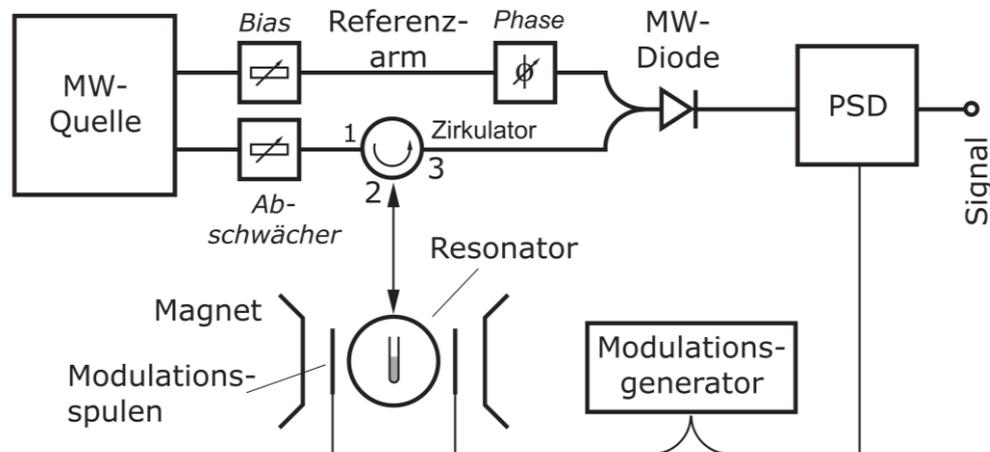


Abb. 14: Schematischer Aufbau eines CW-ESR-Spektrometers (adaptiert aus [62]).

Somit wird bei der Messung des ESR-Signals höchste Sensibilität sowie besonders wichtig eine unverfälschte Linienform⁴ beibehalten. Weiterhin gleicht ein Phasenregler, welcher sich ebenfalls im Referenzarm befindet, die Phasen der MW im Messarm sowie derer im Referenzarm bei gleichbleibender Voreinstellung des CW-ESR-Spektrometers untereinander ab. Schließlich gelang die MW über einen Zirkulator vom Messarm in den Probenkopf des Resonators und somit in diesen integriert. Die reflektierte MW-Leistung wird über den Zirkulatoreingang 3 (s. Abb. 14) und die MW-Diode in den PSD transferiert. Weiterhin sei erwähnt, dass das CW-ESR-Spektrometer außerhalb der Resonanzbedingung der Probe so geeicht wird, dass möglichst wenig MW-Leistung zurückgeworfen wird. Wird die Resonanzbedingung erfüllt, führt dies zu einer zusätzlichen MW-Absorption, welche durch die Probe verursacht wird. Diese erzeugt wiederum eine minimale Verstimmung der Resonator-dämpfung, wodurch mehr MW-Leistung am Resonator reflektiert wird und somit als Resonatorsignal, welches bei allen Spektren in dieser Arbeit durch entsprechende „Hintergrundkorrektur“ eliminiert werden konnte, detektiert wird. Die MW-Leistung durch Absorption ist jedoch bei einer genügend groß gewählten Probenkonzentration meist so klein, dass sie nicht als Gleichspannungsänderung am PSD-Ausgang registriert werden kann [61].

⁴ Die Linienbreite stellt in der ESR ein besonders wichtiges Charakteristikum dar, daher wurde bei der Einstellung der Modulationsamplitude darauf geachtet, dass diese höchstens einem Viertel der Linienbreite entsprach. Eine Linienverfälschung wurde somit unterbunden.

Um das SNR-Verhältnis deutlich zu optimieren, wird demzufolge das B-Feld sinusförmig feldmoduliert, wodurch gegenüber dem Rauschen ausschließlich das ESR-Signal oszilliert. Nach erfolgter Detektion des Signals mit der voreingestellten Modulationsfrequenz am PSD entspricht das erhaltene Absorptionsspektrum nicht dem der Probe (s. Abb. 15, unter a)), sondern vielmehr dem der ersten Ableitung von dieser, wobei dieses dadurch eine höhere Auflösung besitzt (s. Abb. 15, unter b)). In Abb. 15 wurde das Funktionsprinzip der Feldmodulation veranschaulicht. Hinsichtlich des Probenortes wird mit Hilfe von Modulationsspulen des Resonators, welche mit einem Modulationsgenerator vernetzt sind, die Feldmodulation erzeugt. Bei dieser Feldmodulation nimmt letztlich die Sensitivität der CW-ESR-Messung durch entsprechende Wahl der Modulationsamplitude ΔB_0 deutlich zu. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass ΔB_0 nicht die Linienbreite des ESR-Signals der vermessenen radikalischen Probe durchkreuzt, da es sonst zu einer Linienverfälschung und somit zu einer Manipulation der gemessenen Spektren kommt.

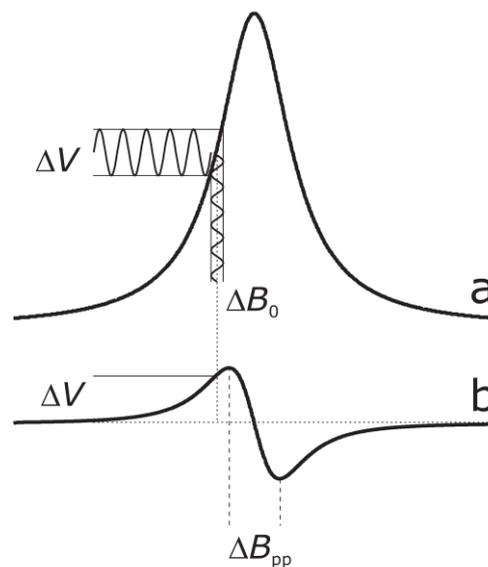


Abb. 15: Detektion der ersten Ableitung b) des Absorptionsspektrums a) einer radikalischen Probe durch Feldmodulation. Diese dient somit zur Erklärung der charakteristischen Linienform gemessener CW-ESR-Spektren. Dabei handelt es sich bei ΔB_0 um die Modulationsamplitude des B-Feldes, bei ΔV um die daraus resultierende Modulationsamplitude der MW und bei ΔB_{pp} um die Linienbreite zwischen dem positiven und negativ ausgerichteten Peak. Dies entspricht dem Abstand zwischen den beiden Wendepunkten des gesamten Absorptionsspektrums (adaptiert aus [62]).

Damit diese Manipulation keinesfalls eintritt sowie eine hohe spektrale Auflösung des CW-ESR-Spektrums auch bei konzentrierteren Proben gegeben ist, sollte für hochpräzise

Messungen ΔB_0 fünfmal kleiner sein als die Linienbreite ΔB_{pp} zwischen positivem und negativem Peak (vgl. Abb. 15) der ersten Ableitung des CW-ESR-Absorptionspektrums. Bei niedriger konzentrierten Proben sollte ΔB_0 nur dreimal so klein wie ΔB_{pp} sein [62]. An der Absorptionslinie der radikalischen Spezies wandelt sich die Feldmodulation in eine Amplitudenmodulation ΔV der eingestrahlenen MW um, wodurch letztlich die weiter oben bereits erläuterte Verstärkung des Resonatorsignals im phasensensitiven Detektor resultiert.

2.3.7 Nitroxidradikale zur Spinmarkierung via Steglich-Veresterung

Im Anklang an Kap. 2.3.1 war es anfangs äußerst schwierig, organische Verbindungen, welche nur ein ungepaartes Elektron in sich tragen, und langlebig genug sind um ESR-Studien bewerkstelligen zu können, zu synthetisieren. Heute gibt es zahlreiche stabile radikalische Verbindungen organischer Herkunft, welche aufgrund ihrer funktionellen Gruppenmodalitäten für die sterische Abschirmung des freien Elektrons und somit für den langlebigen Erhalt der in Ihnen schlummernden intrinsischen Radikalspezies, d.h. des ungepaarten Elektrons, sorgen. Für die praktische Anwendung haben sich die vor allem stabilisierte Nitroxid (NO)-Radikale, wie bspw. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (kurz: TEMPO; s. Abb. 16) oder die hier verwendeten paramagnetischen Spinsonden 4-Hydroxy- und 4-Carboxy-TEMPO (s. Abb. 16), welche sich zur Spinmarkierung der in Kap. 2.1 ff. veranschaulichten pharmazeutischen Wirkstoffe via der von Steglich entwickelten Veresterungsmethode (s. Kap. 2.2 ff.) eigneten, als brauchbar erwiesen. Klarer Vorteil dieser NO-basierten Spinsonden ist ihre enorme Stabilität bei Raumtemperatur (RT) in verdünnten Lösungen, ihre leichte Zugänglichkeit und Verfügbarkeit sowie auch ihre Temperaturresistenz ohne den Verlust ihrer radikalischen Spezies bis ca. $\geq 40^\circ\text{C}$ gemäß eigener Studien. Konträr zur direkten Überprüfung einer paramagnetischen Spezies mittels ESR-spektroskopischer Methoden, wie bspw. die CW-ESR- oder bspw. DEER-Methode, können die NO-Radikale einerseits in verdünnter Lösung als Spinsonden in das zu untersuchende System eingebracht werden, andererseits, wie in der vorliegenden Arbeit praktisch vollzogen, Spin-Label, d.h. kovalent an eine Spinsonde gebundene Substanzen, entweder chemisch direkt an ein System gebunden oder im vorgefertigten Zustand in Form einer durch Spinmarkierung hergestellten „Spinsonde“ in ein obliegendes System (hier: Human Serum Albumin, kurz: HSA) eingeführt werden [63, 64]. Somit können letztlich Rückschlüsse über dynamische und strukturelle Eigenschaften der paramagnetischen Sonde im entsprechenden Spinsystem gezogen werden. Bei den hier durchgeführten HSA-Bindungsstudien mittels der in Kap. 3.2 dargestellten synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) ging es, wie in Kap. 1 bereits beschrieben wurde,

einzig und allein darum die für jeden Wirkstoff charakteristischen Bindungsanteile zu bestimmen. Dynamische Studien der synthetisierten Spezies werden zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen. In Abb. 16 ist die allgemeine Struktur sämtlicher Nitroxidradikale, welche alle als Grundkörper das Piperidingerüst von TEMPO in sich tragen, im üblicherweise verwendeten molekularen Koordinatensystem, welches ebenfalls die Tensor-Hauptachsen der verschiedenen Werte des g - (g_{xx} , g_{yy} und g_{zz}) sowie des A-Tensors (A_{xx} , A_{yy} und A_{zz}) beziffert, veranschaulicht worden.

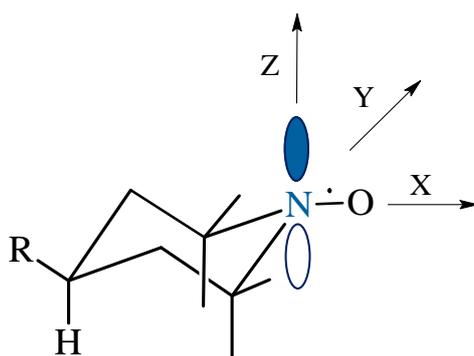


Abb. 16: Allgemeine Strukturformel und Tensor-Hauptachsen einfacher Nitroxidradikale, wie TEMPO ($R = -H$), 4-Carboxy-TEMPO ($R = -COOH$) und 4-Hydroxy-TEMPO ($R = -OH$).

Das freie Elektron ist vorwiegend in den Stickstoff- und Sauerstoff-Orbitalen lokalisiert, wobei dessen Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Lösung primär bei Stickstoffatom liegt. Nach üblicher Konvention zeigt die x -Achse in Richtung der NO - σ -Bindung, die y -Achse in Richtung der Ringebene, d.h. xy -Ebene, und die z -Achse verläuft hierbei entlang des $2p_z$ -Orbitals und steht somit senkrecht zur Ringebene [65]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich das Elektron mit hoher Wahrscheinlichkeit primär beim N-Atom, d.h. im π_z^* -Orbital des Moleküls aufhält und demzufolge die Wechselwirkung mit den Kernspins I des N-Atoms entlang der z -Achse maximal wird, kann darauf geschlossen und leicht nachvollzogen werden, dass der z -Anteil des charakteristischen 3-Linienspektrums der Nitroxide neben dem x - und y -Anteil den größten Beitrag zum Gesamtspektrum liefert, was sich auch bei den durchgeführten Simulationen in EasySpin [1] basierend auf dem Programm von Schneider und Freed [3], auf welche im Theorieteil nicht weiter eingegangen werden soll, da sie in Kap. 4.1.3 ff. bereits tiefgehend beleuchtet wurden, aufgrund der starken Empfindlichkeit durch Änderung des A_{zz} (bzw. g_{zz} -Wertes) bemerkbar machte.

2.3.8 Resonanzbedingung für Nitroxide und Entstehung des Nitroxidspektrums

Im Hinblick auf Kap. 2.3.3 sind in verdünnter Lösung für Nitroxidradikale viele Terme des Spin-Hamiltonoperators \hat{H}_S (vgl. Gl. (2.5)) vernachlässigbar. Weiterhin können gemäß Kap. 2.3.4 und unter Berücksichtigung von Abb. 16 in Kap. 2.3.6 die Spinsonden bei kleinen Resten R nach Konvention von Stokes und Einstein [60] als kugelförmig angesehen werden und rotieren somit sehr langsam in niedrigviskosen Flüssigkeiten, was sich in einem isotropen CW-ESR-Spektrum widerspiegelt. Bei schnelleren Rotationsregimen sind anisotrope Kopplungen nur noch skalar gemittelt und zur Charakteristik eines NO-basierten Spektrums ist es vollkommen ausreichend, ausschließlich die Hyperfein- sowie die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung in \hat{H}_S zu berücksichtigen. In Lösungen werden die A- und g-Tensoren zu rein isotropen Werten reduziert, sodass sich der Hamiltonoperator eines NO-Radikals \hat{H}_{NO} wie folgt beschreiben lässt:

$$\hat{H}_{NO} = g\mu_B \mathbf{B}\hat{\mathbf{S}} + A_{iso} \hat{\mathbf{S}}\hat{\mathbf{I}}. \quad (2.17)$$

Die Lösung der zeitunabhängigen Schrödingergleichung liefert gemäß Gl. (2.18) die Energieeigenwerte des Gesamtspinsystems.

$$\hat{H}_{NO}\psi_{NO} = E_{NO}\psi_{NO} \quad (2.18)$$

Liegt das konstante äußere B_0 -Feld in z -Richtung, vereinfachen sich für isotrope Wechselwirkungen die Energieeigenwerte E_{NO} , wobei der Spinoperator des freien Elektrons $\hat{\mathbf{S}}$ und der des Kerns $\hat{\mathbf{I}}$ durch die entsprechenden magnetischen Spinquantenzahlen m_S und m_I ersetzt werden, zu:

$$E_{NO} = g\mu_B B_0 m_S + A_{iso} m_S m_I. \quad (2.19)$$

Mit Hilfe der Auswahlregeln von $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$, ergibt sich die Energiedifferenz ΔE_{NO} in Form der Resonanzbedingung für Nitroxide zu:

$$\Delta E_{NO} = h\nu_L = g\mu_B B_0 + A_{iso} m_I. \quad (2.20)$$

In Abb. 17 sind alle Energieeigenwerte eines Nitroxidradikals, welche die Lage aller möglichen $(2I+1)$ -Energieniveaus mit $m_I = -I, \dots, +I$ wiedergeben, als Funktion des B_0 -Feldes dargestellt worden. Unter erneuter Verwendung der oben genannten Auswahlregeln

kann das Zustandekommen des charakteristischen 3-Linien-Spektrums, d.h. die Tripletstruktur von Nitroxiden, begründet und nachvollzogen werden.

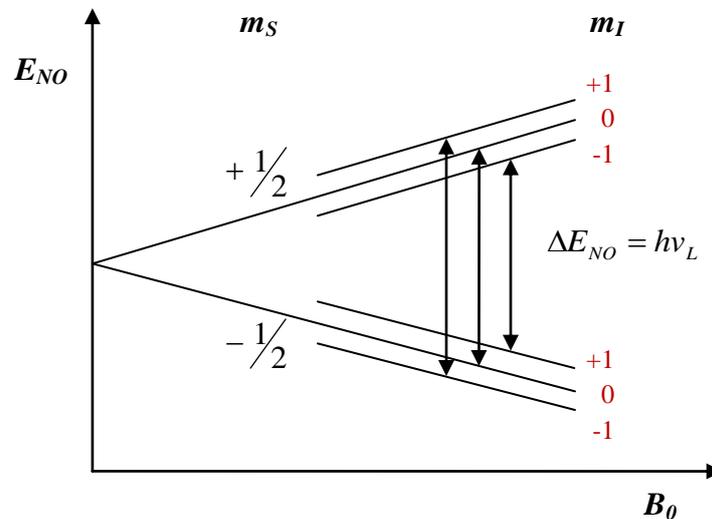


Abb. 17: Zeeman- und Hyperfeinaufspaltung der Energieniveaus des ^{14}N -Kerns eines NO-Radikals ($S=1/2$, $I=1$) mit entsprechenden Absorptionsübergängen, die nach den Auswahlregeln erlaubt sind, in Abhängigkeit vom B_0 -Feld. Jedes Energieniveau spaltet somit $(2I+1=3)$ -fach auf. Das sich hieraus ergebende Nitroxidspektrums (vgl. bspw. Kap. 2.3.4, Abb. 12) besitzt eine Tripletstruktur.

2.4 Scatchard-Analyse

Um die Bindungsfähigkeit der spin-markierten (engl. *spin-gelabelten*) Wirkstoffe, welche in Kap. 2.1 ff. dargestellt wurden, an HSA zu überprüfen, wurden entsprechende CW-ESR-Bindungsstudien durchgeführt (s. Kap 4 ff.). Zur Bestimmung der u.a. für jeden pharmazeutischen Wirkstoff charakteristischen Assoziationskonstanten K_A wurde sich dementsprechend der sog. Scatchard-Analysemethod bedient (vgl. hierzu Kap. 4.1.1 unter f) ff.). Diese analytische Methodik basiert auf dem von Scatchard 1949 entwickelten graphischen Lösungsansatz namens „Scatchard-Plot“ [6], wodurch somit erstmals die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Ligand (hier: synthetisierte TSL, s. Kap. 3.2 ff.) und Rezeptor (hier: HSA) bestimmt werden konnten. Die stattfindenden Interaktionen zwischen dem synthetisierten TEMPO Spin-Label (kurz: TSL) und dem hier verwendeten Rezeptorprotein (HSA) kann fortfolgend durch Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D näher charakterisiert werden. Diese stellt allgemein ausgedrückt ein Maß für die Affinität eines Liganden zum obliegenden Rezeptor dar. Die spezifische Messgröße [HSA-TSL],

Rezeptor-TSL-Komplex, kann bei kontinuierlicher HSA-Konzentration $[HSA]$, d.h. Rezeptorkonzentration, als Funktion der TSL-Konzentration $[TSL]$, d.h. Ligandkonzentration, bestimmt werden. Gemäß Gl. (2.21) kann die Wechselwirkung zwischen TSL und seiner Bindungsstelle, HSA, wie folgt beschrieben werden:



wobei sich unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes die Dissoziationskonstante K_D zu

$$K_D = \frac{[HSA][TSL]}{[HSA-TSL]} \quad (2.22)$$

ergibt. Die totale Rezeptorproteinkonzentration $[HSA_T]$ bestimmt sich hierbei aus der freien Rezeptorproteinkonzentration $[HSA]$ sowie der Konzentration aller im Komplex gebundenen Rezeptoren $[HSA-TSL]$ und lässt sich wie folgt berechnen zu:

$$[HSA_T] = [HSA] + [HSA-TSL]. \quad (2.23)$$

Durch Kombination von Gl. (2.22) und Gl. (2.23) sowie Auflösen nach $[HSA-TSL]$ ergibt sich:

$$[HSA-TSL] = \frac{[HSA_T][TSL]}{K_D + [TSL]}. \quad (2.24)$$

Zur Bestimmung von $[HSA-TSL]$ sowie K_D durch lineare Regression muss die sich anhand von Gl. (2.24) ergebende Bindungskurve linearisiert werden. Die Linearisierung von Gl. (2.24) erfolgt dabei, wie oben bereits angedeutet, nach der von Scatchard [6] entwickelten Methodik. Die sich hierbei ergebende sog. Scatchardgleichung lautet daher wie folgt:

$$\frac{[HSA-TSL]}{[TSL]} = -\frac{1}{K_D} \cdot [HSA-TSL] + \frac{1}{K_D} \cdot [HSA_T], \quad (2.25)$$

wobei es sich bei $[HSA_T]$ um die HSA-Gesamtkonzentration, d.h. Rezeptorgesamtkonzentration, bei $[TSL]$ um die freie, nicht gebundene TSL-Konzentration und bei $[HSA-TSL]$ um die HSA-TSL-Konzentration, d.h. Rezeptor-Ligand-Konzentration handelt. Gemäß Konvention etablierte sich dennoch eine andere Nomenklatur für die jeweilig genannten Konzentrationen, sodass die Rezeptor-Ligand-Konzentration $[HSA-TSL] = [B]$ (engl. *bound*), die Konzentration des freien Liganden bzw. TEMPO Spin-Labels $[TSL] = [F]$ (engl. *free*) und $[HSA_T] =$

B_{\max} (engl. *maximal number of binding sites*, später: $B_{\max} \equiv \mathbf{n}$, vgl. Kap. 4.4, Tab. 14) entspricht und Gl. (2.25) sich wie folgt umschreiben lässt zu:

$$\frac{[B]}{[F]} = -\frac{1}{K_D} \cdot [B] + \frac{1}{K_D} \cdot B_{\max} . \quad (2.26)$$

Gemäß dieser Gleichung lässt sich die lineare Regression leicht bewerkstelligen, sodass sich aus der Steigung direkt K_A als negativer reziproker Wert von K_D ergibt, wobei sich durch lineare Extrapolation der erhaltenen Geraden die max. Anzahl an Bindungsstellen pro Rezeptormolekül durch Ablesen des resultierenden Schnittpunktes auf der x-Achse äußerst einfach bestimmen lässt. Unabhängig von Gl. (2.26) ließ sich durch arithmetisches Mitteln aller gebundenen Bindungsanteile, welche durch Simulation entsprechend gemessener CW-ESR-Spektren bestimmt werden konnten, eine mittlere Bindungsaffinität der jeweiligen TSL bzgl. aller bindenden Proteine in Lösung ermitteln. Bezüglich einer graphischen Illustration eines Scatchard-Plots sei auf Kap. 4.3 ff. verwiesen.

3. Experimenteller Teil

3.1 Allgemeines

3.1.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien konnten von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ABCR GmbH & Co. KG, VWR International GmbH sowie ACROS Organics erworben und ohne weitere Aufreinigungsschritte zur Synthese eingesetzt werden.

Die zur Isolation der beiden Wirkstoffe, Phenprocoumon und Febuxostat, benötigten Medikamente (Marcumar[®] 3 mg Tabletten (Meda Pharma GmbH & Co. KG); Adenuric[®] 120 mg Filmtabletten (Berlin Chemie AG)) wurden mit freundlicher Genehmigung unseres Institutsarztes PD. Dr. Volker Mailänder von der Rathaus Apotheke Mainz zu rein wissenschaftlichen Zwecken bezogen.

Die für die chemischen Reaktionen benötigten Lösungsmittel wurden entweder nach den jeweiligen Standardvorschriften getrocknet, wenn sie nicht in absolutierter Form erhältlich waren. Für alle Reaktionen, die unter Inertgasbedingungen durchgeführt worden sind, fand jeweils Argon der Firma Linde als Schutzgas Verwendung.

3.1.2 Charakterisierungsmethoden

a) NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem DPX 250 NMR-Spektrometer der Firma Bruker gemessen, wobei die Referenzierung auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels erfolgte. Die chemischen Verschiebungen (δ -Werte) der NMR-Daten wurden in ppm relativ zum internen Standard signifiziert. Die Messwerte wurden wie folgt angegeben: *Experiment-NMR (Messfrequenz, Lösungsmittel, Temperatur): δ [ppm] = δ -Wert (Spinmultiplizität, Anzahl der Kerne, ggf. Kopplungskonstante(n))*. Die Kopplungskonstanten ($^xJ_{a,b}$) wurden in Hertz (Hz) angegeben, wobei die hochgestellte Zahl x die Anzahl der Bindungen beziffert, die zwischen den gerade miteinander koppelnden Kernen a und b liegt. Die Spinmultiplizität wurde durch die Symbole s = Singulett, d = Dublett, dd = Duplett vom Duplett, t = Triplett, m = Multipllett klassifiziert. Zur Hilfe der Auswertung aufgenommener ¹H-NMR-Spektren wurde sich der Literatur [68] bedient.

b) Massenspektrometrie

Die Felddesorptions (FD)-Massenspektren wurden an einem Fisons Instruments Sectorfield Mass Spectrometer VG Instruments ZAB 2-SE-FPD bei einer angelegten Spannung von 8 kV aufgenommen. Neben den gemessenen m/z -Werten wurden in Klammern die jeweils zugehörigen Signalintensitäten (in %) sowie die Art der Zusammensetzung der positiv geladenen Molekülonen angegeben. Zudem ist die FD-Methode zur Charakterisierung unpolarer Moleküle wie der hier synthetisierten TEMPO-Ester besonders gut geeignet, da eine Fragmentierung der Molekülonen nicht eintritt.

c) Elementaranalyse

Die elementare Zusammensetzung der synthetisierten Feststoffe wurde hauptsächlich hinsichtlich ihres Gehaltes an Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N) sowie falls vorhanden Schwefel (S) mittels einem CHNS-Elementaranalysator Vario EL Cube der Firma Elementar Analysensysteme GmbH im analytischen Labor der Organischen Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz untersucht.

d) IR-Spektroskopie

Die Infrarot (IR)-Spektren wurden mit einem Nicolet 730 FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Für die Herstellung der 13mm-KBr-Presslinge wurde eine hydraulische Pumpe sowie zugehöriges Presswerkzeug der Firma Perkin-Elmer verwendet. Während der Messung wurde der KBr-Pressling dauerhaft mit einem trockenen Stickstoffstrom gespült, um einem Luftfeuchtigkeitseinfluss, der bei der Probenaufnahme stören könnte, entgegenzuwirken. Für die Probenpräparation wurde ausschließlich trockenes KBr verwendet. Die Zuordnung der IR-Absorptionsbanden erfolgte gemäß [69] unter Berücksichtigung von [70].

e) Röntgenstrukturanalyse

Die zu untersuchenden Einkristalle wurden mit einem Nonius KCCD Diffraktometer unter Verwendung von Mo-K α -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), die mit einem doppelten Graphitmonochromator gefiltert wurde, bei einer Temperatur von 120 K vermessen. Die Röntgenstrukturen wurden durch direkte Methoden (SHELXS) gelöst und sind mit Hilfe des Programms Diamond 3.2 von der Firma Crystal Impact GbR graphisch visualisiert worden.

f) Schmelzpunktbestimmung

Alle ermittelten Schmelzpunkte wurden mit dem vollautomatischen Schmelzpunktgerät Büchi Melting Point B-545 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen) gemessen. Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert abgelesen und angegebenen worden.

g) ESR-Spektroskopie

Alle in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Continuous Wave (CW) -Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektren wurden mit dem MiniScope MS200 CW-ESR-Spektrometer (X-Band, MW-Frequenz: ~9.4 GHz) der Firma Magnettech (Berlin) gemessen, welches standardmäßig mit einem rechteckigen MW-Resonator ausgerüstet war. Unter Verwendung des Temperaturkontrollers TC-H02 (Magnettech, Berlin) konnte die Temperatur während allen Messungen auf einem konstanten Wert gehalten werden. Somit war eine elektronische Temperaturregelung auf 0,1°C im Bereich von -170°C bis 250°C möglich. Die exakte Mikrowellen (MW)-Frequenz der jeweiligen Messungen konnte mittels eines Frequenzzählers (Racal-Dana 2101) bestimmt werden. Für die Charakterisierung der synthetisierten TEMPO-Ester (s. Kap. 3.2 ff.) wurde eine interne Kalibration des Magnet (B)-Feldes durch Verwendung eines Mangan (Mn)-Standards durchgeführt. Die angegebenen g_{iso} -Werte, welche direkt aus dem Zentralfeldpeak der jeweiligen, experimentellen isotropen 3-Linienspektren der TEMPO-Ester bestimmt worden waren, bilden einen simplen Fingerabdruck des jeweiligen Radikals. Eine präzise Bestimmung der g-Tensorwerte mittels einer Tieftemperatur W-Band-Messung konnte leider aufgrund des Umzuges der Arbeitsgruppe Hinderberger an die MLU Halle-Wittenberg nicht mehr durchgeführt werden, wird aber in Kürze folgen. Alle weiteren angegebenen ESR-Parameter wurden durch eine Simulation der experimentellen CW-ESR-Spektren in EasySpin [1], basierend auf dem Programm von Schneider und Freed [2], unter zur Hilfenahme der Software Matlab 2010a des Unternehmens The MathWorks Inc. ermittelt. Als Startwerte für die Simulationen der experimentellen Spektren wurden die g-Werte von 4-Hydroxy-TEMPO ($g_{xx} = 2.0095$, $g_{yy} = 2.0064$ und $g_{zz} = 2.0027$) gemäß Literatur [3] verwendet. Weiterhin wurden Kapillaren, sog. Mikropipetten ($\varnothing = 1,5$ mm, Blaubrand[®] intraMark, max. FV: 50 μl), der Firma Brand GmbH + Co. KG als Probenröhrchen verwendet, welche mittels Critoseal[®] (Leica Microsystems) versiegelt wurden.

h) Präparative Säulenchromatographie

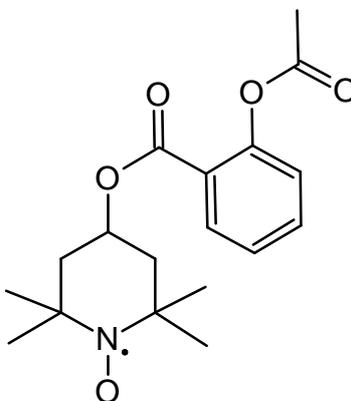
Für die säulenchromatographische Aufreinigung der Syntheseprodukte wurde als stationäre Phase Kieselgel 60, d.h. Silikagel mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 Å, der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG mit einer Korngröße von 0.063 - 0.2 mm verwendet.

i) Dünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung der ermittelten R_f -Werte (s. Kap. 3.2 ff.) mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit 0,2 mm Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminium-Fertigfolien (ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄) der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet. Die Detektion der synthetisierten TEMPO-Ester erfolgte anhand der Eigenfärbung, durch Fluoreszenzlöschung bei kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) sowie durch Eigenfluoreszenz bei langwelligem UV-Licht ($\lambda = 365$ nm).

3.2 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Analgetika

3.2.1 2-Acetoxybenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (ASS-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 45 mg (0.25 mmol, 1 eq.) 2-Acetoxybenzoesäure (Aspirin[®]) und 4.9 mg (0.04 mmol, 0.16 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene farblose Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (72.2 mg, 0.35 mmol, 1.4 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 20 min. bei 0°C gerührt wurde, wurden eine Lösung aus 53.4 mg (0.31 mmol, 1.25 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 5 ml trockenem DCM schlagartig in die stetig rührende Reaktionslösung injiziert und für weitere 24 h bei RT gerührt. Im Anschluss konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE) (6:1)) = 0.20) die

Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das rote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂ (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (6:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei 53.5 mg (0.16 mmol, 64%) **ASS-TSL**, der TEMPO-Ester von Acetylsalicylsäure, in Form eines dunkelroten, kristallinen Feststoffes isoliert werden konnte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): C₁₈H₂₄NO₅

Berechnet: m/z = 334.4

Gefunden: m/z (%) = 334.4 (100, M⁺), 668.7 (3.2, [2M]⁺).

Elementaranalyse: C₁₈H₂₄NO₅

Berechnet: C: 64.65%, H: 7.23%, N: 4.19%, O: 23.92%.

Gefunden: C: 64.62%, H: 6.89%, N: 4.24%.

Schmelzpunktbestimmung:

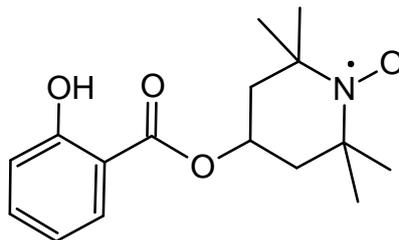
Smp.: 68.0°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3088, 3072 (=C-H, w); 2991, 2977, 2953, 2939 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m); 2850 (-CH₂, w); 1760, 1717 (C=O, s), 1675, 1652, 1635 (C=C, m); 1606 (Ringschwingung, m); 1580, 1559, 1539, 1505 (N-O, m-w); 1485 (Ringschwingung, m); 1467, 1449, 1429 (-CH₃- u. -CH₂-def., m); 1392, 1380, 1369, 1354, 1312 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1297, 1274, 1262, 1242, 1220 (-C-O-C, s-m); 1197, 1181, 1161, 1138, 1084, 1042 (-C-O-C, s-m); 1008, 978, 961, 941, 918, 909, 881, 860, 843, 820 797, 754, 707 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 687, 671, 650, 601 (-C-C, s-m); 585, 567, 561, 550, 526, 517.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

A_{xx} = A_{yy} = 16.9 MHz, A_{zz} = 98.8 MHz; A_{iso} = 44.2 MHz; g_{iso} = 2.006267; τ_R = 77.8 ps.

3.2.2 2-Hydroxybenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (SAL-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 138.9 mg (1.01 mmol, 1 eq.) 2-Hydroxybenzoesäure, 208.4 mg (~1.21 mmol, 1.2 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 14.7 mg (0.12 mmol, ~0.12 eq.) DMAP in jeweils 15 ml trockenem DMF und DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (249.6 mg, 1.21 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und anschließend 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (2:1)) = 0.74) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das rote Filtrat auf ca. 2.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (2:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt – nach Entfernung des Laufmittels – nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei 251.5 mg (0.86 mmol, 85%) **SAL-TSL**, der TEMPO-Ester von Salicylsäure, als dunkelroter, kristalliner Feststoff anfiel.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_4$

Berechnet: $m/z = 292.4$

Gefunden: m/z (%) = 292.1 (100, M^+), 584.0 (12.5, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_4$

Berechnet: C: 65.73%, H: 7.58%, N: 4.79%, O: 21.89%.

Gefunden: C: 65.87%, H: 7.81%, N: 4.90%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 111.6°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3273, 3176, 3143 (-O-H, s-m, b); 3078, 3034 (=C-H, w); 2994, 2980, 2934, 2909 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m); 1715, 1664 (C=O, s); 1635, 1614 (C=C, m-w); 1587, 1558, 1540, 1521 (N-O, m-w); 1488, 1467 (CH₃- u. -CH₂-def, s); 1420 (-OH-def., m); 1392, 1379, 1364, 1342 (-OH-def. m), 1328, 1313 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1301, 1252, 1243, 1219 (-C-O-C, s-m); 1198, 1181, 1156, 1140, 1090, 1036 (-C-O u. -C-O-C, s-m); 1005, 980, 964, 940, 917, 871, 843, 818, 801, 761, 727, 702 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 686, 669, 619 (-C-C, m-w); 594, 561, 533, 522.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.2$ MHz, $A_{zz} = 98.2$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.2$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006266$; $\tau_R = 70.3$ ps.

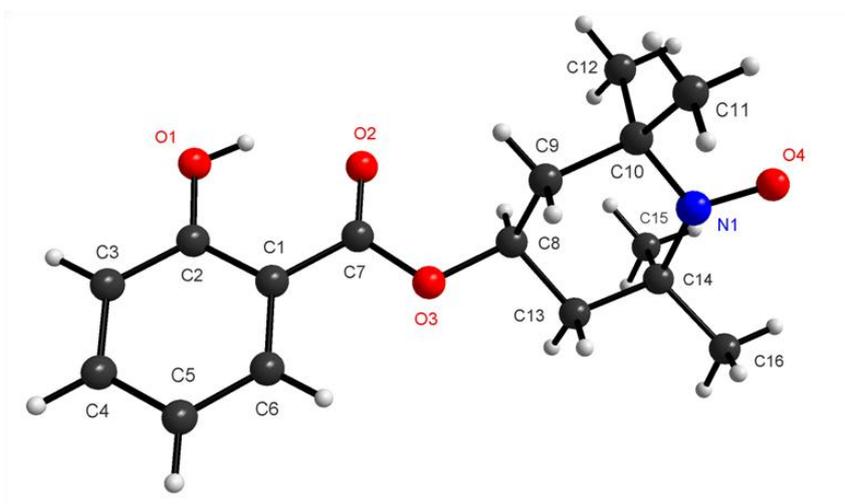
Röntgenstrukturanalyse (Mo-K α , 120 K):

Abb. 18: Röntgenstruktur von 2-Hydroxybenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (SALTSL)

Tab. 1: Daten zur Röntgenstrukturanalyse von **SAL-TSL**

Summenformel	$C_{16}H_{22}NO_4$	Kristallsystem	monoklin
Molmasse [g/mol]	292.35	Raumgruppe	P12 ₁ /a1 (14)
Wellenlänge [Å]	0.71073	Zellvolumen [Å ³]	1566.94(10)
Temperatur [K]	120	Dichte [g/cm ³]	1.23918
Moleküle/Elementarzelle	4		
Zellparameter [Å, °]			
a	11.4549(5)	α	90
b	11.8166(3)	β	103.1741(15)
c	11.8892(5)	γ	90

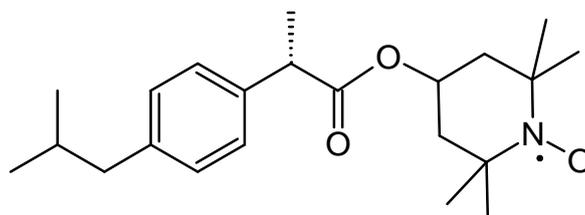
Tab. 2: Ausgewählte Bindungslängen [Å] und –winkel [°] von **SAL-TSL**

N1-O4	1.2885(11)	O4-N1-C14	116.00(9)
N1-C14	1.4963(14)	O4-N1-C10	115.58(9)
N1-C10	1.4967(15)	C14-N1-C10	124.06(8)
O1-C2	1.3548(16)	C8-O3-C7	116.64(8)
O2-C7	1.2275(13)	N1-C14-C13	109.52(8)
O3-C8	1.4621(12)	N1-C14-C15	108.89(9)
O3-C7	1.3350(12)	C13-C14-C15	111.98(9)
C14-C13	1.5342(14)	N1-C14-C16	107.40(8)
C14-C15	1.5364(15)	C13-C14-C16	109.43(9)
C14-C16	1.5282(16)	C15-C14-C16	109.50(9)
C10-C12	1.5331(16)	C14-C13-C8	111.60(9)
C10-C11	1.5298(16)	C9-C10-N1	110.13(8)
C9-C10	1.5311(14)	C9-C10-C12	111.08(9)
C8-C9	1.5172(14)	N1-C10-C12	109.76(9)
C8-C13	1.5133(15)	C9-C10-C11	108.66(9)
C5-C6	1.3863(16)	N1-C10-C11	107.77(9)
C5-C4	1.3931(19)	C12-C10-C11	109.36(10)
C3-C4	1.380(2)	C8-C9-C10	112.93(8)
C2-C3	1.3993(17)	O3-C8-C9	108.77(8)
C1-C7	1.4758(14)	O3-C8-C13	106.73(8)
C1-C6	1.3975(16)	C9-C8-C13	109.29(9)
C1-C2	1.4057(15)	C1-C7-O3	113.44(9)

Fortsetzung von Tab. 2

C1-C7-O2	123.45(9)	C1-C2-O1	122.85(10)
O3-C7-O2	123.10(9)	C1-C2-C3	119.52(11)
C1-C6-C5	120.88(11)	O1-C2-C3	117.63(11)
C6-C5-C4	119.03(12)	C7-C1-C6	121.35(9)
C5-C4-C3	121.24(11)	C7-C1-C2	119.23(10)
C2-C3-C4	119.90(11)	C6-C1-C2	119.42(10)

3.2.3 (S)-(+)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (IBU-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 154.7 mg (0.75 mmol, 1 eq.) (S)-(+)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure, 194.6 mg (~1.13 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (194.2 mg, ~0.94 mmol, 1.25 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, wurde nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (2:1)) = 0.71) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (2:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei sich 220 mg (0.61 mmol, 81%) **IBU-TSL**, der TEMPO-Ester von (S)-(+)-Ibuprofen, als roter, kristalliner Feststoff manifestierte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_3$

Berechnet: $m/z = 360.5$

Gefunden: m/z (%) = 360.2 (100, M^+), 720.5 (47.2, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: C₂₂H₃₄NO₃

Berechnet: C: 73.29%, H: 9.51%, N: 3.89%, O: 13.31%.

Gefunden: C: 73.32%, H: 9.24%, N: 4.23%.

Schmelzpunktbestimmung:

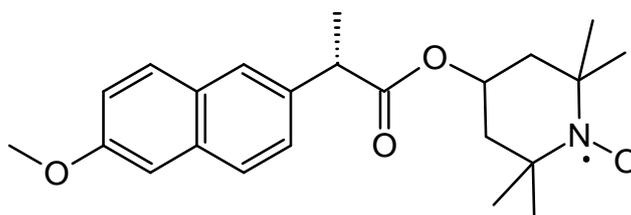
Smp.: 48.9°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3090, 3050 (=C-H, w); 2972, 2953, 2933 (-C-H, s); 2870 (-CH₃, m); 1732 (C=O, s); 1655, 1625 (C=C, m-w); 1610 (Ringschwingung, w); 1574, 1513 (N-O, m-w); 1464 (s), 1422 (CH₃- u. -CH₂-def, s-m); 1377, 1365, 1333 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1292, 1239, 1201 (-C-O-C, s-m); 1161, 1122, 1089, 1074, 1055, 1021 (-C-O-C, s-m); 1011, 981, 965, 938, 920, 884, 849, 800, 779, 756, 730, 681 (-C-C u. =C-H-def., m-w).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.5$ MHz, $A_{zz} = 97.4$ MHz; $A_{iso} = 44.1$ MHz; $g_{iso} = 2.006262$; $\tau_R = 84.4$ ps.

3.2.4 (S)-(+)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (NPX-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 172.7 mg (0.75 mmol, 1 eq.) (S)-(+)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure, 180.9 mg (1.05 mmol, 1.4 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (196.3 mg, ~0.95 mmol, 1.26 eq.) langsam zugetropft. Danach wurde für 2 h

bei 0°C und anschließend für 24 h bei RT gerührt. Nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (40:1)) = 0.48) konnte die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4.5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (40:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan/PE (1:1) umkristallisiert, wobei 238.4 mg (0.62 mmol, 83%) **NPX-TSL**, der TEMPO-Ester von Naproxen⁵, als rosa, kristalliner Feststoff gewonnen werden konnte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_4$

Berechnet: $m/z = 384.5$

Gefunden: m/z (%) = 384.1 (100, M^+), 768.4 (20.3, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_4$

Berechnet: C: 71.85%, H: 7.86%, N: 3.64%, O: 16.64%.

Gefunden: C: 72.07%, H: 8.04%, N: 3.63%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 101.1°C

IR-Spektroskopie (KBr):

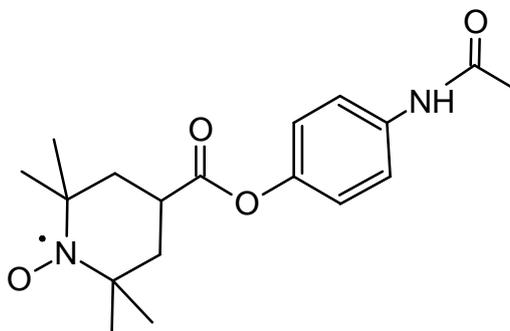
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3057, 3002 (=C-H, m-w); 2976, 2936, 2900 (-C-H, s-m); 2870 (-CH₃, m); 2830 (-O-CH₃, w); 1726 (C=O, s); 1680, 1653, 1631 (C=C, m-w), 1606 (Ringschwingung, s); 1558, 1540, 1506 (N-O, m-w); 1484 (Ringschwingung, m); 1464, 1447, 1418 (CH₃- u. -CH₂-def, m); 1390, 1377, 1366, 1354, 1347, 1328 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1299, 1269, 1244, 1229 (-C-O-C, s-m); 1193, 1174, 1156, 1121, 1091, 1073, 1029 (-C-O-C, ss-s); 1007, 979, 959, 942, 929, 915, 898, 858, 817, 796, 764, 748, 691, 669, 660 (-C-C u. =C-H-def., s-m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 97.5$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.1$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006270$; $\tau_R = 85.9$ ps.

⁵ Als Arzneistoff wird Naproxen ausschließlich als (S)-Enantiomer eingesetzt, da das (R)-Enantiomer als nicht-steroidales Antiphlogistikum unwirksam ist. Daher ist nach üblichem Sprachgebrauch, wie auch hier, bei der Titulierung von Naproxen immer vom (S)-Enantiomer die Rede.

3.2.5 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure(N-acetyl-4-aminophenyl)ester (PCM-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 125.5 mg (0.83 mmol, ~1.5 eq.) N-Acetyl-4-aminophenol, 110 mg (0.55 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 8.6 mg (0.07 mmol, ~0.13 eq.) DMAP in jeweils 15 ml trockenem DCM und DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (142.4 mg, ~0.69 mmol, 1.25 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und daran anschließend 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (1:4)) = 0.46) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das dunkelrote Filtrat auf ca. 2.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (1:4)) des Rohproduktes wurde das Produkt – nach Entfernung des Laufmittels – nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei 143.4 mg (0.43 mmol, 78%) **PCM-TSL**, der TEMPO-Ester von Paracetamol, als roter, kristalliner Feststoff ausfiel und isoliert werden konnte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$

Berechnet: $m/z = 333.4$

Gefunden: m/z (%) = 333.3 (100, M^+), 667.3 (7.6, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$

Berechnet: C: 64.84%, H: 7.56%, N: 8.40%, O: 19.20%.

Gefunden: C: 64.87%, H: 7.35%, N: 8.57%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 154.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3325, 3292, 3258, 3199, 3142 (-N-H, m); 3077 (=C-H, m); 2992, 2974, 2932 (-C-H, s); 2870 (-CH₃, m); 2850 (-CH₂, m); 2813 (-C-H, m); 1754, 1678, 1665 (C=O, s); 1626, 1613 (-N-H-def. u. C=C, m); 1556, 1506 (N-O, s); 1463, 1437, 1407 (CH₃- u. -CH₂-def, s-m); 1392, 1379, 1362, 1312 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1295, 1266, 1244, 1229 (-C-O-C, s-m); 1197, 1183, 1164, 1135, 1101, 1039 (-C-O-C, s-m); 1014, 1005, 968, 951, 932, 900, 893, 863, 834, 819, 813, 799, 747, 701, 660, 642, 624, 606 (-C-C u. =C-H-def., m-w); 560, 532, 520.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 98.5$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.4$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006269$; $\tau_R = 126.6$ ps.

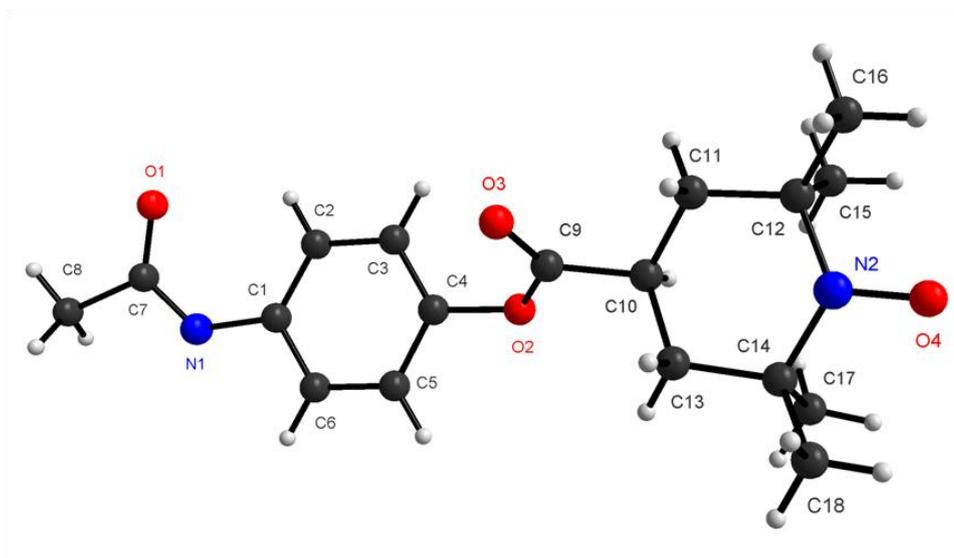
Röntgenstrukturanalyse (Mo-K α , 120 K):

Abb. 19: Röntgenstruktur von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure(N-acetyl-4-aminophenyl)ester (PCM-TSL)

Tab. 3: Daten zur Röntgenstrukturanalyse von **SAL-TSL**

Summenformel	$C_{16}H_{22}NO_4$	Kristallsystem	monoklin
Molmasse [g/mol]	292.35	Raumgruppe	P12 ₁ /a1 (14)
Wellenlänge [Å]	0.71073	Zellvolumen [Å ³]	1566.94(10)
Temperatur [K]	120	Dichte [g/cm ³]	1.23918
Moleküle/Elementarzelle	4		
Zellparameter [Å, °]			
a	11.4549(5)	α	90
b	11.8166(3)	β	103.1741(15)
c	11.8892(5)	γ	90

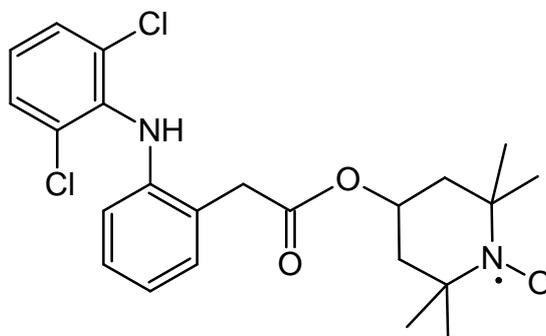
Tab. 4: Ausgewählte Bindungslängen [Å] und –winkel [°] von **SAL-TSL**

N1-O4	1.2885(11)	O4-N1-C14	116.00(9)
N1-C14	1.4963(14)	O4-N1-C10	115.58(9)
N1-C10	1.4967(15)	C14-N1-C10	124.06(8)
O1-C2	1.3548(16)	C8-O3-C7	116.64(8)
O2-C7	1.2275(13)	N1-C14-C13	109.52(8)
O3-C8	1.4621(12)	N1-C14-C15	108.89(9)
O3-C7	1.3350(12)	C13-C14-C15	111.98(9)
C14-C13	1.5342(14)	N1-C14-C16	107.40(8)
C14-C15	1.5364(15)	C13-C14-C16	109.43(9)
C14-C16	1.5282(16)	C15-C14-C16	109.50(9)
C10-C12	1.5331(16)	C14-C13-C8	111.60(9)
C10-C11	1.5298(16)	C9-C10-N1	110.13(8)
C9-C10	1.5311(14)	C9-C10-C12	111.08(9)
C8-C9	1.5172(14)	N1-C10-C12	109.76(9)
C8-C13	1.5133(15)	C9-C10-C11	108.66(9)
C5-C6	1.3863(16)	N1-C10-C11	107.77(9)
C5-C4	1.3931(19)	C12-C10-C11	109.36(10)
C3-C4	1.380(2)	C8-C9-C10	112.93(8)
C2-C3	1.3993(17)	O3-C8-C9	108.77(8)
C1-C7	1.4758(14)	O3-C8-C13	106.73(8)
C1-C6	1.3975(16)	C9-C8-C13	109.29(9)
C1-C2	1.4057(15)	C1-C7-O3	113.44(9)

Fortsetzung von Tab. 4

C1-C7-O2	123.45(9)	C1-C2-O1	122.85(10)
O3-C7-O2	123.10(9)	C1-C2-C3	119.52(11)
C1-C6-C5	120.88(11)	O1-C2-C3	117.63(11)
C6-C5-C4	119.03(12)	C7-C1-C6	121.35(9)
C5-C4-C3	121.24(11)	C7-C1-C2	119.23(10)
C2-C3-C4	119.90(11)	C6-C1-C2	119.42(10)

3.2.6 2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (DCF-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 94.8 mg (0.32 mmol, 1 eq.) 2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)amino]phenyl]essigsäure, 82.7 mg (0.48 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 4.9 mg (0.04 mmol, ~0.13 eq.) DMAP in jeweils 15 ml trockenem DCM und DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (86.7 mg, ~0.42 mmol, 1.3 eq.) langsam zutropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (40:1)) = 0.57) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 5 - 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das hellrote Filtrat auf ca. 2.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (40:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Heptan/PE (1:1) umkristallisiert, wobei sich 108.2 mg (0.24 mmol, 75%) **DCF-TSL**, der TEMPO-Ester von Diclofenac, als rotoranger, kristalliner Feststoff manifestierte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $C_{23}H_{27}Cl_2N_2O_3$

Berechnet: $m/z = 450.4$

Gefunden: m/z (%) = 449.0 (100, M^{+} mit $^{35}Cl+^{35}Cl$), 451.4 (27.3, M^{+} mit $^{35}Cl+^{37}Cl$), 453.2 (45.2, M^{+} mit $^{37}Cl+^{37}Cl$), 898.4 (3.7, $[2M]^{+}$ mit $^{35}Cl+^{35}Cl$), 902.2 (3.2, $[2M]^{+}$ mit $^{35}Cl+^{37}Cl$).

Elementaranalyse: $C_{23}H_{27}Cl_2N_2O_3$

Berechnet: C: 61.34%, H: 6.04%, Cl: 15.74%; N: 6.22%, O: 10.66%.

Gefunden: C: 61.37%, H: 6.30%, N: 6.04%.

Schmelzpunktbestimmung:

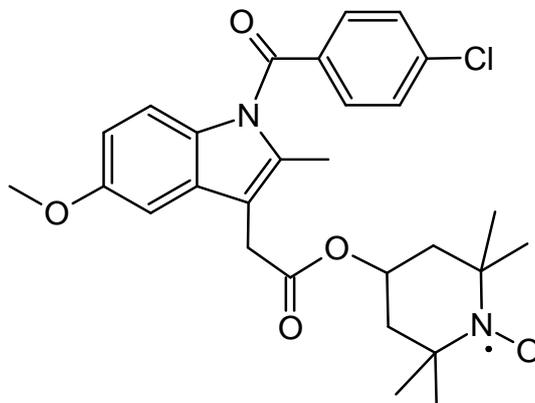
Smp.: 40.6°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3321 (-N-H, m); 3064, 3026 (=C-H, w); 2995, 2974 (-C-H, m); 2930, 2850 (-CH₂, w); 1716 (C=O, s); 1652, 1643, 1636 (C=C, w); 1610, 1589 (Ringschwingung, m); 1578, 1565 (-N-H-def., m); 1506 (N-O, s); 1453, 1419 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1378, 1364, 1342, 1325 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1293, 1278, 1265, 1256, 1238, 1218 (-C-O-C, s-m); 1194, 1178, 1161, 1147 (s), 1092, 1071, 1045, 1028 (-C-O-C, s-m); 1009, 985, 970, 938, 888, 868, 849, 831 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 780 (s), 757, 747 (s), 717 (-CH₂-def., m); 698, 680, 660, 609 (-C-Cl u. =C-H, s-m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.5$ MHz, $A_{zz} = 97.4$ MHz; $A_{iso} = 44.1$ MHz; $g_{iso} = 2.006271$; $\tau_R = 99.5$ ps.

3.2.7 2-[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]essigsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (IMC-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 225.4 mg (0.63 mmol, 1 eq.) 2-[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]essigsäure, 163.6 mg (~0.95 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 9.8 mg (0.08 mmol, ~0.13 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (169.2 mg, 0.82 mmol, 1.3 eq.) langsam zutropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und daran anschließend 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (50:1)) = 0.51) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (50:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Pentan umkristallisiert, wobei 235.5 mg (0.46 mmol, 73%) **IMC-TSL**, der TEMPO-Ester von Indometacin, ein dunkeloraner, kristalliner Feststoff, isoliert wurde.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_5$

Berechnet: $m/z = 512.0$

Gefunden: m/z (%) = 511.5 (100, M^+ mit ^{35}Cl), 513.7 (45.8, M^+ mit ^{37}Cl), 1024.5 (8.3, $[\text{2M}]^+$ mit $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_5$

Berechnet: C: 65.68%, H: 6.30%, Cl: 6.92%; N: 5.47%, O: 15.62%.

Gefunden: C: 65.67%, H: 6.31%, N: 5.36%.

Schmelzpunktbestimmung:

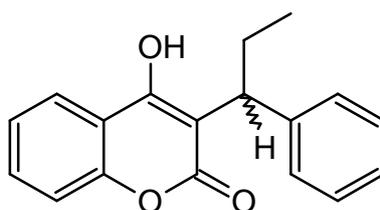
Smp.: 130.8°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3079, 3060, 3050 (=C-H, w); 2996, 2974 (-C-H, m); 2960 (-CH₃, m); 2945 (-C-H, m); 2925 (-CH₂, w); 2896, 2855 (-C-H, m-w), 2829 (-O-CH₃, m); 1740, 1676 (C=O, s); 1636 (C=C, w), 1608, 1590 (Ringschwingung, m), 1559, 1540 (N-O, w); 1478, 1468, 1457, 1440, 1406 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1375, 1366, 1355, 1336, 1322 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1289, 1266, 1244, 1225, 1203 (-C-O-C, s-m); 1167, 1146, 1092, 1071, 1036, 1025, 1016, 987, 967, 926, 902, 861, 836 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 794, 756, 731, 722, 690, 669 (-C-Cl u. =C-H, s-m); 640, 631, 619, 606 (-C-C, m), 594 (-C-Cl, m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 97.8$ MHz; $A_{iso} = 44.2$ MHz; $g_{iso} = 2.006271$; $\tau_R = 126.0$ ps.

3.3 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Antikoagulantien**3.3.1 Isolierung von Phenprocoumon aus Marcumar[®]**

Da Phenprocoumon ((*RS*)-4-Hydroxy-3-(1-phenylpropyl)coumarin) als Reinsubstanz zur nachfolgenden Synthese des entsprechenden TEMPO-Esters (s. Kap. 3.2.2) benötigt wurde, wurden 98 Marcumar[®] 3 mg Tabletten (Meda Pharma GmbH & Co. KG) in einem Keramikmörser pulverisiert. Anschließend wurde die pulverisierte Mischung zur Abtrennung übriger Tablettenbestandteile (Laktose-Monohydrat, Magnesiumstearat (Ph.Eur.), Maisstärke und Talkum) in ca. 500 ml trockenem Chloroform aufgenommen und die Suspension für ca. 1 h bei RT gerührt. Nach entsprechender Sedimentation der unlöslichen Bestandteile wurde die

Wirkstofflösung abdekantiert, danach nochmals filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer abdestilliert. Übrig blieben 292 mg (1.04 mmol, 99%) eines farblosen, kristallinen Feststoffes, welcher letztlich isoliert und zur Synthese von **PPC-TSL** (s. Kap. 3.32) eingesetzt werden konnte.

NMR-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6 , 300 K)):

δ [ppm] = 0.98 (t, $^3J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3); 2.25 (m, 2H, CH_2); 4.47 (t, $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 7.6$ Hz, 1H, CH); 7.39 (m, 8H, ArH); 8.12 (m, 1H, ArH).

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3$

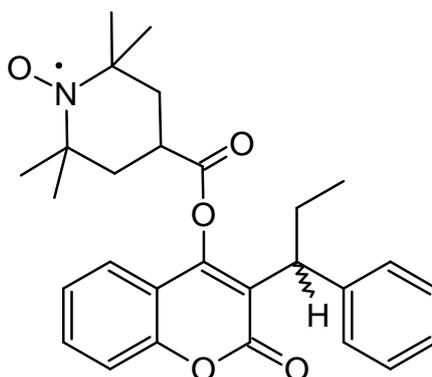
Berechnet: $m/z = 280.3$

Gefunden: m/z (%) = 280.5 (100, M^+), 561.0 (9.8, $[\text{2M}]^+$).

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 179.5°C

3.3.2 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2-oxo-3-[(*RS*)-1-phenylpropyl]-2*H*-chromen-4-yl]ester (PPC-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 280.3 mg (1.00 mmol, 1.25 eq.) (*RS*)-4-Hydroxy-3-(1-phenylpropyl)cumarin, 160.2 mg (0.80 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, ~0.11 eq.) DMAP in 40 ml trockenem Chloroform unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem Chloroform gelöstes DCC (185.7 mg, 0.90 mmol, ~1.13 eq.) langsam zugetropft. Danach wurde weitere 2 h bei 0°C und anschließend 24 h bei RT gerührt. Nach

entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (40:1)) = 0.64) konnte die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (40:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei sich 273 mg (0.59 mmol, 74%) **PPC-TSL**, der TEMPO-Ester von Phenprocoumon, als rotoranger, kristalliner Feststoff herausstellte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{NO}_5$

Berechnet: $m/z = 462.6$

Gefunden: m/z (%) = 462.2 (100, M^+), 925.1 (3.3, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{NO}_5$

Berechnet: C: 72.70%, H: 6.97%, N: 3.03%, O: 17.29%.

Gefunden: C: 73.02%, H: 6.92%, N: 2.97%.

Schmelzpunktbestimmung:

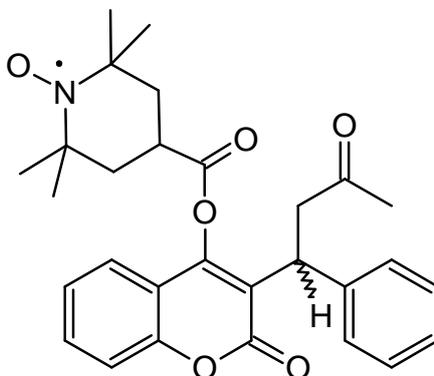
Smp.: 138.1°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3025 (=C-H, w); 2972, 2932 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m); 2852 (-CH₂, w); 1769, 1728, 1714, 1687 (C=O, s-m); 1673, 1627 (C=C, s-m); 1608 (Ringschwingung, s); 1572, 1558 (N-O, m-w); 1494 (Ringschwingung, m); 1455 (-CH₃- u. -CH₂-def., s); 1379, 1364, 1324 (-CH₃-def. u. N-O, s-m); 1298, 1288, 1246, 1221 (C-O-C, s-m); 1199, 1183, 1146, 1124, 1095, 1073, 1048, 1033 (C-O-C, ss-s); 1010, 980, 943, 927, 911, 889, 863, 843, 808 (-C-C u. =C-H-def., m); 750, 734, 697 (=C-H- u. CH₂-def., s-m); 667, 653, 616 (-C-C, m-w); 582, 541.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.8$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.5$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006273$; $\tau_R = 118.5$ ps.

3.3.3 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2-oxo-3-[(*RS*)-3-oxo-1-phenyl-butyl]-2*H*-chromen-4-yl]ester (WFR-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 289.8 mg (~0.94 mmol, 1.25 eq.) (*RS*)-4-Hydroxy-3-(3-oxo-1-phenyl-butyl)cumarin, 150.2 mg (0.75 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, ~0.11 eq.) DMAP in jeweils 20 ml trockenem DCM und DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (185.7 mg, 0.90 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (2:1)) = 0.47) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das hellrote Filtrat auf ca. 4.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (2:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt – nach Entfernung des Laufmittels – nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei sich 274.7 mg (0.56 mmol, 75%) **WFR-TSL**, der TEMPO-Ester von Warfarin, als rosa, kristalliner Feststoff manifestierte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{NO}_6$

Berechnet: $m/z = 490.6$

Gefunden: m/z (%) = 489.5 (100, M^+), 979.1 (19.5, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{NO}_6$

Berechnet: C: 71.00%, H: 6.57%, N: 2.86%, O: 19.57%.

Gefunden: C: 71.00%, H: 6.26%, N: 2.94%.

Schmelzpunktbestimmung:

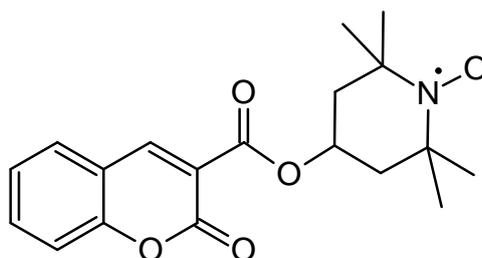
Smp.: 182.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3082, 3065, 3026 (=C-H, w); 2999, 2975, 2938, 2896 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m), 1747, 1726, 1630(C=O, s); 1609 (Ringschwingung, m); 1576, 1540, 1521 (N-O, m-w); 1493 (Ringschwingung, m); 1454, 1436 (-CH₃- u. -CH₂-def., s); 1379, 1362, 1324, 1306 (-CH₃-def. u. N-O, s-m); 1283, 1269, 1260, 1244, 1215 (C-O-C, s-m); 1193, 1174, 1162, 1144, 1089, 1072, 1030 (C-O-C, s-m); 1008, 981, 949, 929, 906, 898, 868, 846, 806 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 796, 780, 766, 756, 743, 700, 681(=C-H- u. CH₂-def., s-m); 659, 637, 626, 618, 602 (-C-C, m-w); 579, 556, 544, 529, 515, 509.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.6$ MHz; $A_{iso} = 44.4$ MHz; $g_{iso} = 2.006269$; $\tau_R = 120.4$ ps.

3.3.4 2-Oxo-2H-chromen-3-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (CCS-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 142.6 mg (0.75 mmol, 1 eq.) 2-Oxo-2H-chromen-3-carbonsäure, 180.9 mg (1.05 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (194.2 mg, ~0.94 mmol, 1.25 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (2:1)) = 0.30) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt werden. Nach

säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (2:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan/n-Pentan (1:1) umkristallisiert, wobei 230.7 mg (0.67 mmol, 89%) **CCS-TSL**, der TEMPO-Ester der Cumarin-3-carbonsäure, als rosa, kristalliner Feststoff ausfiel.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_5$

Berechnet: $m/z = 344.4$

Gefunden: m/z (%) = 343.9 (100, M^+), 688.1 (5.2, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_5$

Berechnet: C: 66.26%, H: 6.44%, N: 4.07%, O: 23.23%.

Gefunden: C: 66.00%, H: 6.40%, N: 4.17%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 159.7°C

IR-Spektroskopie (KBr):

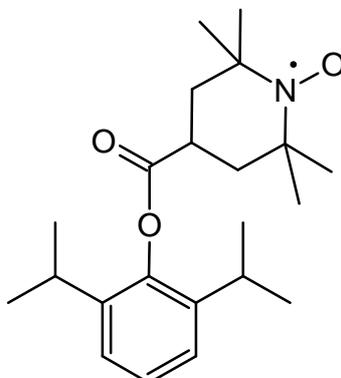
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3078, 3045 (=C-H, m-w); 2991, 2974, 2937 (-C-H, s); 2870 (-CH₃, m); 1759, 1717 (C=O, s); 1648 (C=C, w); 1610 (Ringschwingung, m); 1568, 1540, 1524, 1506 (N-O, m-w); 1489 (Ringschwingung, m); 1465, 1454 (-CH₃- u. -CH₂-def., m-s); 1377, 1365, 1353, 1333, 1316 (-CH₃-def. u. N-O, s-m); 1297, 1251, 1241, 1216 (C-O-C, s); 1193, 1180, 1163, 1130, 1090, 1045, 1029 (C-O-C, s-m); 1013, 995, 957, 924, 870, 810 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 798, 784, 757, 704 (=C-H- u. CH₂-def., s-m); 684, 632, 601 (-C-C, m-w); 585.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 97.8$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.1$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006265$; $\tau_R = 95.7$ ps.

3.4 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Narkotika

3.4.1 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure(2,6-diisopropylphenyl)ester (PPF-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 124.8 mg (0.7 mmol, 2 eq.) 2,6-Diisopropylphenol, 70 mg (0.35 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 11 mg (0.09 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orangegelbe Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (94.9 mg, ~0.46 mmol, 1.3 eq.) langsam zugetropft. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, wurde nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM) = 0.35) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das orange Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Pentan umkristallisiert, wobei 82.9 mg (0.23 mmol, 66%) **PPF-TSL**, der TEMPO-Ester von Propofol, als beiger, kristalliner Feststoff erhalten wurde.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_3$

Berechnet: $m/z = 360.5$

Gefunden: m/z (%) = 359.8 (100, M^+), 719.6 (4.4, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_3$

Berechnet: C: 73.29%, H: 9.51%, N: 3.89%, O: 13.31%.

Gefunden: C: 73.32%, H: 9.24%, N: 4.13%.

Schmelzpunktbestimmung:

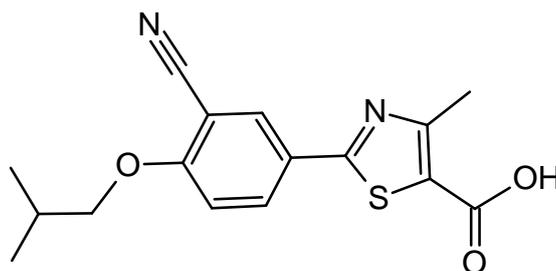
Smp.: 102.8°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3067,3029 (=C-H, w); 2998, 2969 (-C-H, m-s); 2930 (-CH₂, m); 2870 (-CH₃, m); 1740 (C=O, s); 1680, 1657, 1640, 1632 (C=C, m-w); 1606, 1590 (Ringschwingung, m); 1553, 1537 (N-O, w); 1466, 1455, 1444 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1384, 1378, 1364, 1349, 1333, 1306 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1284, 1233 (-C-O-C, s-m); 1169 (s), 1109, 1097, 1060, 1042 (-C-O-C, s-m); 1001, 978, 940, 927, 899, 888, 870, 856, 836, 808 (-C-C u. =C-H-def., m-w); 793, 765, 738, 723 (-CH₂-def., m), 673, 647 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 577, 561, 549, 520.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.5$ MHz, $A_{zz} = 98.4$ MHz; $A_{iso} = 44.5$ MHz; $g_{iso} = 2.006268$; $\tau_R = 84.4$ ps.

3.5 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Urikostatika**3.5.1 Isolierung von Febuxostat aus Adenuric[®]**

Da Febuxostat (2-(3-Cyan-4-isobutyloxyphenyl)-4-methylthiazol-5-carbonsäure) als Reinsubstanz zur nachfolgenden Synthese des entsprechenden TEMPO-Esters (s. Kap. 3.4.2) benötigt wurde, wurden 10 Adenuric[®] 120 mg Filmtabletten (Berlin Chemie AG) in einem Keramikmörser pulverisiert. Anschließend wurde die pulverisierte Mischung zur Abtrennung übriger Tablettenbestandteile (Laktose-Monohydrat, mikrokristalline Cellulose, Magnesiumstearat (Ph.Eur.), Hyprollose, Croscarmellose-Natrium, Siliciumdioxid-Hydrat, Opadry II gelb 85F42129 (Filmüberzug)) in ca. 400 ml trockenem THF aufgenommen und die Suspension

für ca. 20 min. bei RT gerührt. Nach entsprechender Sedimentation der unlöslichen Bestandteile wurde die Wirkstofflösung abdekantiert, danach nochmals filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nachdem mit wenig EtOH umkristallisiert wurde, konnten 1191 mg (3.76 mmol, 99%) eines farblosen, kristallinen Feststoffes isoliert werden.

NMR-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 300 K)):

δ [ppm] = 1.07 (d, $^3\text{J}_{\text{CH}_3,\text{CH}} = 6.8$ Hz, 6H, 2 CH_3); 2.16 (m, 1H, CH); 2,71 (s, 3H, CH_3); 3.87 (d, $^3\text{J}_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.5$ Hz, 2H, CH_2); 6.99 (d, $^3\text{J}_{\text{CH},\text{CH}} = 8.7$ Hz, 1H, ArH) 8.05 (dd, $^3\text{J}_{\text{CH},\text{CH}} = 8.7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{CH},\text{CH}} = 2.3$ Hz, 1H, ArH); 8,13 (d, $^4\text{J}_{\text{CH},\text{CH}} = 2.3$ Hz, 1H, ArH).

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

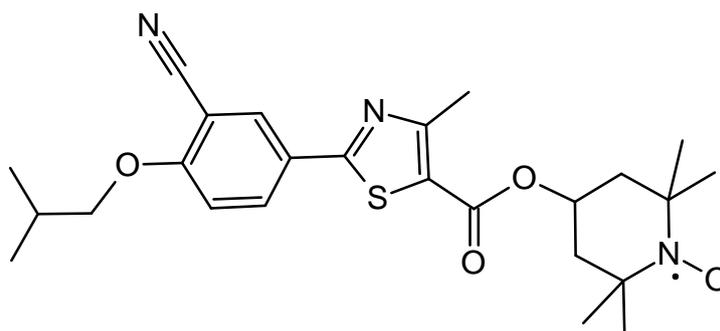
Berechnet: $m/z = 316.4$

Gefunden: m/z (%) = 316.3 (100, M^+), 633.5 (6.6, $[\text{2M}]^+$).

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 238.6°C

3.5.2 (3-Cyan-4-isobutyloxyphenyl)-4-methylthiazol-5-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (FBS-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 132.9 mg (0.42 mmol, 1 eq.) Febuxostat, 89.6 mg (0.52 mmol, 1.24 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 6.1 mg (0.05 mmol, ~0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem THF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene grüne Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem THF gelöstes DCC (107.3 mg, 0.52 mmol, 1.24 eq.) langsam zugetropft. Anschließend wurde 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT

gerührt. Nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (20:1)) = 0.54) konnte die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellgrüne Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 3.5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (20:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus Acetonitril umkristallisiert, wobei 145.9 mg (0.31 mmol, 74%) **FBS-TSL**, der TEMPO-Ester von Febuxostat, als hellgelber, kristalliner Feststoff anfiel.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

Berechnet: $m/z = 470.6$

Gefunden: m/z (%) = 469.8 (100, M^+), 940.2 (4.5, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

Berechnet: C: 63.80%, H: 6.85%, N: 8.93%, O: 13.60%, S: 6.81%.

Gefunden: C: 64.00%, H: 6.36%, N: 8.94%, S: 7.16%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 197.2°C

IR-Spektroskopie (KBr):

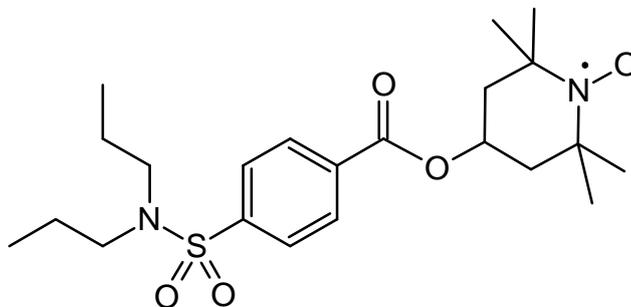
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3096, 3057 (=C-H, m-w); 2973, 2950, 2934 (-C-H, s-m); 2870 (-CH₃, m); 2260, 2226 (-C≡N, s); 1710 (C=O, s); 1666, 1652 (C=C, w); 1605 (Ringschwingung, s); 1581, 1528, 1505 (N-O, s-m); 1465, 1436, 1417 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1398, 1370, 1320 (CH₃-def. und N-O, s); 1298, 1285, 1264, 1241 (C-O-C, m-s); 1191, 1174, 1131, 1099, 1048, 1034 (C-O-C, s-m); 1015, 980, 969, 935, 911, 876, 849, 825 (=C-H-def. u. -C-C, s-m), 799, 761 (=C-H-def., s), 732, 727 (-CH₂-def., m), 686, 658, 641, 617 (-C-S u. -C-C, m-w).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMF, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 97.0$ MHz; $A_{\text{iso}} = 43.9$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006273$; $\tau_R = 92.6$ ps.

3.6 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Urikosurika

3.6.1 4-(Dipropylsulfamoyl)benzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (PBC-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 156.9 mg (0.55 mmol, 1 eq.) 4-(Dipropylsulfamoyl)benzoesäure, 142.9 mg (0.83 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 8.6 mg (0.07 mmol, ~0.13 eq.) DMAP in 40 ml trockenem Chloroform unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orangefarbene Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem Chloroform gelöstes DCC (148.6 mg, 0.72 mmol, ~1.3 eq.) langsam zugetropft. Darauf folgend wurde für 2 h bei 0°C und für weitere 24 h bei RT gerührt. Nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (3:1)) = 0.40) konnte die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (3:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Pentan/DEE (1:1) umkristallisiert, wobei 175.8 mg (0.40 mmol, 73%) **PBC-TSL**, der TEMPO-Ester von Probenecid, als hellroter, kristalliner Feststoff vorlag.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

Berechnet: $m/z = 439.6$

Gefunden: m/z (%) = 439.1 (100, M^+), 878.9 (25.9, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

Berechnet: C: 60.11%, H: 8.03%, N: 6.37%, O: 18.20%; S: 7.29%.

Gefunden: C: 60.09%, H: 8.05%, N: 6.39%; S: 7.19%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 116.3°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3094, 3059, 3041 (=C-H, m-w); 2997, 2967, 2934 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m); 1720 (C=O, s); 1680, 1633 (C=C, w); 1598 (Ringschwingung, m); 1574, 1536 (N-O, m-w); 1492 (Ringschwingung, m), 1467, 1445, 1430, 1401 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1378, 1368, 1334 (CH₃-def., -SO₂, s); 1317, 1306 (N-O, m-w); 1297, 1275, 1242, 1220 (C-O-C, m-s); 1190, 1177, 1156 (-SO₂, s), 1122, 1107, 1091, 1042 (-C-N, s-m); 1017, 997, 979, 961, 939, 906, 887, 866, 848, 841 (=C-H-def. u. -C-C, s-m), 798, 768, 746, 716, 693, 671, 665, 610 (-CH₂-def. u. -C-C, m-w); 590, 567, 559, 537, 513.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.5$ MHz, $A_{zz} = 97.5$ MHz; $A_{iso} = 44.2$ MHz; $g_{iso} = 2.006269$; $\tau_R = 130.3$ ps.

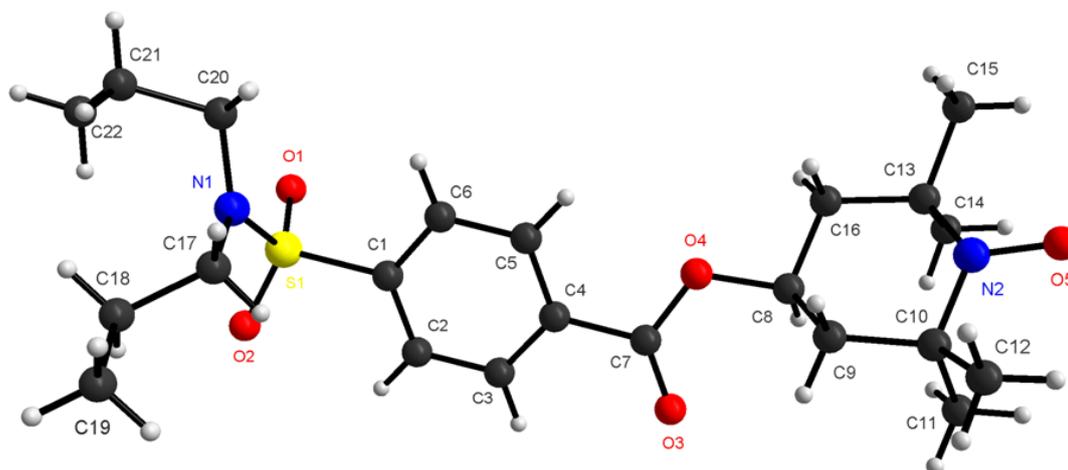
Röntgenstrukturanalyse (Mo-K α , 120 K):

Abb. 20: Röntgenstruktur von 4-(Dipropylsulfamoyl)benzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (PBC-TSL)

Tab. 5: Daten zur Röntgenstrukturanalyse von **PBC-TSL**

Summenformel	$C_{22}H_{35}N_2O_5S$	Kristallsystem	monoklin
Molmasse [g/mol]	439.60	Raumgruppe	P1a1 (2)
Wellenlänge [Å]	0.71073	Zellvolumen [Å ³]	1185.57(9)
Temperatur [K]	120	Dichte [g/cm ³]	1.23136
Moleküle/Elementarzelle	2		
Zellparameter [Å, °]			
a	14.6842(5)	α	90
b	5.9147(3)	β	115.318(2)
c	15.1008(7)	γ	90

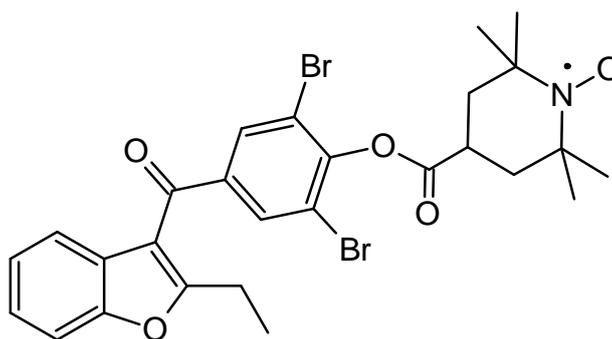
Tab. 6: Ausgewählte Bindungslängen [Å] und –winkel [°] von **PBC-TSL**

N1-C17	1.472(2)	C8-C16	1.512(3)
N1-C20	1.465(3)	C5-C6	1.395(3)
N1-S1	1.6037(19)	C4-C5	1.394(3)
N2-C10	1.498(3)	C4-C7	1.493(3)
N2-C13	1.493(2)	C3-C4	1.387(3)
O1-S1	1.430(2)	C2-C3	1.391(3)
O2-S1	1.440(2)	C1-C2	1.386(3)
O3-C7	1.208(2)	C1-C6	1.390(3)
O4-C7	1.341(2)	C1-S1	1.782(2)
O4-C8	1.466(2)	C1-S1-N1	107.28(9)
O5-N2	1.285(2)	C1-S1-O2	105.29(12)
C21-C22	1.498(5)	N1-S1-O2	108.09(11)
C20-C21	1.519(4)	C1-S1-O1	107.68(11)
C18-C19	1.530(4)	N1-S1-O1	107.76(13)
C17-C18	1.515(3)	O2-S1-O1	120.12(16)
C13-C14	1.537(3)	C17-N1-C20	118.6(2)
C13-C15	1.523(3)	C17-N1-S1	116.84(14)
C13-C16	1.531(3)	C20-N1-S1	122.50(17)
C10-C11	1.541(3)	O5-N2-C10	116.64(16)
C10-C12	1.533(3)	O5-N2-C13	116.23(16)
C9-C10	1.531(3)	C10-N2-C13	123.00(15)
C8-C9	1.515(2)	C7-O4-C8	116.95(14)

Fortsetzung von Tab. 6

C20-C21-C22	113.7(3)	C8-C9-C10	112.53(15)
N1-C20-C21	112.0(2)	O4-C8-C9	110.35(15)
C17-C18-C19	109.9(2)	O4-C8-C16	103.86(14)
N1-C17-C18	114.79(17)	C9-C8-C16	109.91(15)
C13-C16-C8	114.01(15)	C4-C7-O4	112.04(15)
N2-C13-C14	109.24(16)	C4-C7-O3	123.50(18)
N2-C13-C15	107.56(16)	O4-C7-O3	124.44(18)
C14-C13-C15	109.44(18)	C5-C6-C1	118.66(18)
N2-C13-C16	108.90(15)	C4-C5-C6	120.16(18)
C14-C13-C16	112.48(17)	C3-C4-C5	120.44(18)
C15-C13-C16	109.11(16)	C3-C4-C7	118.01(17)
C9-C10-N2	109.26(14)	C5-C4-C7	121.54(17)
C9-C10-C11	112.65(16)	C2-C3-C4	119.66(18)
N2-C10-C11	110.26(16)	C1-C2-C3	119.59(18)
C9-C10-C12	108.48(16)	C2-C1-C6	121.45(19)
N2-C10-C12	107.28(16)	C2-C1-S1	118.49(16)
C11-C10-C12	108.74(15)	C6-C1-S1	120.02(16)

3.6.2 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[2,6-dibrom-4-(2-ethylbenzofuran-3-carbonyl)phenyl]ester (BBR-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 267.2 mg (0.63 mmol, 1.4 eq.) (2-Ethyl-3-benzofuranyl)-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)keton, 90.2 mg (0.45 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 6.1 mg (0.05 mmol, ~0.11 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (111.4 mg, 0.54 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem

2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, wurde nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (100:1)) = 0.62) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (100:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan/EtOH (2:1) umkristallisiert, wobei 193.8 mg (0.32 mmol, 71%) **BBR-TSL**, der TEMPO-Ester von Benzbromaron, als oranger, kristalliner Feststoff ausfiel.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{NO}_5$

Berechnet: $m/z = 606.3$

Gefunden: m/z (%) = 302.0 (28.3, M^{2+} mit $^{79}\text{Br}+^{79}\text{Br}$), 303.1 (16.3, M^{2+} mit $^{79}\text{Br}+^{81}\text{Br}$), 604.2 (36.7, M^{+} mit $^{79}\text{Br}+^{79}\text{Br}$), 606.1 (100, M^{+} mit $^{79}\text{Br}+^{81}\text{Br}$), 608.4 (99.8, M^{+} mit $^{81}\text{Br}+^{81}\text{Br}$), 1214.6 (5.8, $[\text{2M}]^{+}$ mit $^{79}\text{Br}+^{81}\text{Br}$ u. $^{81}\text{Br}+^{81}\text{Br}$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{NO}_5$

Berechnet: C: 53.48%, H: 4.65%, Br: 26.36%; N: 2.31%, O: 13.19%.

Gefunden: C: 53.41%, H: 4.60%, N: 2.30%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 125.6°C

IR-Spektroskopie (KBr):

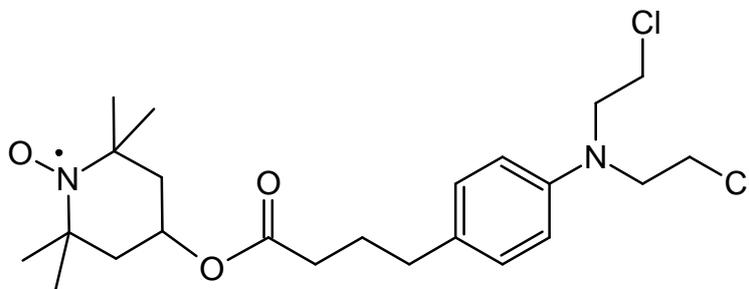
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3063, 3025 (=C-H, m-w); 2995, 2976, 2945, 2937, 2885 (-C-H, m-w); 2850 (-CH₂, w); 1779 (s), 1736, 1650 (s) (C=O, s-m); 1613 (C=C, w); 1601 (Ringschwingung, m); 1583, 1559, 1507 (N-O, s-m); 1493 (Ringschwingung, m); 1464, 1454, 1431 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1381, 1363, 1356, 1308 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1290, 1285, 1245, 1222 (-C-O-C, s-m); 1180, 1157, 1134, 1113, 1096, 1060, 1036 (C-O-C, s-m); 1019, 999, 986, 956, 926, 921, 912, 891, 850, 840, 806 (-C-C u. =C-H-def., m-w); 791, 779, 746, 715 (-CH₂-def., s-m), 697, 682, 649, 632, 619, 557, 541, 534 (-C-Br, m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.5$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.4$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006267$; $\tau_R = 153.5$ ps.

3.7 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Zytostatika

3.7.1 4-[Bis(2-chlorethyl)amino]benzenbutansäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (CBL-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 176.5 mg (0.58 mmol, 1 eq.) 4-[Bis(2-chlorethyl)amino]benzenbutansäure, 149.8 mg (0.87 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 9.8 mg (0.08 mmol, ~0.14 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orange Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 3 ml trockenem DCM gelöstes DCC (154.7 mg, 0.75 mmol, ~1.3 eq.) langsam zugetropft. Danach wurde 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt. Nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (10:1)) = 0.86) wurde die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das orangegelbe Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (10:1)) des Rohproduktes konnten nach Entfernung des Laufmittels 215.4 mg (0.47 mmol, 81%) **CBL-TSL**, der TEMPO-Ester von Chlorambucil, als oranger, kristalliner Feststoff isoliert werden.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$

Berechnet: $m/z = 458.4$

Gefunden: m/z (%) = 457.5 (100, M^+ mit $^{35}\text{Cl}+^{35}\text{Cl}$), 459.8 (65.2, M^+ mit $^{35}\text{Cl}+^{37}\text{Cl}$), 461.7 (22.3, M^+ mit $^{37}\text{Cl}+^{37}\text{Cl}$), 228.9 (0.7, M^{2+} mit $^{35}\text{Cl}+^{35}\text{Cl}$), 229.4 (0.7, M^{2+} mit $^{35}\text{Cl}+^{37}\text{Cl}$), 230.4 (0.9, M^{2+} mit $^{37}\text{Cl}+^{37}\text{Cl}$), 916.3 (0.4, $[\text{2M}]^+$ mit $^{35}\text{Cl}+^{37}\text{Cl}$).

Elementaranalyse: $C_{23}H_{35}Cl_2N_2O_3$

Berechnet: C: 60.26%, H: 7.70%, Cl: 15.47; N: 6.11%, O: 10.47%.

Gefunden: C: 60.18%, H: 7.65%, N: 5.95%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 64.0°C

IR-Spektroskopie (KBr):

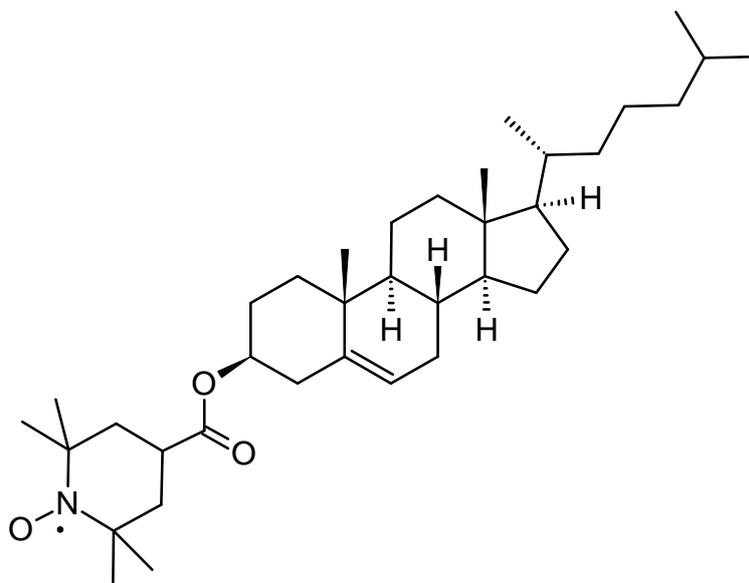
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3035 (=C-H, w); 2994, 2972, 2937, 2861 (-C-H, m); 1732 (C=O, s); 1682, 1653, 1614 (C=C, m-w); 1567, 1559, 1519 (N-O, s-m); 1458, 1441 (CH₃- u. -CH₂-def., m); 1389, 1363, 1350, 1312 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1276, 1242, 1217 (C-O-C, s-m); 1179 (s), 1145 (s), 1088, 1062, 1044 (C-O-C u. -C-N, s-m); 1009, 982, 964, 940, 919, 896, 889, 874, 858, 827, 803 (-C-C u. =C-H-def., m-s); 748 (s), 723 (s), 682, 662, 640 (-C-Cl u. -C-C, s-m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.2$ MHz; $A_{iso} = 44.3$ MHz; $g_{iso} = 2.006273$; $\tau_R = 94.4$ ps.

3.8 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Steroidhormone

3.8.1 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]ester (CSO-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 405.9 mg (1.05 mmol, 1.4 eq.) (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol, 150.2 mg (0.75 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 10.9 mg (0.09 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 3 ml trockenem DCM gelöstes DCC (185.7 mg, 0.90 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (10:1)) = 0.88) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (10:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Heptan/PE (1:1) umkristallisiert, wobei sich 307.2 mg (0.54 mmol, 72%) **CSO-TSL**, der TEMPO-Ester von Cholesterol, ein rosa, kristalliner Feststoff, als Ausbeute manifestierte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $C_{37}H_{62}NO_3$ Berechnet: $m/z = 568.9$ Gefunden: m/z (%) = 568.6 (100, M^+), 1136.4 (17.4, $[2M]^+$).**Elementaranalyse:** $C_{37}H_{62}NO_3$

Berechnet: C: 78.12%, H: 10.98%, N: 2.46%, O: 8.44%.

Gefunden: C: 78.13%, H: 10.86%, N: 2.74%.

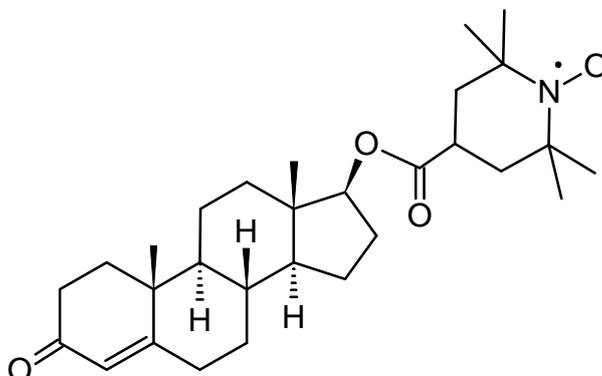
Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 158.9°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3028 (-C-H, m-w); 2991, 2934, 2911 (-C-H, m-s); 2870 (-CH₃, m); 2850 (-CH₂, m); 2824 (-C-H, s-m); 1730 (C=O, s); 1667, 1627 (C=C, m); 1576, 1538 (N-O, w); 1466, 1444 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1378, 1365, 1334, 1307 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1291, 1255, 1243 (C-O-C, m-s); 1192 (s), 1163 (s), 1140, 1106, 1086, 1063, 1029 (C-O-C, s-m); 1009, 997, 977, 956, 929, 893, 854, 841, 826, 804 (-C-C u. =C-H-def., m-w); 762, 733 (-CH₂-def., m-w); 696, 655, 641, 628, 611 (-C-C, m-w); 594, 558.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., TOL, 25°C): $A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 95.6$ MHz; $A_{iso} = 43.5$ MHz; $g_{iso} = 2.006268$; $\tau_R = 104.9$ ps.

3.8.2 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-10,13-dimethyl-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]ester (TSO-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 199.3 mg (0.69 mmol, 1.5 eq.) (8R,9S,10R,13S,14S,17S)-10,13-dimethyl-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-ol, 92.2 mg (0.46 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 7.3 mg (0.06 mmol, ~0.13 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (123.8 mg, 0.60 mmol, 1.3 eq.) langsam zugetropft. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (5:1)) = 0.53) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (5:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Heptan/PE (20:1) umkristallisiert. Somit konnten 159.8 mg (0.34 mmol, 74%) **TSO-TSL**, der TEMPO-Ester von Testosteron, als beiger, kristalliner Feststoff gewonnen werden.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{NO}_4$

Berechnet: $m/z = 470.7$

Gefunden: m/z (%) = 470.7 (100, M^+), 941.6 (2.7, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{NO}_4$

Berechnet: C: 74.00%, H: 9.42%, N: 2.98%, O: 13.60%.

Gefunden: C: 73.99%, H: 8.99%, N: 3.05%.

Schmelzpunktbestimmung:

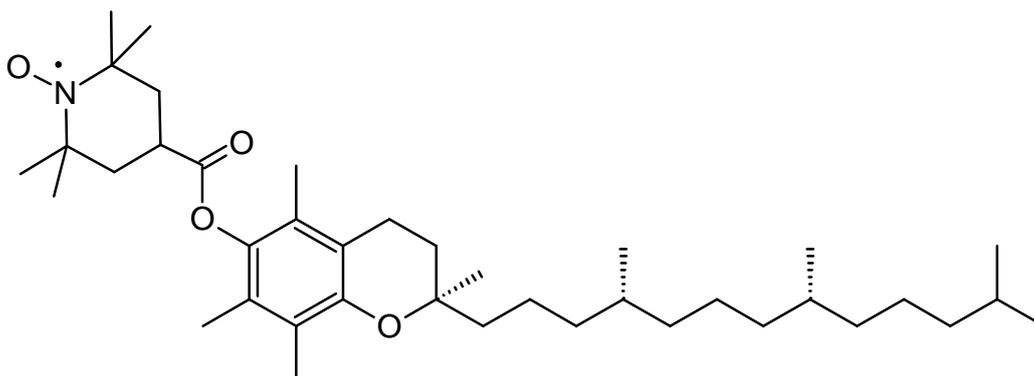
Smp.: 153.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3054 (=C-H, w), 2968, 2938, 2906 (-C-H, m), 2870 (-CH₃, m); 2850 (-CH₂, m); 2829 (-C-H, m); 1732, 1673 (C=O, s); 1622 (C=C, m), 1557 (N-O, w), 1470, 1457, 1436, 1419 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1382, 1377, 1361, 1330, 1308 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1293, 1271, 1259, 1241, 1227 (C-O-C, s-m); 1194 (s), 1166 (ss), 1127, 1113, 1084, 1070, 1048, 1040 (C-O-C, ss-m);, 1013, 998, 975, 961, 945, 930, 918, 896, 867, 843, 831, 808 (-C-C u. =C-H-def, m-w); 779, 749, 728 (-CH₂-def., m-w); 710, 685, 654, 634, 610 (-C-C, m-w), 597, 554, 517.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.7$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.4$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006273$; $\tau_R = 119.8$ ps.

3.9 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Vitamine**3.9.1 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure [(2R)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydro-2H-chromen-6-yl]ester (DVE-TSL)**

Unter Inertgasbedingungen wurden 150.7 mg (0.35 mmol, 1.4 eq.) (2R)-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydro-2H-chromen-6-ol, .50.3 mg (0.25 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 3.7 mg (0.03 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 20 ml trockenem Chloroform unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orangegelbe Lösung wurde

auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 1.5 ml trockenem Chloroform gelöstes DCC (61.9 mg, 0.30 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, musste nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/ACE (50:1)) = 0.67) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das orange Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 3.5 ml eingengt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/ACE (50:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Hexan/Acetonitril (1:2) umkristallisiert, wobei 110.3 mg (0.18 mmol, 72%) **DVE-TSL**, der TEMPO-Ester von D- α -Tocopherol (Vitamin E), als rotoranger, kristalliner Feststoff isoliert wurde.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{NO}_4$

Berechnet: $m/z = 612.9$

Gefunden: m/z (%) = 612.2 (100, M^+), 1223.6 (4.9, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{NO}_4$

Berechnet: C: 76.42%, H: 10.85%, N: 2.29%, O: 10.44%.

Gefunden: C: 76.33%, H: 10.95%, N: 2.43%.

Schmelzpunktbestimmung:

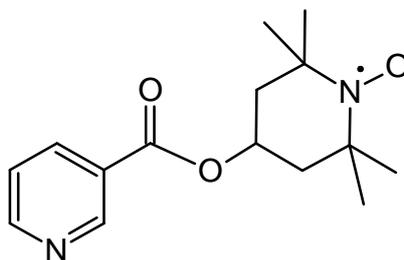
Smp.: 62.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2996, 2953 (-C-H, m-w); 2926 (-CH₂, m); 2870 (-CH₃, m); 1738, 1711 (C=O, s); 1683, 1674, 1653, 1636, 1614 (C=C, m); 1576, 1559, 1538, 1528, 1506 (N-O, m-w); 1462, 1413 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1378, 1366, 1350, 1331, 1304 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1284, 1243, 1226 (C-O-C, m-s); 1166, 1107, 1073, 1062 (C-O-C, s-m); 1017, 1001, 978, 947, 937, 919, 868, 858, 812 (-C-C, m-w); 777, 732, 715 (-CH₂-def., m-w); 681, 660, 630, 604 (-C-C u. =C-H-def., m-w).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., TOL, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.5$ MHz, $A_{zz} = 95.3$ MHz; $A_{\text{iso}} = 43.4$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006267$; $\tau_R = 105.6$ ps.

3.9.2 Pyridin-3-carbonsäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (VB3-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 80 mg (0.65 mmol, 1 eq.) Pyridin-3-carbonsäure, 156.7 mg (0.91 mmol, 1.4 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 9.8 mg (0.08 mmol, ~0.12 eq.) DMAP in jeweils 15 ml trockenem DCM und DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orangerote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 3 ml trockenem DCM gelöstes DCC (160.9 mg, 0.78 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, folgte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (5:1)) = 0.47) die Einengung der Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das rote Filtrat auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EE (5:1)) des Rohproduktes wurde nach Entfernung des Laufmittels 152.5 mg (0.55 mmol, 85%) **VB3-TSL**, der TEMPO-Ester von Niacin (Vitamin B₃), als oranger, kristalliner Feststoff erhalten.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$

Berechnet: $m/z = 277.3$

Gefunden: m/z (%) = 277.3 (100, M^+).

Elementaranalyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$

Berechnet: C: 64.96%, H: 7.63%, N: 10.10%, O: 17.31%.

Gefunden: C: 65.00%, H: 8.03%, N: 10.00%.

Schmelzpunktbestimmung:

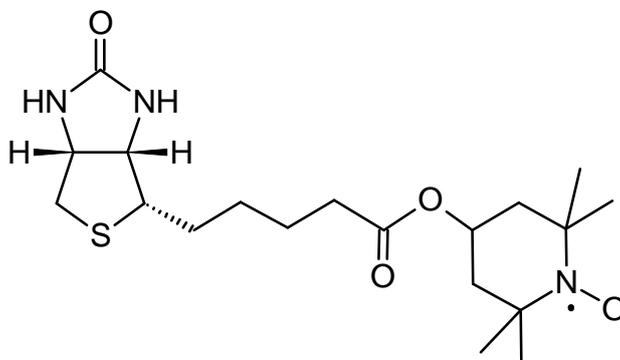
Smp.: 122.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3087, 3057, 3036 (=C-H, w); 2999, 2979, 2939 (-C-H, m); 2870 (-CH₃, m); 1713 (C=O, s); 1671, 1653, 1635, 1625, 1614 (-C=N u. C=C, m); 1591 (Ringschwingung, s), 1575, 1558, 1540, 1521, 1506 (N-O, m-w), 1487 (Ringschwingung, m); 1470, 1464, 1439, 1421 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1386, 1373, 1363, 1348, 1328, 1317 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1287, 1255, 1241, 1218 (C-O-C, s-m); 1193, 1181, 1128, 1108, 1085, 1025 (C-O-C, s); 1000, 975, 959, 938, 912, 878, 863, 830, 809 (-C-C, s-m); 744, 704 (=C-H-def., s); 680, 668, 621 (-C-C, m).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 97.7$ MHz; $A_{iso} = 44.2$ MHz; $g_{iso} = 2.006270$; $\tau_R = 66.1$ ps.

3.9.3 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-Oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentansäure(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl-4-yl)ester (VB7-TSL)

Unter Inertgasbedingungen wurden 48.9 mg (0.20 mmol, 1 eq.) 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-Oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentansäure, 48.3 mg (0.28 mmol, 1.4 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 3.8 mg (~0.03 mmol, 0.15 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene orangefarbene Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2 ml trockenem DMF gelöstes DCC (53.6 mg, ~0.26 mmol, 1.3 eq.) langsam zugegeben. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, musste nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EtOH (10:1)) = 0.48) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedunstet werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 5 - 10 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das

rote Filtrat auf ca. 2.5 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); DCM/EtOH (10:1)) des Rohproduktes konnte nach Entfernung des Laufmittels 59.8 mg (0.15 mmol, 75%) **VB7-TSL**, der TEMPO-Ester von D-(+)-Biotin (Vitamin B₇), als oranger, kristalliner Feststoff isoliert werden.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

Berechnet: $m/z = 398.5$

Gefunden: m/z (%) = 398.5 (100, M^+), 797.5 (2.1, $[2\text{M}]^+$).

Elementaranalyse: $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

Berechnet: C: 57.26%, H: 8.09%, N: 10.54%, O: 16.06%, S: 8.05%.

Gefunden: C: 57.18%, H: 8.00%, N: 10.55%, S: 8.07%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 106.7°C

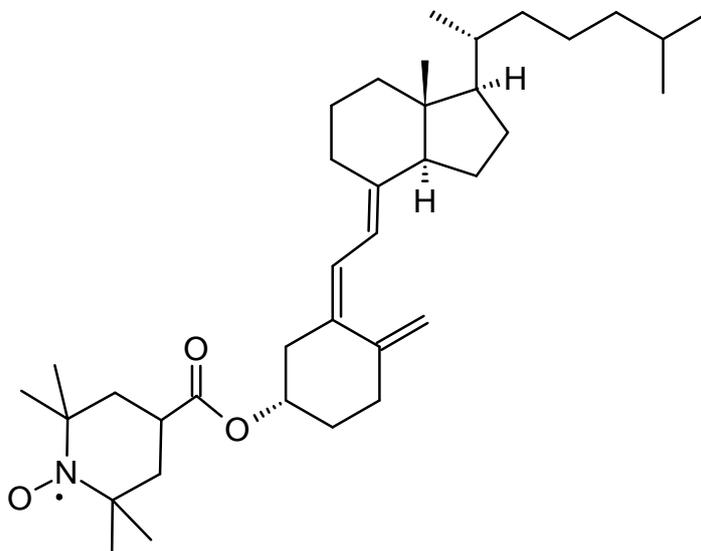
IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3312, 3246, 3124 (-N-H, m); 2972 (-C-H, s); 2930 (-CH₂, s); 2856 (-C-H, s); 1733, 1704, 1653 (C=O, s); 1528 (N-O, m), 1464, 1427 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1385, 1377, 1364, 1348, 1327, 1309 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1259, 1231 (C-O-C, m); 1192, 1166, 1119, 1099, 1077, 1054 (C-O-C u. -C-N, s-m); 1012, 985, 967, 913, 892, 861, 838, 811, 787, 762, 732 (CH₂-def., m), 683, 659, 611 (C-S u. C-C, m-w), 597.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 97.9$ MHz; $A_{\text{iso}} = 44.2$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006269$; $\tau_R = 98.9$ ps.

3.9.4 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure [(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanyl]ester (VD3-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 80.8 mg (0.21 mmol, 1.4 eq.) (1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(1R)-1,5-dimethylhexyl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanol, 30.2 mg (0.15 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 2.5 mg (~0.02 mmol, 0.13 eq.) DMAP in 20 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 1.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (37.3 mg, 0.18 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, wurde nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (DCM/EE (50:1)) = 0.64) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂ (0.063-0.2 mm); DCM/EE (50:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Pentan umkristallisiert, wobei 62.4 mg (0.11 mmol, 73%) **VD3-TSL**, der TEMPO-Ester von Cholecalciferol (Vitamin D₃), als hellroter, kristalliner Feststoff ausfiel.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): C₃₇H₆₀NO₃

Berechnet: m/z = 566.9

Gefunden: m/z (%) = 566.6 (97.2, M⁺ mit ¹⁴N), 567.6 (100, M⁺ mit ¹⁵N), 1132.5 (9.9, [2M]⁺ mit ¹⁴N), 1133.8 (8.0, [2M]⁺ mit ¹⁵N).

Elementaranalyse: $C_{37}H_{60}NO_3$

Berechnet: C: 78.39%, H: 10.67%, N: 2.47%, O: 8.47%.

Gefunden: C: 78.22%, H: 10.71%, N: 2.57%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 99.1°C

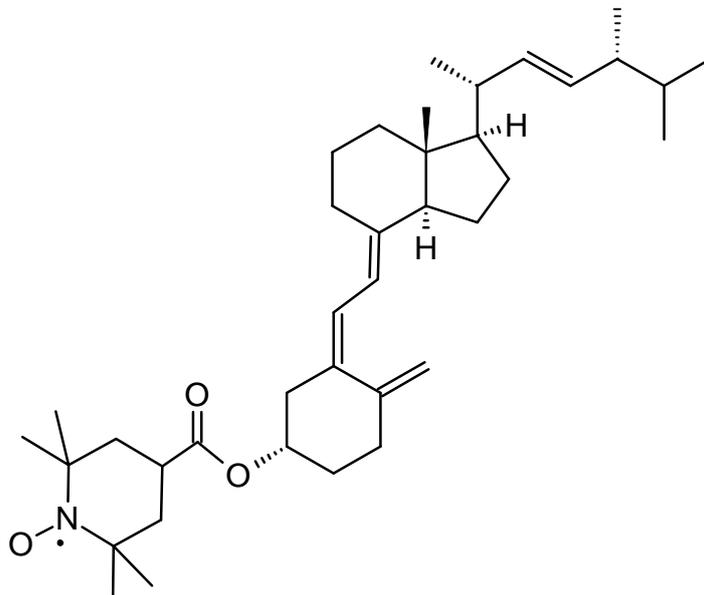
IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3079 (=C-H, w); 2946 (-C-H, s); 2930 (-CH₂, w); 2870 (-CH₃, s); 1723 (C=O, s); 1684, 1675, 1646, 1635, 1626, 1601 (C=C, m), 1576, 1558, 1540, 1521, 1506 (N-O, m-w); 1466, 1452, 1437 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1392, 1377, 1364, 1349, 1302 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1288, 1258, 1243, 1211 (C-O-C, s-m); 1199, 1168, 1116, 1089, 1074, 1047, 1039 (C-O-C, s-m); 1014, 1007, 989, 978, 954, 946, 939, 912, 894, 884, 865, 849, 839, 803, 769, 738, 718 (-CH₂-def., m), 678, 652, 635, 616 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 577.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., TOL, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.4$ MHz, $A_{zz} = 95.5$ MHz; $A_{\text{iso}} = 43.4$ MHz; $g_{\text{iso}} = 2.006269$; $\tau_R = 92.9$ ps.

3.9.5 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-carbonsäure[(1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-7a-methyl-1-[(E,1R,4R)-1,4,5-trimethylhex-2-enyl]-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanyl]ester (VD2-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 138.8 mg (0.35 mmol, 1.4 eq.) (1S,3Z)-3-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-7a-methyl-1-[(E,1R,4R)-1,4,5-trimethylhex-2-enyl]-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-yliden]ethyliden]-4-methyliden-cyclohexanol, 50.1 mg (0.25 mmol, 1 eq.) 4-Carboxy-TEMPO und 3.7 mg (0.03 mmol, 0.12 eq.) DMAP in 30 ml trockenem DCM unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2 ml trockenem DCM gelöstes DCC (62.1 mg, ~0.30 mmol, 1.2 eq.) langsam zugetropft. Nachdem weitere 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt worden war, wurde nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (6:1)) = 0.38) die Reaktionslösung durch Filtration vom ausgefallenen DCU befreit und das hellrote Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (6:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt bis zur Trockene eingengt und nochmals aus n-Pentan umkristallisiert, wobei sich 109.9 mg (0.19 mmol, 76%) **VD2-TSL**, der TEMPO-Ester von Ergocalciferol (Vitamin D₂), als hellroter, kristalliner Feststoff manifestierte.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{NO}_3$

Berechnet: $m/z = 578.9$

Gefunden: m/z (%) = 578.4 (100, M^+), 1156.2 (11.4, $[\text{2M}]^+$).

Elementaranalyse: C₃₈H₆₀NO₃

Berechnet: C: 78.84%, H: 10.45%, N: 2.42%, O: 8.29%.

Gefunden: C: 78.80%, H: 10.48%, N: 2.54%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 103.3°C

IR-Spektroskopie (KBr):

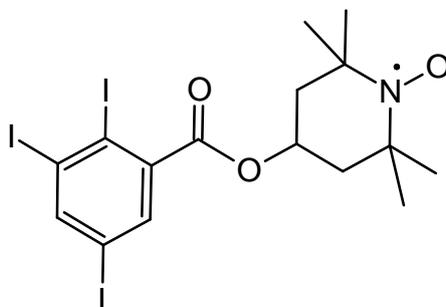
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3085 (=C-H, w); 2957 (-C-H, s); 2870 (-CH₃, s); 1722 (C=O, s); 1685, 1646, 1628, 1605 (C=C, m-w); 1576, 1559, 1540, 1521, 1506 (N-O, m-w); 1456, 1410 (-CH₃- u. -CH₂-def., s-m); 1377, 1365, 1347, 1321, 1301 (CH₃-def. und N-O, s-m); 1287, 1259, 1243, 1225, 1212 (C-O-C, s); 1195, 1169, 1117, 1109, 1090, 1072, 1047, 1038 (C-O-C, m-s); 1015, 1007, 989, 978, 971, 948, 938, 909, 895, 885, 875, 865, 850, 839, 832, 793, 769, 740, 717 (-CH₂-def., m), 678, 652, 635, 615 (-C-C u. =C-H-def., s-m); 578, 558, 532, 514.

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., TOL, 25°C):

A_{xx} = A_{yy} = 17.4 MHz, A_{zz} = 95.4 MHz; A_{iso} = 43.4 MHz; g_{iso} = 2.006265; τ_R = 93.4 ps.

3.10 Synthese und Charakterisierung TEMPO-modifizierter Antiauxine

3.10.1 2,3,5-Triiodbenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (TIB-TSL)



Unter Inertgasbedingungen wurden 199.9 mg (0.40 mmol, 1 eq.) 2,3,5-Triiodbenzoesäure, 103.3 mg (0.60 mmol, 1.5 eq.) 4-Hydroxy-TEMPO und 11.2 mg (~0.09 mmol, 0.12 eq.)

DMAP in jeweils 15 ml trockenem DCM und DMF unter stetigem Rühren bei RT gelöst. Die entstandene rote Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und ebenfalls in 2.5 ml trockenem DCM gelöstes DCC (107.3 mg, 0.52 mmol, 1.3 eq.) langsam zugetropft. Nachdem 2 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT gerührt wurde, konnte nach entsprechender Reaktionskontrolle (DC: R_f (n-Hex/EE (6:1)) = 0.36) die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde in ca. 10 - 15 ml DCM aufgenommen, der dabei ausgefallene DCU abfiltriert und das hellrote Filtrat auf ca. 4 ml eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂ (0.063-0.2 mm); n-Hex/EE (6:1)) des Rohproduktes wurde das Produkt – nach Entfernung des Laufmittels – nochmals aus n-Hexan umkristallisiert, wobei 202.7 mg (0.31 mmol, 78%) **TIB-TSL**, der TEMPO-Ester von 2,3,5-Triiodbenzoesäure, als roter, kristalliner Feststoff übrig blieb.

Massenspektrometrie (FD, 8 kV): C₁₆H₁₉I₃NO₃

Berechnet: m/z = 654.0

Gefunden: m/z (%) = 654.0 (100, M⁺).

Elementaranalyse: C₁₆H₁₉I₃NO₃

Berechnet: C: 29.38%, H: 2.93%, I: 58.21; N: 2.14%, O: 7.34%.

Gefunden: C: 29.51%, H: 2.49%, N: 2.19%.

Schmelzpunktbestimmung:

Smp.: 155.5°C

IR-Spektroskopie (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3099, 3076, 3001 (=C-H, m-w); 2987, 2981, 2966, 2956, 2935, 2925 (-CH₂, w), 2902, 2864 (-C-H, m-w); 1722 (C=O, s); 1680, 1652 (C=C, w); 1554, 1540, 1518 (N-O, m); 1466, 1458, 1450, 1438 (-CH₃- u. -CH₂-def., m); 1392, 1377, 1367, 1361, 1352, 1311 (-CH₃-def. und N-O, s-m); 1292, 1260, 1231 (C-O-C, m-s); 1192, 1178, 1124, 1105, 1086, 1026 (C-O-C, s-m); 999, 980, 963, 941, 913, 898, 878, 867, 843 (=C-H-def. u. -C-C, s-m); 799, 777, 735 (-CH₂-def., m), 710, 686, 673, 600, 561, 553, 511 (-C-I, m-w).

ESR-Spektroskopie (X-Band, Mn-Std., DMSO, 25°C):

$A_{xx} = A_{yy} = 17.3$ MHz, $A_{zz} = 98.2$ MHz; $A_{iso} = 44.3$ MHz; $g_{iso} = 2.006269$; $\tau_R = 123.2$ ps.

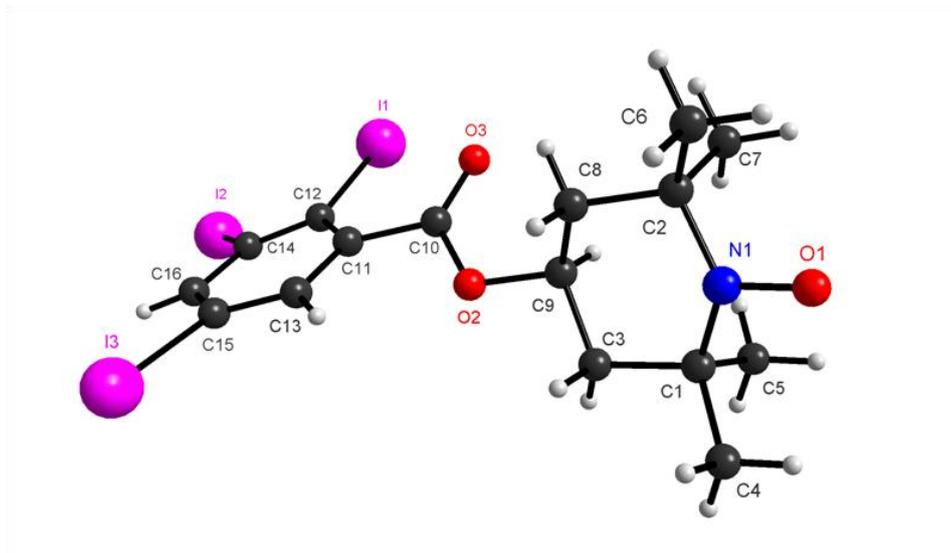
Röntgenstrukturanalyse (Mo-K α , 120 K):

Abb. 21: Röntgenstruktur von 2,3,5-Triiodbenzoesäure(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)ester (TIB-TSL)

Tab. 7: Daten zur Röntgenstrukturanalyse von **TIB-TSL**

Summenformel	$C_{16}H_{19}I_3NO_3$	Kristallsystem	Triklin
Molmasse [g/mol]	654.04	Raumgruppe	$P\bar{1}$ (2)
Wellenlänge [Å]	0.71073	Zellvolumen [Å ³]	960.38(7)
Temperatur [K]	120	Dichte [g/cm ³]	2.26159
Moleküle/Elementarzelle	2		
Zellparameter [Å, °]			
a	8.0729(3)	α	70.817(2)
b	9.6294(3)	β	82.708(2)
c	13.2092(7)	γ	84.504(2)

Tab. 8: Ausgewählte Bindungslängen [Å] und –winkel [°] von **TIB-TSL**

I1-C2	2.097(2)	N1-O3	1.290(3)
I2-C3	2.094(2)	N1-C10	1.492(3)
I3-C5	2.112(3)	N1-C13	1.488(4)

Fortsetzung von Tab. 8

O1-C7	1.217(3)	C15-C13-C16	112.4(2)
O2-C7	1.342(3)	C9-C10-N1	109.49(19)
O2-C8	1.458(3)	C9-C10-C11	108.4(2)
C13-C14	1.531(4)	N1-C10-C11	108.5(2)
C13-C15	1.534(4)	C9-C10-C12	111.4(2)
C13-C16	1.517(4)	N1-C10-C12	110.4(2)
C10-C11	1.519(4)	C11-C10-C12	108.5(2)
C10-C12	1.513(4)	C8-C9-C10	113.4(2)
C9-C10	1.542(3)	O2-C8-C9	105.87(19)
C8-C9	1.522(4)	O2-C8-C16	111.0(2)
C8-C16	1.510(4)	C9-C8-C16	108.7(2)
C5-C6	1.387(3)	C1-C7-O2	110.7(2)
C4-C5	1.384(4)	C1-C7-O1	125.9(2)
C3-C4	1.397(3)	O2-C7-O1	123.4(2)
C2-C3	1.400(3)	C1-C6-C5	118.1(2)
C1-C2	1.415(3)	I3-C5-C4	118.11(18)
C1-C6	1.396(3)	I3-C5-C6	119.89(19)
C1-C7	1.501(3)	C4-C5-C6	122.0(2)
O3-N1-C10	115.5(2)	C3-C4-C5	119.5(2)
O3-N1-C13	116.9(2)	C2-C3-I2	123.79(18)
C10-N1-C13	123.00(19)	C2-C3-C4	120.1(2)
C7-O2-C8	116.4(2)	I2-C3-C4	115.90(17)
C13-C16-C8	111.8(2)	C1-C2-I1	122.31(17)
N1-C13-C14	107.2(2)	C1-C2-C3	118.6(2)
N1-C13-C15	110.6(3)	I1-C2-C3	119.08(18)
C14-C13-C15	108.6(2)	C2-C1-C6	121.1(2)
N1-C13-C16	108.9(2)	C2-C1-C7	122.3(2)
C14-C13-C16	108.9(3)	C6-C1-C7	116.5(2)

4. Auswertung und Diskussion der Messergebnisse

4.1 Allgemeines

4.1.1 Probenpräparationen

a) Vorbemerkungen

Alle verwendeten 1.5 ml Eppendorfer Safe Lock Gefäße[®] (kurz: Eppi's) wurden vor ihrem Gebrauch nochmals autoklaviert. Alle Proben konnten mit einem Eppendorf Research[®] Pipetten-Set und zugehörigen Standard-Pipettenspitzen des gleichen Herstellers (Eppendorf AG) zusammenpipettiert werden. Zudem wurde nach jedem Pipettierungsschritt in den Unterabschnitten c) bis f) des gleichen Kapitels das vorliegende Eppi wieder verschlossen und die sich darin befindliche Probenlösung durch entsprechendes Vortexen mittels des Vortexers IKA[®] Vortex Genius 3 homogenisiert. Weiterhin beinhalteten sowohl alle präparierten Proben, der Unterabschnitte d) bis f), einen Anteil organischen Lösungsmittels (LM) von 2-Vol% und wurden unter Berücksichtigung wichtiger physiologischer Parameter, wie unter b) näher erläutert, mittels eines X-Band Continuous Wave (CW)-Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektrometers (s. Kap. 3.2.1, Abschnitt g)) vermessen. Außerdem wurden alle Probelösungen (s. Kap. 4.1.1, d) bis f)) mit jeweils 20-Vol% 87%-igem Glycerol versehen. Dies diente nicht nur zum Kryoschutz der frisch hergestellten Proben, sondern führte dazu, dass alle präparierten Probelösungen die gleiche Viskosität η besaßen. Die Nachregulierung des pH-Werts durch entsprechende Titration (vgl. Tab. 10 bis Tab. 13 der Unterabschnitt d) - f)) aller präparierten Proben erfolgte mit den unter b) hergestellten DPBS-Puffern verschiedener pH-Werte.

b) Herstellung des verwendeten DPBS-Puffers

Damit wichtige physiologische Parameter des menschlichen Organismus – bezogen auf den Elektrolythaushalt, den pH-Wert sowie die Osmolarität im Blutplasma – auch bei allen in dieser Arbeit durchgeführten CW-ESR-Messungen konstant gehalten werden konnten, wurde eine nach Rezeptur von Dulbecco [4] phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*, kurz: DPBS) frisch zubereitet. Zusätzlich wurden alle in diesem Kapitel präparierten Proben (s. Kap. 4.1.1, d) bis f)), solange nicht anders vermerkt, bei einer Temperatur von 37°C (Körpertemperatur) vermessen. Der pH-Wert der eingestellten

Pufferlösung wurde mit einer InLab[®] Micro pH-Elektrode⁶ unter Kopplung eines EL20 - Education Line pH-Meters der Firma Mettler Toledo GmbH auf einen physiologischen Wert von 7.4 eingestellt. Durch die spezielle Kombination der für den Puffer verwendeten Salze (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ und MgCl₂ · 6 H₂O) entsprach der angefertigte DPBS-Puffer ($c_{\text{osm}} \sim 301$ mosmol/l) in etwa einer isotonischen Kochsalzlösung und stimmte mit dem osmotischen Druck des menschlichen Organismus annähernd überein. Vor der Autoklavierung wurden die angesetzten Salzlösungen, welche nach Originalvorschrift [4] hergestellt wurden, über Millex-LCR PTFE 0.45 μm Filter des Biotechnologie-Unternehmens Merck Millipore mit Hilfe von 2-teiligen 5 ml, 10 ml und 20 ml Injekt[®] Solo-Einmalspritzen der B. Braun Melsungen AG filtriert. Das Lösen der Salze fand unter Verwendung von Milli-Q Wasser, welches vorher mittels eines Milli-Q Synthesis System des Unternehmens Merck Millipore aufgereinigt worden war, mit einem Widerstand von 18,2 M Ω statt. Anbei wurden aus dem nach [4] zubereiteten DPBS-Puffer weitere Pufferlösungen verschiedener pH-Werte (pH 0, pH 2, pH 8, pH 10, pH 12 und pH 14) durch Titration mit 40%-iger NaOH- und 37%-iger HCl-Lösung hergestellt.

c) Herstellung einer 2 mM HSA-Stammlösung

Zur Herstellung einer 2mM HSA-Stammlösung wurde eine gewünschte Menge (z.B. 100 mg) Serum Albumin vom Menschen (engl. *human serum albumin*, kurz: HSA⁷; Calbiochem[®], salzfreier lyophilisierter Feststoff, $\geq 95\%$) in ein 1,5 ml Eppendorf Safe Lock GefäßTM eingewogen, in 751 μl DPBS pH 7.4 gelöst, durch Vortexen homogenisiert und anschließend zur Absättigung der durch das Vortexen aufgeschäumten Proteinlösung bei 12.000 UpM mittels einer Heraeus[®] Pico 17 Tischzentrifuge der Firma Thermo Scientific zentrifugiert.

d) Probenpräparation zur Referenzierung von LM-Einflüssen auf HSA

Um sicher ausschließen zu können, dass die verwendeten organischen Lösungsmittel (DMF, DMSO und Toluol), in denen die synthetisierten TEMPO-Ester (s. Kap. 3.2 ff.) löslich waren, einerseits nicht zur Zerstörung der Proteinstruktur beitragen, und andererseits nicht durch HSA gebunden werden, wurde deren Einfluss durch Zugabe von 0-Vol% (Referenz), 1-Vol% und 2-Vol% der jeweiligen Lösungsmittel (LM) zu einer Lösung aus 16-DSA:HSA (2:1) in DPBS pH 7.4 überprüft.

⁶ Ebenfalls erfolgte die Einstellung aller pH-Werte der in diesem Kapitel präparierten Proben mittels dieser pH-Elektrode sowie zugehörigem pH-Meter.

⁷ Grob gerundet besitzt HSA ein Molekulargewicht (M_w) von 66000 g/mol. Laut RCSB-Proteindatenbank beläuft sich der exakte M_w -Wert auf 66571.8 g/mol [5], wobei der gerundete Wert ($M_w = 66572$ g/mol) für alle Berechnungen verwendet wurde.

Die Grundlage aller Berechnungen bildete eine konstante Proteinkonzentration von 400 μM . Ferner erfolgten die CW-ESR-Messungen aller in diesem Unterabschnitt (d) hergestellten Probelösungen bei einer Temperatur von 25°C. Nach Herstellung einer 2mM HSA-Stammlösung (s. Kap. 4.1.1, Abschnitt b)) erfolgten die Probenpräparationen, wie in Tab. 9 zusammengefasst, in chronologischer Reihenfolge, beginnend bei Punkt (1) bis Punkt (6).

Tab. 9: Probenpräparation zur Referenzierung von LM-Einflüssen auf HSA

LM - Anteil (Vol%)	0-Vol% (Referenz)	1-Vol%	2-Vol%
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	40.0 [§]	40.0 [§]	40.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	87.9	85.9	83.9
(3) 26 mM 16-DSA-Lsg. [μl]	6.16	6.16	6.16
(4) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0	46.0
(5) LM [μl]	-	2.00	4.00
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0	20.0

[§] Bezugspkt.: 400 μM HSA-Stlsg. bezogen auf ein Gesamtprobevolumen von $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

e) Probenpräparation zur Referenzierung von HSA-Bindungseinflüssen verwendeter TEMPO-Derivate sowie zur Löslichkeitsüberprüfung der synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL)

Zur Überprüfung der Protein-Bindungseigenschaften der beiden zur Synthese eingesetzten TEMPO-Derivate (kurz: TD's), 4-Hydroxy- und 4-Carboxy-TEMPO, mittels Human Serum Albumin (HSA) war es zunächst von Nöten, entsprechend Tab. 10, Referenzproben der beiden Derivate mit und ohne HSA-Beteiligung anzusetzen.

Tab. 10: Probenpräparation zur Referenzierung von HSA-Bindungseinflüssen verwendeter TD's

200 μM (x:1) HSA:TD	200 μM (0:1) HSA:TD [§]	200 μM (1:1) HSA:TD [§]
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	-	20.0
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	130	110
(3) 20 mM TD-Stlsg. [μl]	2.00	2.00
(4) DMSO [μl]	2.00	2.00
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0

[§] Referenzprobe ohne HSA-Beteiligung bezogen auf $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

[§] bezogen auf ein Gesamtprobevolumen $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

Infolgedessen konnte die Eventualität einer möglichen Bindung der TD an HSA aus dem Weg geräumt werden. Die Proben mit HSA-Beteiligung wurden im Verhältnis 1:1 (HSA:TD) und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM hergestellt. Zur Löslichkeitskontrolle der in Kap. 3 synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) und um die TSL-Aufnahme durch HSA mechanistisch deuten zu können (s. Kap. 4.2.3), konnten entsprechende Referenzproben im Verhältnis von 1:1 mit und ohne HSA-Beteiligung bei gleichbleibenden Konzentrationsverhältnissen, hier 200 μM bezogen auf eine konstante Proteinkonzentration, zusammenpipettiert werden. Wie anhand von Tab. 11 ersichtlich, erfolgte die Probenpräparation in chronologischer Abfolge der Pipettierungsschritte (1) bis (6).

Tab. 11: Probenpräparation zur Löslichkeitskontrolle synthetisierter TSL sowie mechanistischen Deutung der TSL-Aufnahme durch Human Serum Albumin (HSA)

200 μM (x:1) HSA:TSL	200 μM (0:1) HSA:TSL [§]	200 μM (1:1) HSA:TSL [§]
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	-	20.0
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	130	110
(3) 20 mM TSL-Stlsg. [μl]	2.00	2.00
(4) DMSO [μl]	2.00	2.00
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0

[§] Referenzprobe ohne HSA-Beteiligung bezogen auf $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

[§] bezogen auf ein Gesamtprobevolumen $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

f) Probenpräparationen aller HSA-Bindungsstudien TEMPO-modifizierter Pharmazeutika

Um die Mizellbildung bei jeder CW-ESR-Messung möglichst auszuschließen (oder gering zu halten), musste je nach synthetisiertem TEMPO-Ester und seiner wässrigen Lösungsumgebung (LM und DPBS) eine sog. kritische Mizellkonzentration bestimmt werden, indem die TEMPO-modifizierten pharmazeutischen Wirkstoffe mit HSA im Verhältnis (1:1) bei verschiedenen Konzentrationen (1mM – 100 μM) vermessen wurden. Nach Begutachtung dieser Test CW-ESR-Messreihen, welche auch archiviert wurden, konnte sich für zwei fixe Stammkonzentrationen⁸ von 100 μM und 600 μM entschieden werden, bei denen die Realisierung der anstehenden HSA-Bindungsstudien von überwiegender Mehrheit aller synthetisierten TEMPO Spin-Label (kurz: TSL) gelang. Auf Grundlage dieser beiden

⁸ Mit Stammkonzentration ist an dieser Stelle die Gesamtkonzentration der Probe bezogen auf die Anteile der gelösten Stoffe (hier: TSL und HSA) gemeint.

Konzentrationen wurde die Proteinkonzentration als Fixpunkt genutzt und die Verhältnisse der spin-gelabelten Pharmazeutika variiert.

Tab. 12: Probenpräparation aller HSA-Bindungsstudien bei einer Ausgangskonzentration von 100 μM

100 μM (x:1) HSA:TSL	100 μM (0.3:1) HSA:TSL	100 μM (0.45:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	10.0 [§]	10.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	120	120
(3) 10 mM TSL-Stlsg. [μl]	0.60	0.90
(4) DMSO [μl]	3.40	3.10
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
100 μM (x:1) HSA:TSL	100 μM (0.6:1) HSA:TSL	100 μM (0.8:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	10.0 [§]	10.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	120	120
(3) 10 mM TSL-Stlsg. [μl]	1.20	1.60
(4) DMSO [μl]	2.80	2.40
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
100 μM (x:1) HSA:TSL	100 μM (1:1) HSA:TSL	100 μM (1.3:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	10.0 [§]	10.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	120	120
(3) 10 mM TSL-Stlsg. [μl]	2.00	2.60
(4) DMSO [μl]	2.00	1.40
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
100 μM (x:1) HSA:TSL	100 μM (1.6:1) HSA:TSL	100 μM (2:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	10.0 [§]	10.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	120	120
(3) 10 mM TSL-Stlsg. [μl]	3.20	4.00
(4) DMSO [μl]	0.80	-
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0

[§] Bezugspkt.: 100 μM HSA-Stlsg. bezogen auf ein Gesamtprobevolumen von $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

Die Probenpräparation (s. Tab. 12 und Tab. 13) erfolgte, wie den nachfolgenden und vorangegangenen Tabellen vorheriger Unterabschnitte zu entnehmen ist, wiederum in chronologischer Abfolge, angefangen von Punkt (1), aufhörend bei Punkt (6). Unter Verwendung der von George Scatchard entwickelten, graphischen Auswertungsmethode, namens Scatchard-Plot [6], konnte mit Hilfe der durch Simulation mittels EasySpin [1] bestimmten Bindungsanteile (freie und gebundene Anteile) der aufgenommenen CW-ESR-Spektren eine graphische Auswertung erfolgen, sodass die daraus resultierenden und in Kap. 4.3 ff. angegeben Assoziations-konstanten, welche sich aus der Steigung der entsprechenden Scatchard-Plots mittels linearer Regression bestimmen ließen, sowie die maximale Anzahl von Bindungsstellen ermittelt werden konnten. Letztere konnten im Endeffekt rein rechnerisch ermittelt werden, indem der Schnittpunkt, welcher durch lineare Extrapolation der Regressionsgeraden graphisch bestimmt werden konnte, an der Abszisse des entsprechenden Scatchard-Plots zunächst abgelesen und nachfolgend durch die Gesamtproteinkonzentration dividiert wurde. Zudem konnte zusätzlich durch Bestimmung des arithmetischen Mittels der gebundenen Anteile aller in verschiedenen Verhältnissen ($x:1$, $x = \text{TSL-Anteil}$) gemessenen CW-ESR-Spektren pro jeweiligem TSL eine mittlere Bindungsaffinität bzgl. aller sich in Lösung befindlichen Proteine (in %) angegeben werden. Bezüglich der Methodik sei zu erwähnen, dass für den Erhalt eines Scatchard-Plots, an der Ordinate (y-Achse) die Konzentration des jeweils gebundenen Anteils (Protein-Ligand-Komplexes) [B] dividiert durch die Konzentration des jeweiligen freien Anteils [F] gegen die Konzentration des entsprechenden gebundenen Anteils [B] auf der x-Achse (Abszisse) aufgetragen werden musste (vgl. Lit. [7]). Weiterhin ist anzumerken, dass zur Auswertung nach Scatchard nicht alle synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) bei den gleichen Konzentrationsverhältnissen, wie in Tab. 12 und Tab. 13 angegeben, vermessen worden waren, sondern das je nach synthetisiertem TEMPO-Ester sich aus dem in den Tabellen aufgezeigten Repertoire für fünf bis acht Konzentrationsverhältnisse entschieden wurde. Die Vermessung aller Proben bei leicht unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen hat in guter Näherung sowohl keine Auswirkung auf die Bestimmung der einzelnen Bindungsaffinitäten bzw. Assoziationskonstanten (s. Kap. 4.3 ff.) mittels der Scatchard-Methode als auch auf die Simulation der einzelnen Spektren in EasySpin [1] unter Verwendung des Softwareprogramms Matlab 2010a (The MathWorks, Inc.) (s. Kap. 4.1.3 bzw. Kap. 3.1.2 . Abschnitt g)). Wichtig war vielmehr, dass mindestens fünf bis acht CW-ESR-Spektren aufgenommen wurden, um die Genauigkeit der Scatchard-Methode möglichst hoch zu halten. An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass bei sechs der dreiundzwanzig synthetisierten TSL

aufgrund der bei allen Konzentrationen starken Mizellierung keine Konzentrationsreihe gemessen und mittels der Scatchard-Methode ausgewertet werden konnte (s. Kap. 4.3 ff.).

Tab. 13: Probenpräparation aller HSA-Bindungsstudien bei einer Ausgangskonzentration von 600 μM

600 μM (x:1) HSA:TSL	600 μM (0.3:1) HSA:TSL	600 μM (0.45:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	60.0 [§]	60.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	70.0	70.0
(3) 50 mM TSL-Stlsg. [μl]	0.72	1.08
(4) DMSO [μl]	3.28	2.92
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
600 μM (x:1) HSA:TSL	600 μM (0.6:1) HSA:TSL	600 μM (0.8:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	60.0 [§]	60.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	70.0	70.0
(3) 50 mM TSL-Stlsg. [μl]	1.44	1.92
(4) DMSO [μl]	2.56	2.08
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
600 μM (x:1) HSA:TSL	600 μM (1:1) HSA:TSL	600 μM (1.3:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	60.0 [§]	60.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	70.0	70.0
(3) 50 mM TSL-Stlsg. [μl]	2.40	3.12
(4) DMSO [μl]	1.60	0.88
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0
(6) Titrations-Vol. [μl]	20.0	20.0
600 μM (x:1) HSA:TSL	600 μM (1.6:1) HSA:TSL	600 μM (2:1) HSA:TSL
(1) 2 mM HSA-Stlsg. [μl]	60.0 [§]	60.0 [§]
(2) DPBS pH 7.4 [μl]	70.0	70.0
(3) 50 mM TSL-Stlsg. [μl]	3.84	-
(3) 100 mM TSL-Stlsg. [μl]	-	2.40
(4) DMSO [μl]	0.16	1.60
(5) 87%-Glycerol [μl]	46.0	46.0

[§] Bezugspkt.: 600 μM HSA-Stlsg. bezogen auf ein Gesamtprobevolumen von $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

4.1.2 Technische Details zur Aufnahme der CW-ESR-Spektren

Damit bei jeder der durchgeführten CW-ESR-Messungen eine möglichst maximale Signalintensität ohne Verfälschung der tatsächlichen Signalform erreicht werden konnte, wurde für die Modulationsamplitude ein Wert von 0,1 mT gewählt. Weiterhin wurde das B-Feld mit 334.6 mT bei einer MW-Frequenz von ~ 9.377 GHz, die Sweep-Weite mit 11,90 mT und Sweep-Zeit⁹ mit 60 s so eingestellt, dass einerseits der für die Messungen benötigte Spektralbereich von grob 329 mT bis 340 mT abgedeckt werden konnte, sowie andererseits die Scangeschwindigkeit pro Messdurchlauf (Scan) das aufgenommene Spektrum nicht verzerrte. Die Anzahl der Scans wurde als vernünftiger Kompromiss aus Messzeit und Signal-Rausch-Verhältnis¹⁰ (SNR), gerade bei der Vermessung niedrig konzentrierter Proben, gewählt. Für höher konzentrierte Proben ($> 100 \mu\text{M}$) reichten meist wenige Scans aus. Ferner wurde der Gain (Signalverstärkung) bei konstant gehaltener MW-Abschwächung von 25 dB für jede Messung so angepasst, dass das erhaltene CW-ESR-Signal deutlich zu erkennen war. Bezüglich aller weiteren CW-ESR gerätetechnischen Details sei auf Unterabschnitt g) in Kap. 3.1.2 verwiesen.

4.1.3 Analyse der experimentellen CW-ESR-Spektren via Simulation in EasySpin

Da es ein diffiziles Problem darstellt, spektrale Informationen und Bindungsaffinitäten auf rein optischem Wege zu ermitteln, erfolgte, wie in Kap. 3.1.2 bereits angedeutet, die Analyse der experimentell aufgenommenen CW-ESR-Spektren durch entsprechende spektrale Simulationen im Programmpaket EasySpin [1], das unter der Software Matlab 2010a (The MathWorks, Inc.) läuft. Präziser ausgedrückt, handelt es sich bei EasySpin um eine Simulationssoftware, welche von Stoll und Schweiger entwickelt und u.a. mehrere Routinen für numerische spektrale Simulationen in einer breiten Palette von dynamischen Bedingungen bietet. Alle in dieser Arbeit durchgeführten spektralen CW-ESR-Simulationen beruhen auf quantenmechanischen Berechnungen der Resonanzfelder. Diese erfolgten durch numerisches Lösen des effektiven Hamiltonoperators für Nitroxide für einen definierten Satz spektraler ESR-Parameter, wie bspw. die Werte des g - und A -Tensors¹¹, bei Einstrahlung einer konstanten MW-Frequenz, wobei diese, wie in Kap. 2 ff. bereits angedeutet wurde, ein

⁹ Bei der Sweep-Zeit handelt es sich um die Durchlaufszeit, die für einen Messdurchlauf (Scan) benötigt wird, bei der Sweep-Weite um die spektrale Breite.

¹⁰ Man beachte, dass sich das SNR mit der Quadratwurzel der Anzahl wiederholter Scans deutlich verbessert.

¹¹ Die in dieser Arbeit angegebenen Werte der Hyperfeinkopplungstensoren (A_{xx} , A_{yy} und A_{zz}) können ebenso, wie die angegebenen g_{iso} -Werte im experimentellen Teil (s. Kap. 3.2 ff.), aufgrund fehlender W-Bandmessungen nur als gute Näherung angesehen werden.

Charakteristikum für die CW-ESR-Methode darstellt. Weiterführend wurden alle spektralen Simulationen mittels in Matlab geschriebener Programme unter zur Hilfenahme der EasySpin Toolbox für ESR-Spektroskopie, genauer gesagt der Subroutine „slow motion“, welche basierend auf dem theoretischen Modell von Schneider und Freed entwickelt wurde [2], als EasySpin-Funktion „chili“ verfasst und ausgeführt [1]. Neben der Analyse weiterer wichtiger spektraler ESR-Parameter, wie bspw. der Rotationskorrelationszeit τ_R bzw. Diffusionstensoren D , wurden die durchgeführten Simulationen, welche in Kap. 4.2 ff. gezeigt werden, hauptsächlich zur Bestimmung der gebundenen und freien Anteile (s. Kap. 4.1.1, Abschnitt f)) genutzt. Es sei nochmals erwähnt, dass bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen, solange nicht anders vermerkt, die literaturbekannten g -Werte von 4-Hydroxy-TEMPO ($g_{xx} = 2.0095$, $g_{yy} = 2.0064$ und $g_{zz} = 2.0027$) Verwendung fanden [3]. Diese spiegeln zwar nicht ganz exakt die tatsächlichen g -Werte der synthetisierten TEMPO-Ester wieder, was allerdings bei der guten Qualität der Simulationen für die Ermittlung der einzelnen spektralen Bindungsanteile¹² keine Relevanz besitzt.

4.1.4 Analytisches Vorgehen bei der Simulation von Mehrkomponentenspektren

Die spektrale Simulation der aufgenommenen 2- bzw. 3-Komponentenspektren¹³ wurde, nachdem die am Frequenzzähler (Racal-Dana 2101) abgelesenen MW-Frequenzen und literaturbekannten g -Werte von 4-Hydroxy-TEMPO eingegeben wurden, auf zwei verschiedene Arten begonnen. Bei der Simulation der 2-Komponentenspektren wurde erstens (1) der freie und gebundene Anteil in grober Näherung bestimmt, zweitens (2) eine B-Feldkorrektur vorgenommen, drittens (3) der A_{zz} -Wert zur Definierung der Hyperfeinkopplungen angepasst, viertens (4) die Linienbreite ermittelt, fünftens (5) das Maximum des Hochfeldpeaks durch Eingabe der Rotationskorrelationszeit oder Variation der Diffusionstensoren bestimmt, und letztendlich sechstens (6) das B-Feld wiederum nachjustiert. Die Schritte (2) bis (6) wurden solange optimiert, bis das simulierte Spektrum exakt bzw. mehr oder weniger exakt dem experimentellen entsprach. Hiermit ist gemeint, dass je nach Schwierigkeit der spektralen Simulation sich für ein simuliertes Spektrum, wenn es noch nicht der gewünschten Perfektion entsprach, entschieden werden musste. Bei der Simulation der 3-Komponentenspektren wurden gewissermaßen gleich vorgegangen, jedoch wurde nach grober Bestimmung des freien und gebundenen Anteils, zunächst die Höhenlage bzgl. des Nulldurchgangs der

¹² Hierbei handelt es sich um den jeweils gebundenen, freien und mizellierten Anteil, aus denen sich die meisten in dieser Arbeit aufgenommenen CW-ESR-Spektren zusammensetzen

¹³ Hiermit ist gemeint, dass das 3-Komponentenspektrum gegenüber einem 2-Komponentenspektrum einen zusätzlich zum freien und gebundenen Anteil mizellenbehafteten Anteil besitzt.

gemessenen CW-ESR-Spektren durch Variation der Werte für den mizellgebundenen Anteil korrigiert. Nach jedem Optimierungsvorgang wurde bei allen 2- bzw. 3-CW-ESR-Komponentenspektren noch eine Hintergrundkorrektur zur Eliminierung des Resonatorhintergrundartefaktes, welches besonders bei niedrig konzentrierten Proben deutlich mit bloßem Auge erkennbar war, durchgeführt. Allerdings wurde darauf geachtet, dass es hierbei zu keiner Verfälschung der aufgenommenen CW-ESR-Spektren kam.

4.1.5 Spektrale Zusammensetzung der gemessenen 2- bzw. 3-Komponentenspektren

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten spektralen Simulationen lässt sich durch separate Darstellung der jeweils einzeln simulierten spektralen Komponenten, wie bspw. der gebundene (**A**), freie (**B**) sowie der mizellierte (**C**) Anteil, die Komposition der jeweils gemessenen CW-ESR-Spektren, wie bspw. in Abb. 22 für die Simulation von **ASS-TSL** graphisch illustriert, aufzeigen. Da es sich in Abb. 22 eigentlich um ein 2-Komponentenspektrum, bestehend aus freiem (**B**) und gebundenem (**A**) Bindungsanteil handelt, wurde der Vollständigkeit halber der in einem 3-Komponentenspektrum existente, mizellenbehaftete Anteil (**C**), da dieser Anteil trotz eines spektralen Gesamtanteils von 0.00% dennoch einen für mizellierte Anteile charakteristischen spektralen Verlauf widerspiegelt, mit abgebildet. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass die einzelnen als **A**, **B** und **C** deklarierten spektralen Bindungsanteile, bestehend aus $x_{(i)}$, dem jeweiligen prozentualen Anteil, mal $sim_{(i)}$, der für den jeweiligen Anteil mittels Matlab geschriebenen Simulationsroutine, sich nach dem Superpositionsprinzip (s. Gl. 4.1) zu einem „Gesamtspektrum“ addiert, dem in Abb. 22 als **A** + **B** + **C** deklarierten simulierten CW-ESR-Spektrum (rot) von **ASS-TSL**. Wie in Abb. 22 erkennbar ist, stimmt die Simulation sehr gut mit dem experimentell gemessenen, in schwarz dargestellten, CW-ESR-Spektrum überein.

$$sim_{(A+B+C)} = A + B + C = x_{(A)} \cdot sim_{(A)} + x_{(B)} \cdot sim_{(B)} + x_{(C)} \cdot sim_{(C)} \quad (4.1)$$

Die dabei mittels der spektralen Simulation erhaltenen prozentualen Bindungsanteile belaufen sich auf $x_{(A)} = 0.49 \hat{=} 49.0\%$, $x_{(B)} = 0.51 \hat{=} 51.0\%$ und $x_{(C)} = 0.00 \hat{=} 0.00\%$. Zur Verdeutlichung der durch bloßes Hinsehen schwer erkennbaren und sich links vom Tieffeld- bzw. rechts vom Hochfeldpeak des typischen freien 3-Linienspektrums (**B**) befindlichen gebundenen Anteile (sog. Hyperfeinstruktur gebundener Zustände), wurden diese zur besseren Einsicht durch eine stark vergrößerte Darstellung nochmals hervorgehoben.

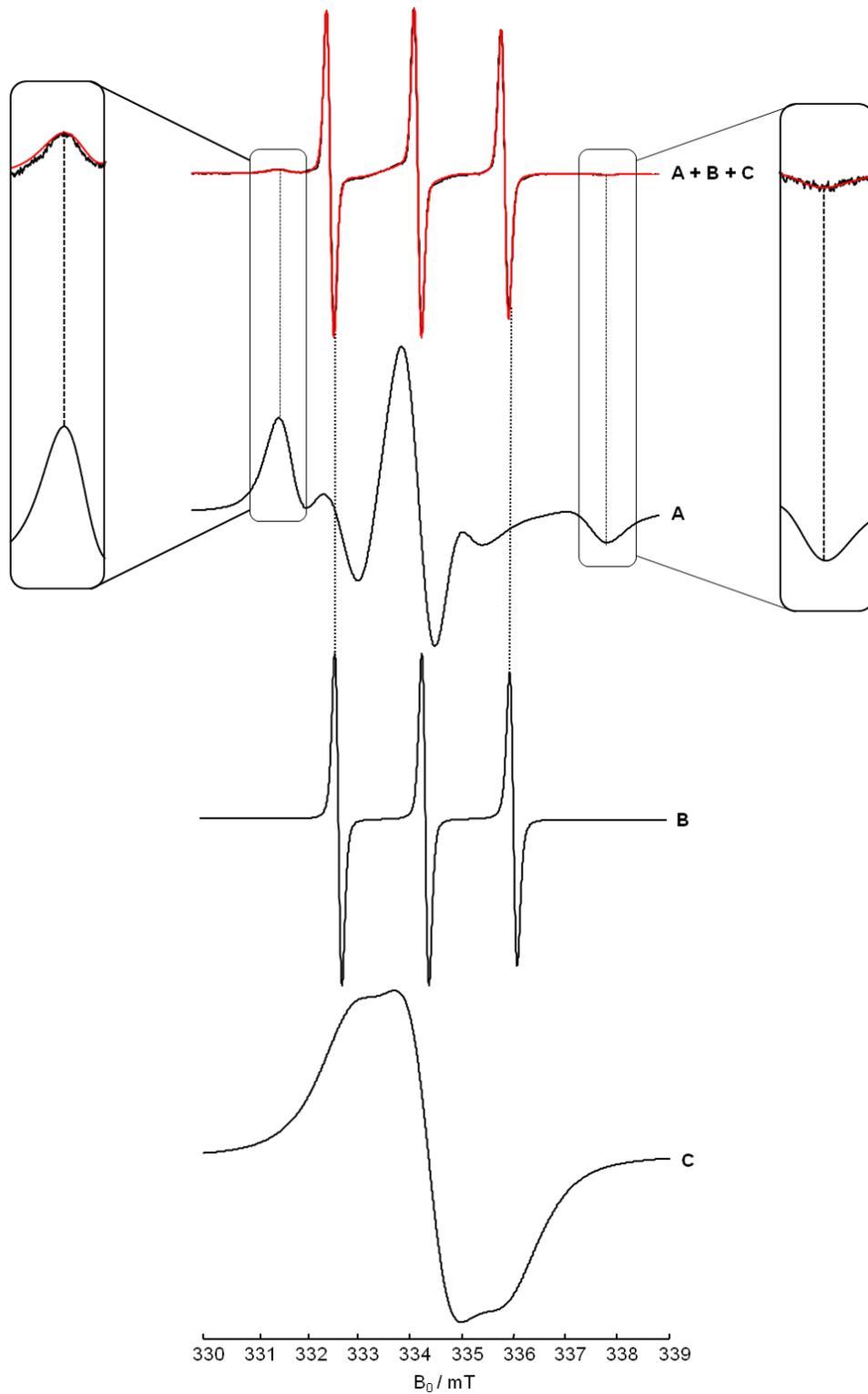


Abb. 22: Spektrale Zusammensetzung einzeln simulierter Komponenten **A**, **B** und **C** von ASS-TSL unter HSA-Beteiligung im Verhältnis von 1:1 und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

4.2 Prüfung von Bindungs- und LM-Einflüssen auf Serum Albumin

4.2.1 HSA-Bindungseinfluss verwendeter TEMPO-Derivate

Zur Überprüfung, ob die beiden zur Synthese verwendeten TEMPO-Derivate, 4-Hydroxy- und 4-Carboxy-TEMPO, durch Serum Albumin vom Menschen (HSA) aufgenommen werden, wurden, wie in Kap. 4.1.1 unter e) beschrieben, entsprechende Referenzmessungen durchgeführt. Die jeweils experimentell gemessenen CW-ESR-Spektren sind in Abb. 23 und Abb. 24 visualisiert worden.

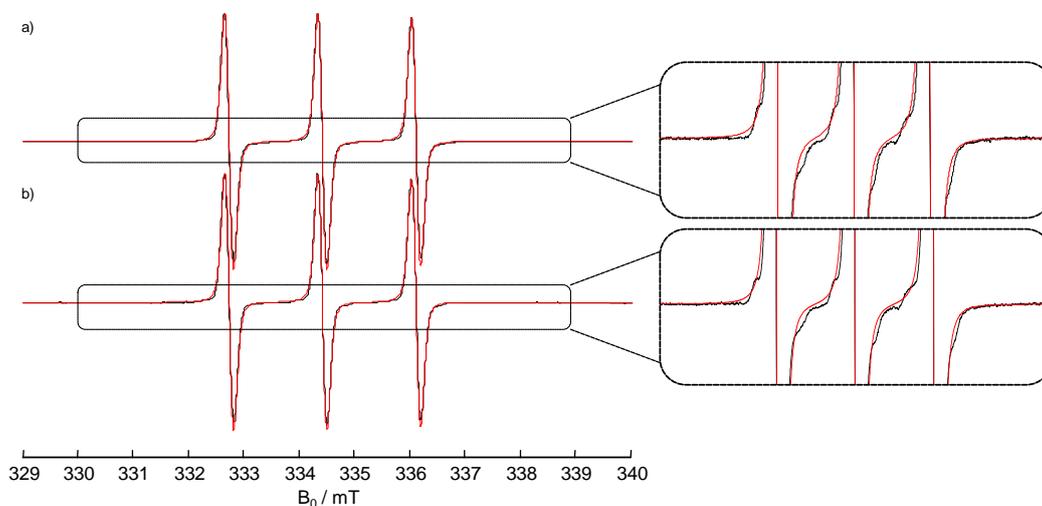


Abb. 23: HSA-Bindungseinfluss von 4-Hydroxy-TEMPO. a) Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) CW-EPR-Spektrum von 4-Hydroxy-TEMPO mit HSA-Beteiligung im Verhältnis von 1:1 und einer fixen Proteinkonzentration von $200 \mu\text{M}$. b) Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) CW-EPR-Spektrum von 4-Hydroxy-TEMPO ohne HSA-Beteiligung bei einer Stammkonzentration von $200 \mu\text{M}$.

Im Hinblick auf Abb. 23 und Abb. 24 wird deutlich, dass die beiden TEMPO-Derivate nicht durch HSA gebunden werden. Diese Erkenntnis ermöglichte u.a. (vgl. Kap. 4.2.2) eine weniger komplizierte Durchführung der angestrebten HSA-Bindungsstudien mittels der in Kap. 3.2 ff. synthetisierten TEMPO Spin-Label (kurz: TSL) und legte somit einen wichtigen Grundstein für diese Arbeit. Die durch spektrale Simulation in guter Näherung erhaltenen Werte der Hyperfeintensoren, $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.9 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 106.8 \text{ MHz}$ bezüglich der simulierten CW-ESR-Spektren von 4-Hydroxy-TEMPO und $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.8 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.9 \text{ MHz}$ bezüglich der simulierten CW-ESR-Spektren von 4-

Carboxy-TEMPO, liegen laut Literatur¹⁴ mit einem A_{zz} -Wert > 37 G, was ungefähr einem Wert von > 103.8 MHz gleichkommt, und $A_{xx} = A_{yy} = 4.3 - 6.4$ G ($\sim 12 - 18$ MHz) im typischen Bereich für Nitroxide [3].

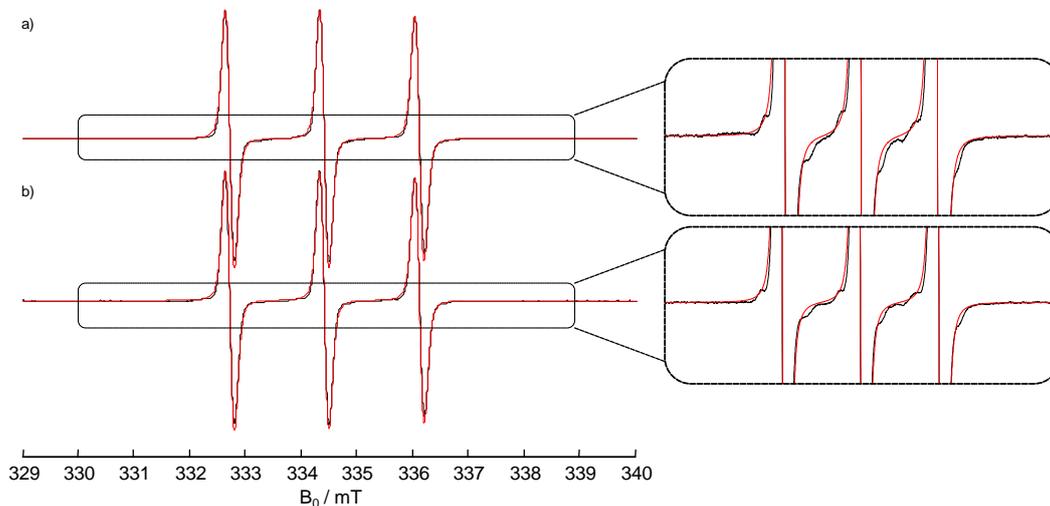


Abb. 24: HSA-Bindungseinfluss von 4-Carboxy-TEMPO. a) Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) CW-EPR-Spektrum von 4-Carboxy-TEMPO mit HSA-Beteiligung im Verhältnis von 1:1 und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μ M. b) Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) CW-EPR-Spektrum von 4-Carboxy-TEMPO ohne HSA-Beteiligung bei einer Stammkonzentration von 200 μ M.

Weiterhin lagen die ermittelten Rotationskorrelationszeiten für 4-Hydroxy-TEMPO mit und ohne HSA bei einem identischen Wert von $\tau_R = 8.5$ ps. Im Gegensatz dazu, ergab sich für 4-Carboxy-TEMPO ein beinahe doppelt so großer Wert für die Rotationskorrelationszeit mit $\tau_R = 16.5$ ps. Dies war durchaus zu erwarten, da einerseits das Molekulargewicht von 4-Carboxy-TEMPO gegenüber 4-Hydroxy-TEMPO zwar leicht erhöht, aber andererseits vielmehr die molekulare Rotationsdynamik durch die verstärkte Neigung von Carbonsäuren durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu dimerisieren, was ebenfalls mit einer Verdopplung des Molekulargewichtes von 4-Carboxy-TEMPO einhergeht, stark eingeschränkt ist und somit eine fast doppelt so langsame Rotationskorrelationszeit durchaus realistisch erscheint. Zudem nimmt durch die Dimerisierung von 4-Carboxy-TEMPO der hydrophobe Charakter im Wesentlichen zu, was eine, wenn auch nur leicht zu erahnende

¹⁴ In angegebener Literatur [3] wurde sich allerdings auf die Hyperfeintensor-Werte von 4-Hydroxy-TEMPO bezogen. Für 4-Carboxy-TEMPO konnten nach längerer Recherche keine exakten Werte gefunden werden. Allerdings liegen die Werte für Nitroxide alle in ähnlichen Bereichen, was auch den Beweggrund darstellte, die für die Simulationen als Startparameter eingesetzten g-Werte von 4-Hydroxy-TEMPO, welche sich als nützlich und sinnvoll aufgrund der meist sehr ordentlich simulierten Spektren erwiesen, zu verwenden (s. [3]).

Anisotropie der aufgenommenen CW-ESR-Spektren, gegenüber derer von 4-Hydroxy-TEMPO, welche eher isotropen Charakter aufweisen, zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 23 und Abb. 24). Dies hat wiederum zur Folge, dass 4-Hydroxy-TEMPO in hydrophiler Umgebung ohne die Möglichkeit einer Dimerisierung fast doppelt so schnell rotiert wie die Dimere von 4-Carboxy-TEMPO im gleichartig wässrigen Medium.

4.2.2 Lösungsmittel-Einflüsse auf HSA in wässriger Umgebung

Zur Referenzierung des Beibehaltens der molekularen Struktur von HSA in einer wässrigen Lösungsumgebung, bestehend aus DPBS und entsprechendem Lösungsmittel (LM), wurden die zum Lösen der synthetisierten TEMPO-Ester bzw. TEMPO Spin-Label verwendeten Lösungsmittel, DMSO, Toluol und DMF, jeweils mit einer Lösungsmittelbeteiligung von 0-Vol%, 1-Vol% und 2-Vol% in Abhängigkeit einer fixen Proteinkonzentration von 400 μM unter zur Hilfenahme von 16-DSA im Verhältnis von HSA:16-DSA (1:2) vermessen. Wie aus vielen Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe bekannt [29], erlaubt die CW-ESR-Spektroskopie an diesem selbst-organisierten System aus Fettsäuren und HSA sehr empfindlich die Detektion von Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins. Die hierbei erhaltenen Messresultate sind separat, je nach gerade verwendetem Lösungsmittel, zusammengefasst worden und können in Abb. 25 bis Abb. 27 eingesehen werden.

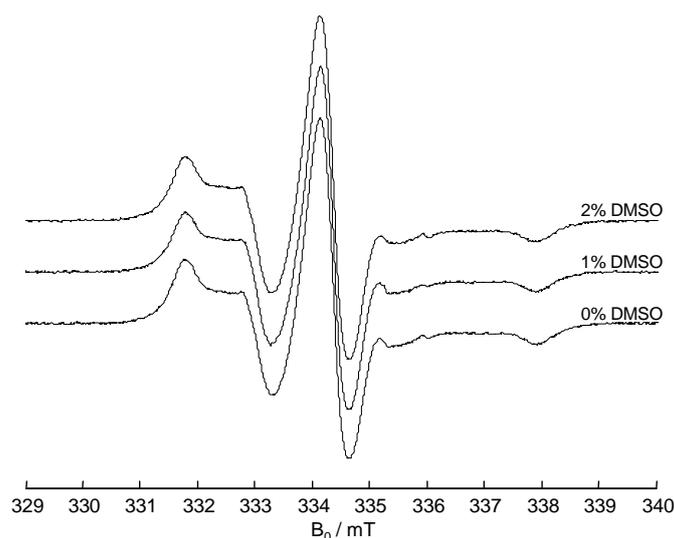


Abb. 25: Einfluss von 0-Vol%, 1-Vol% sowie 2-Vol% DMSO auf Human Serum Albumin (HSA) ausgehend einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM und einem 16-DSA:HSA-Verhältnis von 2:1.

Im Hinblick auf Abb. 25 bis Abb. 27 fällt auf, dass die molekulare Struktur von HSA auch bei einer LM-Beteiligung von 2-Vol% erhalten bleibt und somit nicht mit einer Zerstörung des Proteins, während der hier durchgeführten HSA-Bindungsstudien (s. Kap. 4.3 ff.), unter Berücksichtigung aller weiteren ausgewählten Messbedingungen (s. Kap. 4.1.1 ff.) zu rechnen war und ist.

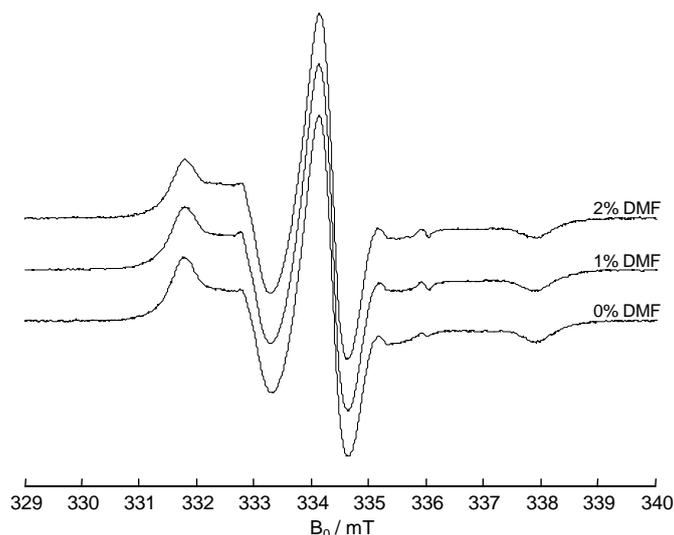


Abb. 26: Einfluss von 0-Vol%, 1-Vol% sowie 2-Vol% DMF auf Human Serum Albumin (HSA) ausgehend einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM und einem 16-DSA:HSA-Verhältnis von 2:1.

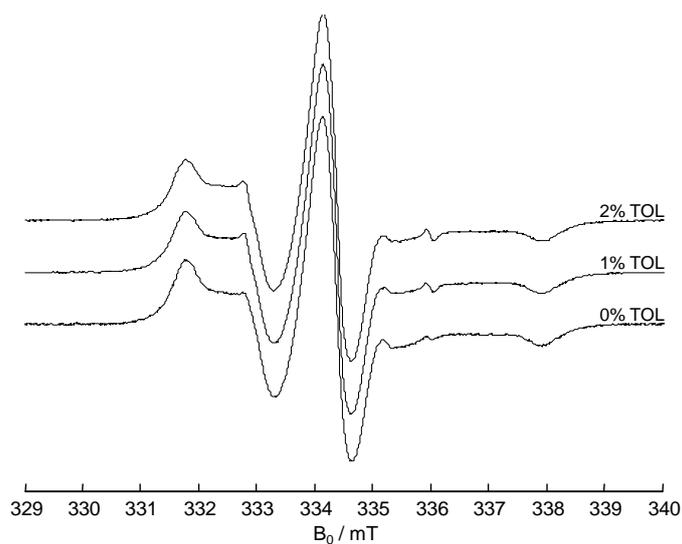


Abb. 27: Einfluss von 0-Vol%, 1-Vol% sowie 2-Vol% Toluol (TOL) auf Human Serum Albumin (HSA) ausgehend einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM und einem 16-DSA:HSA-Verhältnis von 2:1.

Aufgrund dessen wurde sich bzgl. der Durchführung der HSA-Bindungsstudien für eine LM-Beteiligung von 2-Vol% entschieden, was bezogen auf die verwendeten Gesamtvolumina aller präparierten Proben von jeweils $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$ einem Lösungsmittelanteil von $4 \mu\text{l}$ entsprach und somit das Zusammenpipettieren aller Proben, aufgrund nicht zwangsweise zu klein gewählter Lösungsmittelvolumina, deutlich vereinfachte.

4.2.3 Mechanistische Deutung der TSL-Aufnahme durch HSA

Um die Löslichkeit der synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) in einer wässrigen Lösungsumgebung ohne HSA überprüfen zu können, wurden zunächst, wie in Kap. 4.1.1 unter e) beschrieben, entsprechende Referenzproben mit und ohne HSA-Beteiligung angefertigt, wobei die hergestellten TSL-Proben ohne HSA-Beteiligung genauso wie die Proben in Gegenwart von HSA und TSL im Verhältnis von 1:1 bei einer gleichbleibenden Gesamtkonzentration von $200 \mu\text{M}$ vermessen worden waren.

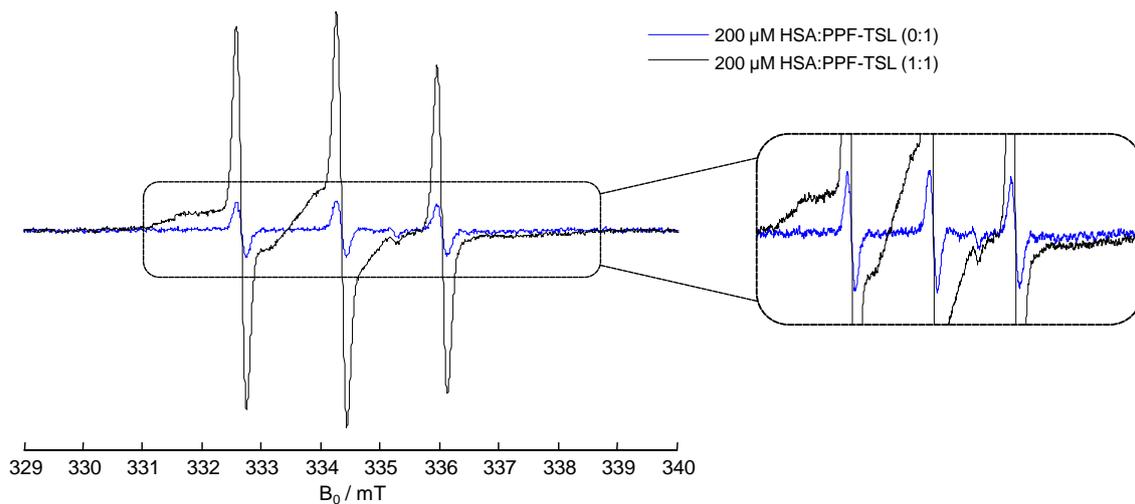


Abb. 28: Löslichkeit und Aufnahme von PPF-TSL durch HSA in wässriger Lösungsumgebung (2-Vol% DMSO). Abgebildet sind die beiden experimentellen CW-ESR-Spektren von PPF-TSL ohne (blau) und mit (schwarz) HSA, welche jeweils bei einer Gesamtkonzentration der Probe von $200 \mu\text{M}$ gemessen wurden.

Resultierend wiesen alle CW-ESR-spektroskopisch untersuchten TSL-Proben ein mehr oder weniger ähnliches Löslichkeitsverhalten in wässrigem Lösungsumfeld auf, wobei die hierbei auftretenden Unterschiede anhand drei CW-ESR-Spektren exemplarisch ausgewählter TEMPO Spin-Label (ASS-TSL, SAL-TSL und PPF-TSL) festgemacht und gemäß Abb. 28 bis Abb. 30 graphisch veranschaulicht werden konnten.

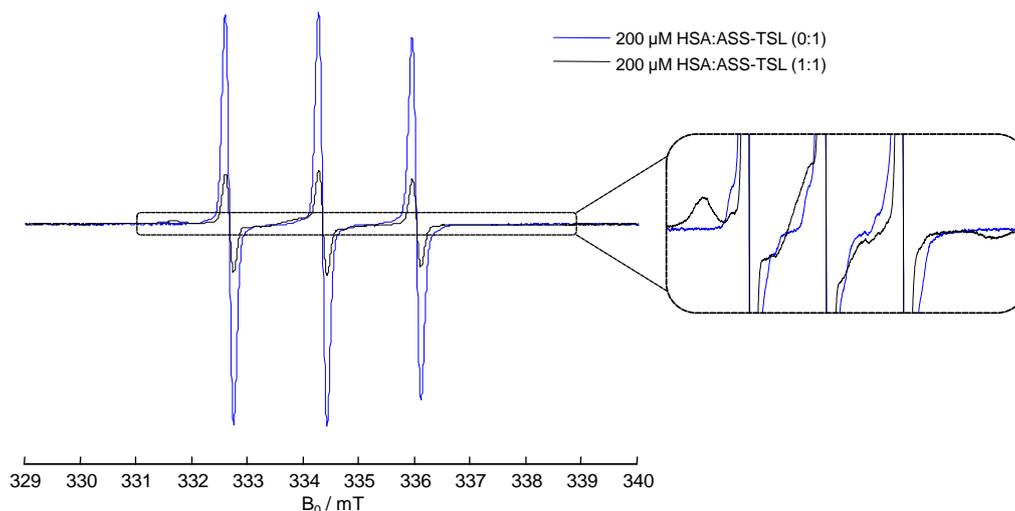


Abb. 29: Löslichkeit und Aufnahme von ASS-TSL durch HSA in wässriger Lösungsumgebung (2-Vol% DMSO). Abgebildet sind die beiden experimentellen CW-ESR-Spektren von ASS-TSL ohne (blau) und mit (schwarz) HSA, welche jeweils bei einer Gesamtkonzentration der Probe von 200 μM gemessen wurden.

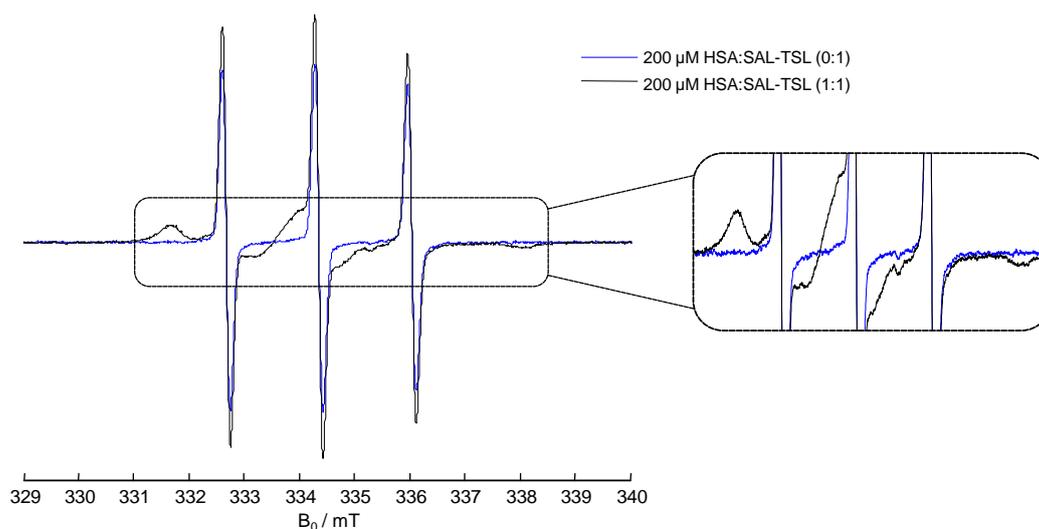


Abb. 30: Löslichkeit und Aufnahme von SAL-TSL durch HSA in wässriger Lösungsumgebung (2-Vol% DMSO). Abgebildet sind die beiden experimentellen CW-ESR-Spektren von SAL-TSL ohne (blau) und mit (schwarz) HSA, welche jeweils bei einer Gesamtkonzentration der Probe von 200 μM gemessen wurden.

Um die Funktionsweise bzw. mechanistischen Prozess der Ligandaufnahme¹⁵ durch HSA näher erläutern zu können, sind parallel zu den HSA-freien CW-ESR-Spektren der synthetisierten TEMPO-Ester, die entsprechend gemessenen CW-ESR-Spektren der HSA-

¹⁵ An dieser Stelle ist mit Ligandaufnahme die Aufnahme der synthetisierten TEMPO-Ester bzw. TEMPO Spin-Label (TSL) gemeint.

TSL-Proben von ASS-TSL, SAL-TSL und PPF-TSL in die oben genannten Abbildungen mit integriert worden. Im Hinblick auf Abb. 30 und Abb. 28 kann festgehalten werden, dass die Löslichkeit von SAL-TSL, aber vor allem die von PPF-TSL durch die Anwesenheit von HSA deutlich erhöht wird. Dies lässt sich auf die mizellenbrechende Wirkung und somit die sich daran anschließende Ligandaufnahme durch HSA, als Transportprotein vieler unlöslicher Pharmazeutika, zurückführen. Im Gegensatz dazu, fällt unter Begutachtung der in Abb. 29 gezeigten CW-ESR-Spektren auf, dass ASS-TSL auch bei Abwesenheit von HSA eine hohe Löslichkeit im wässrigen Lösungsumfeld aufweist. An dieser Stelle befinden sich die einzelnen TEMPO-modifizierten ASS-Moleküle in freien, nicht mizellierten Zuständen und können folgedessen durch HSA direkt aufgenommen werden. Jedoch sollte an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass die meisten TEMPO-modifizierten pharmazeutischen Wirkstoffe ein annähernd ähnliches Löslichkeitsverhalten wie PPF-TSL zeigten. Da die Mizellenbildung, aufgrund dessen einige CW-ESR-Bindungsstudien einzelner synthetisierter TSL (s. Kap. 4.3 ff.) zur Aufnahme von Scatchard-Plots nicht durchgeführt werden konnten, ein vermehrt auftretendes Problem darstellte, wurden einerseits die frisch hergestellten Proben erst nach einer Inkubationszeit von 24 h, andererseits, wie in Kap. 4.1.1 unter f) bereits angesprochen, bei bestimmt ausgewählten Konzentrationen – entweder 100 μM oder 600 μM – vermessen. Abschließend bzgl. dieses Unterkapitels kann festgehalten werden, dass durch die Anwesenheit von HSA Mizellen gebrochen, die Löslichkeit von pharmazeutischen Liganden erhöht und somit deren Proteinbindung ermöglicht wird. Da HSA multifunktional ist, indem es eine Vielzahl verschiedener Stoffe interzellulär transportieren kann, liegt der Verdacht nahe, dass dieses im menschlichen Organismus mengenmäßig am meisten vorliegende „Majorprotein“ als eine Art „interzellulärer Transportemulgator“ fungiert.

4.3 CW-ESR-Bindungsstudien TEMPO-modifizierter Pharmazeutika

In jedem der fortfolgenden Unterkapitel wurden bezüglich der durchgeführten HSA-Bindungsstudien einerseits die jeweiligen bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen gemessenen und simulierten CW-ESR-Spektren der in Kap. 3.2 ff. dargestellten synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) in entsprechenden Abbildungen der Kap. 4.3.1 bis Kap. 4.3.9 graphisch kompaktiert, andererseits die anhand spektraler Simulationen ermittelten Bindungsanteile (hauptsächlich freie und gebundene Anteile) der jeweiligen bei verschiedenen Konzentrationen gemessenen experimentellen CW-ESR-Spektren mit Hilfe der Scat-

chard-Methode zu entsprechenden Scatchard-Plots (s. Kap. 4.3.1 - Kap. 4.3.9) komprimiert und abgebildet. Weiterhin ließ sich durch Auswerten der ebenfalls in den nachfolgenden Unterkapiteln aufgeführten Scatchard-Plots der jeweiligen TEMPO-Ester sowohl die sich jeweils aus der Steigung ergebende Assoziationskonstante sowie die mittlere Bindungsaffinität bzgl. aller Proteine (in %) mittels linearer Regression bestimmen, als auch die max. Anzahl an Bindungsstellen pro Protein durch lineare Extrapolation der Regressionsgeraden ermitteln. Präziser ausgedrückt, konnte die Bindungsstellenanzahl fortfolgend durch Ablesen des Schnittpunktes an der x-Achse und anschließender Division des abgelesenen Schnittpunktes durch die verwendete Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe - entweder 100 μM oder 600 μM – exakt bestimmt werden. Weiterführend wurden alle mittels entsprechender spektraler Simulation erhaltenen A-Tensorwerte bzgl. aller gebundenen und freien Anteile der gemessenen CW-ESR-Spektren der jeweiligen TSL angegeben sowie zur abschließenden Referenzierung in Kap. 4.4 alle bestimmten Bindungsparameter nochmals komprimiert in Tab. 14 zusammengefasst. Ferner sei darauf hingewiesen, dass alle Fehler, die zur möglichst präzisen Bestimmung der einzelnen Bindungsanteile nach erfolgreicher spektraler Simulation der einzelnen experimentellen CW-ESR-Spektren beitrugen sowie durch abschließende Begutachtung der erhaltenen simulierten Spektren individuell abgeschätzt werden konnten, durch Anwendung des Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetzes berechnet wurden und bei der Erstellung der Scatchard-Plots, welche unter zur Hilfenahme von Origin 8.1 der Firma OriginLab[®] erfolgte, berücksichtigt worden sind.

4.3.1 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Analgetika

In Bezug auf Kap. 4.3 wurden in diesem Unterkapitel die in Kap. 3.2 ff. visualisierten synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) aus der Reihe der Analgetika (ASS-TSL, SAL-TSL, IBU-TSL, NPX-TSL, PCM-TSL, DCF-TSL und IMC-TSL) untersucht und ausgewertet (s. Abb. 31 ff.). Gemäß Abb. 31 belaufen sich die zunächst durch spektrale Simulation der experimentellen Spektren ermittelten und fortfolgend für alle weiteren Simulationen genutzten Hyperfeintensorwerte bzw. Hyperfeinaufspaltungen von ASS-TSL bzgl. aller gebundenen und freien spektralen Bindungsanteile auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 16.9 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 108.2 \text{ MHz}$ bzgl. der freien Anteile sowie auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 22.2 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{bound}} = 95.9 \text{ MHz}$ bzgl. aller gebundenen Anteile. Ferner handelt es sich bei den in Abb. 31 gezeigten CW-ESR-Spektren um sog. 2-Komponentenspektren (vgl. Kap. 4.1.4 und Kap. 4.1.5), d.h. um rein mizellenfreie Spektren. Zur Verdeutlichung der Simulationsgenauigkeit

sowie zur verbesserten Einsicht der Hyperfeinstrukturen bzw. des spektralen Verlaufs wurde, wie ebenfalls in Abb. 31 einzusehen, ein individuell ausgewählter Ausschnitt, hier des aufgenommenen ASS-TSL:HSA-Spektrums im Verhältnis von 1:1, stark vergrößert dargestellt.

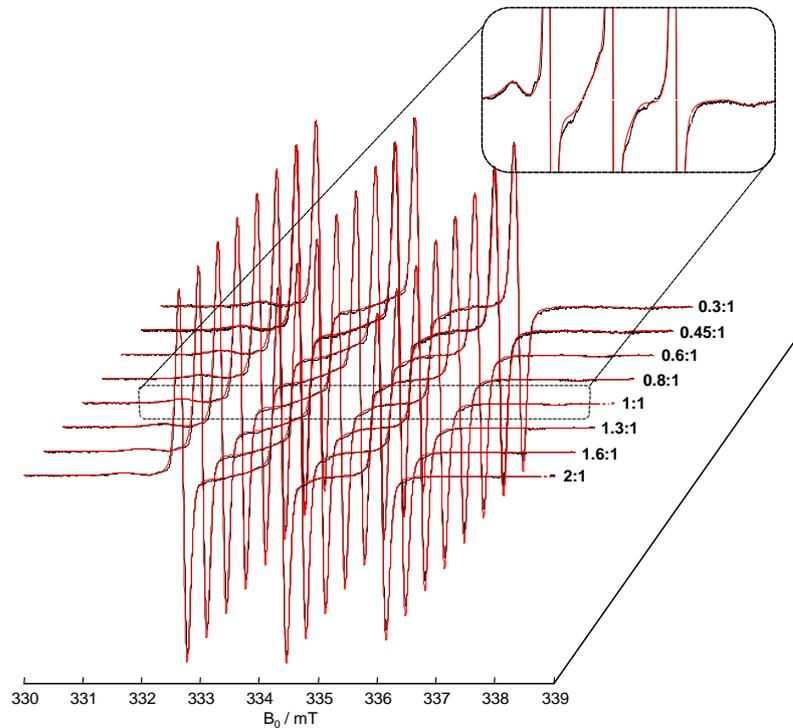


Abb. 31: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von ASS-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von ASS-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

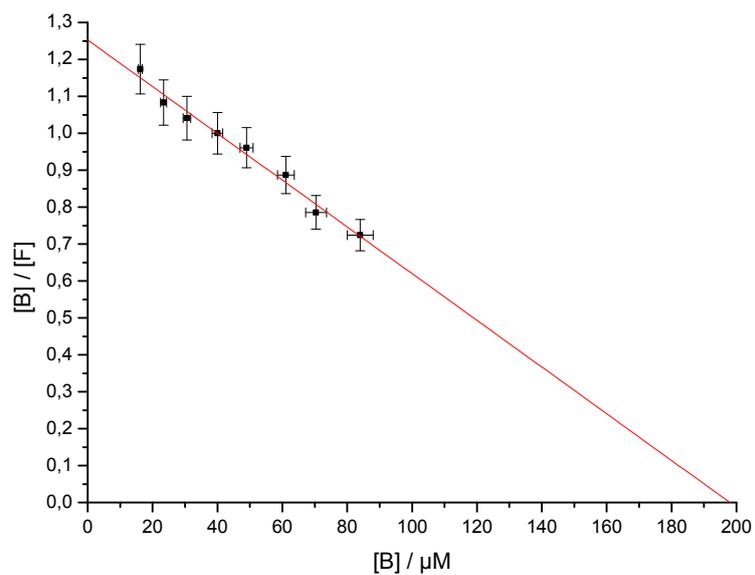


Abb. 32: Scatchard-Plot [6] von ASS-TSL

Weiterführend ließen sich durch Auswerten¹⁶ des in Abb. 32 gezeigten Scatchard-Plots eine Assoziationskonstante von $6.33 \pm 0.31 \cdot 10^3$, eine mittlere Bindungsaffinität¹⁷ von 48.6% sowie die maximale Anzahl an Bindungsstellen bestimmen, wobei verifiziert werden konnte, dass rund zwei ASS-TSL pro Protein gebunden werden. Ebenso wie in Abb. 31 wurde in Abb. 33 zur Verdeutlichung der Simulationsgenauigkeit sowie zur bestmöglichen Einsicht der Hyperfeinstrukturen bzw. des spektralen Verlaufs ein spezifisch ausgewählter Ausschnitt, hier der des gemessenen SAL-TSL:HSA-Spektrums im Verhältnis von 1:1, stark vergrößert mitabgebildet.

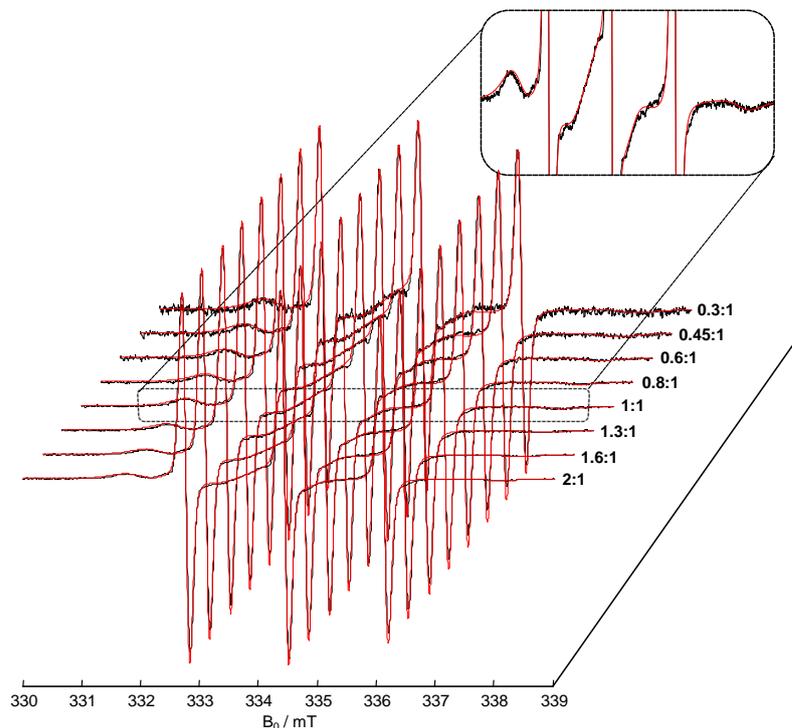


Abb. 33: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von SAL-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von SAL-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

Zudem handelt es sich bei allen experimentell aufgenommenen CW-ESR-Spektren von SAL-TSL, wie auch bei den gemessenen Spektren von ASS-TSL, um rein mizellenfreie CW-ESR-Spektren, sodass der spektrale Verlauf immer auf gleichem Niveau parallel zur x-Achse

¹⁶ Bzgl. verfahrenstechnischer Details zur Auswertung von Scatchard-Plots sei auf Kap. 4.1.1, Unterabschnitt f) verwiesen.

¹⁷ Wie in Kap. 4.1.1 unter f) nähergehend erläutert, erfolgte die Mittelung über alle gebundenen Anteile der in verschiedenen Verhältnissen (x:1) gemessenen und durch Simulation bestimmten CW-ESR-Spektren. Da es sich also bei den ff. angegebenen Bindungsaffinitäten um statistische Mittelwerte handelt, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch über alle sich in Lösung befindlichen Proteine gemittelt wurde. Bei allen angefertigten Proben wurde die Proteinkonzentration sowie die zupipettierten TSL-Anteile (x) jeweils gleichermaßen konstant gehalten. Daher sind die mittleren Bindungsaffinitäten aller durchgeführten Bindungsstudien miteinander vergleichbar.

verläuft und nicht markant am Hochfeldpeak nach unten bzw. am Zentralfeldpeak leicht nach oben verschoben ist, wie es üblicherweise bei mizellierten Spektren (vgl. bspw. Abb. 35; vergrößerter Ausschnitt des Verhältnisses 1.3:1) der Fall ist. Entsprechend der in Abb. 33 aufgeführten CW-ESR-Spektren ergaben sich die Werte der Hyperfeintensoren von SAL-TSL zu: $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.2 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 107.6 \text{ MHz}$ bzgl. der freien simulierten Bindungsanteile, als auch zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 22.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ bound}} = 95.8 \text{ MHz}$ für alle gebundenen spektralen Anteile. Fortführend konnte anhand des in Abb. 34 gezeigten Scatchard-Plots von SAL-TSL eine Assoziationskonstante von $1.48 \pm 0.07 \cdot 10^4$ sowie eine mittlere Bindungsaffinität von 66.3% ermittelt werden. Bei der Berechnung der max. Bindungsstellenanzahl manifestierte sich, dass SAL-TSL zwei Bindungsstellen pro Protein besetzt (vgl. Abb. 34). Im Gegensatz zu den SAL-TSL:HSA- bzw. ASS-TSL:HSA-Spektren handelt es sich bei allen gemessenen IBU-TSL:HSA-Spektren um mizellenbehaftete CW-ESR-Spektren, sog. 3-Komponentenspektren. Ab einem Verhältnis von 0.8:1 ist zunächst ein leicht schwacher Anstieg von 2% auf 4% zu verzeichnen, wohingegen bei einem Verhältnis von 1.3:1 die Mizellenkonzentration mit rund 38% zu Buche schlägt, was einem sagenhaften Mizellenzuwachs von 34% entspricht.

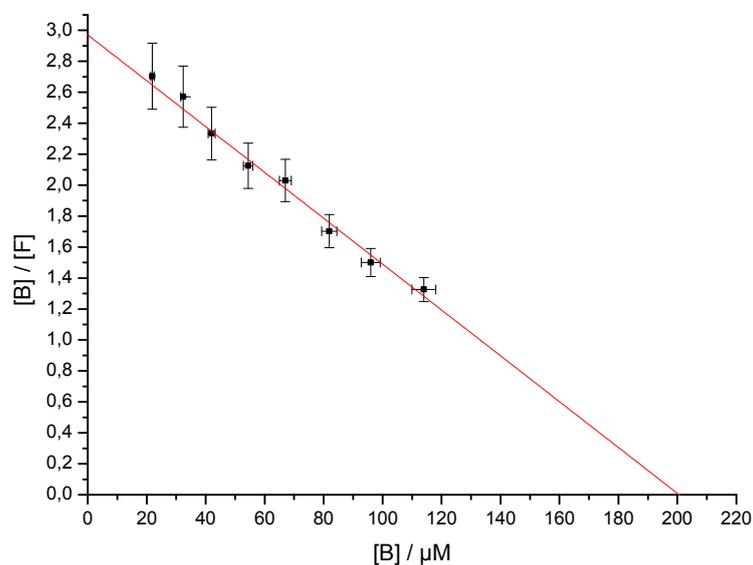


Abb. 34: Scatchard-Plot [6] von SAL-TSL

Zur Verdeutlichung dieses Phänomens wurden zwei ausgewählte spektrale Ausschnitte, hier die des gemessenen IBU-TSL:HSA-Spektren zum einen im Verhältnis von 0.3:1 mit einem

leichten Mizellenanteil von 2%, zum anderen im Verhältnis von 1.3:1, durch starke Vergrößerung gegenübergestellt (s. Abb. 35).

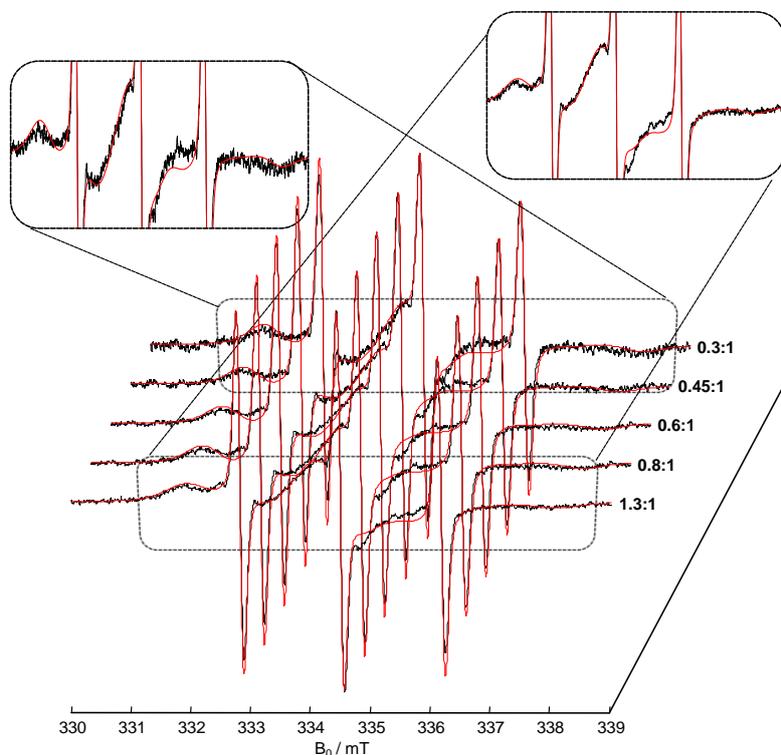


Abb. 35: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von IBU-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von IBU-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μ M.

Weiterhin konnten im Hinblick auf die in Abb. 35 durch entsprechende Simulation folgende Hyperfeintensorwerte für die gemessenen IBU-TSL:HSA-Spektren erhalten werden: $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.5$ MHz und $A_{zz, \text{free}} = 107.0$ MHz bzgl. der freien Bindungsanteile, sowie $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 23.8$ MHz und $A_{zz, \text{bound}} = 92.9$ MHz bzgl. aller gebundenen Bindungsanteile. Durch Auswertung des in Abb. 36 graphisch visualisierten Scatchard-Plots ließen sich die Assoziationskonstante von IBU-TSL zu $2.90 \pm 0.03 \cdot 10^4$ sowie die zugehörige mittlere Bindungsaffinität zu 73.9% bestimmen. Anhand näherer Begutachtung des Abszissen-schnittpunktes bzgl. des Scatchard-Plots von IBU-TSL kann leicht nachvollzogen werden, dass rund zwei IBU-TSL pro Protein gebunden werden. Mittels durchgeführter spektraler Simulationen der aufgenommenen CW-ESR-Spektren von NPX-TSL (s. Abb. 37) ließ sich feststellen, dass einige der experimentell gemessenen Spektren ebenfalls mizellenbehaftet waren. Allerdings setzt die Mizellenbildung, welche mit rund 2% noch relativ schwach ausfällt, gegenüber den gemessenen CW-ESR-Spektren von IBU-TSL, welche alle mizellen-

behaftet sind, erst ab einem Verhältnis von 0.8:1 ein. Dennoch steigt bereits bei dem nächst gemessenem Verhältnis von 1.3:1 die Mizellenkonzentration auf 27% an.

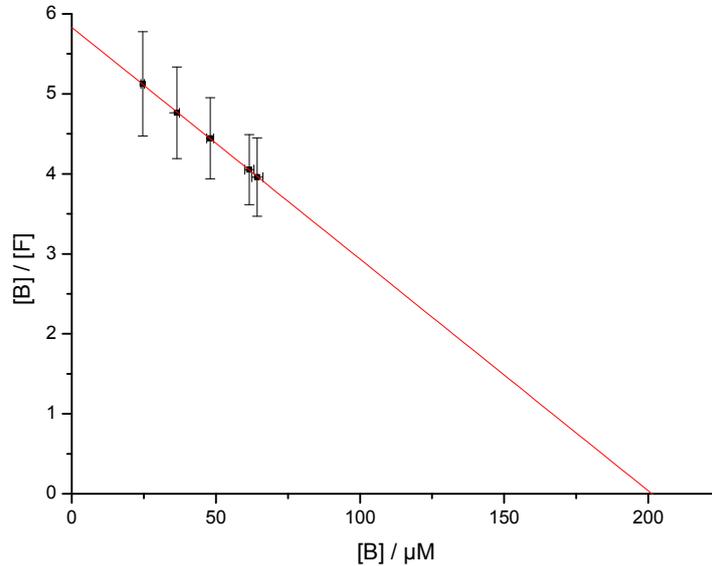


Abb. 36: Scatchard-Plot [6] von IBU-TSL

Folglich handelt es sich bei den experimentell gemessenen NPX-TSL:HSA-Spektren sowohl um 2- als auch um 3-Komponentenspektren. Zur Verdeutlichung dieses Effekts sowie zur Darbietung der Simulationsgenauigkeit wurden wiederum zwei individuell ausgewählte spektrale Ausschnitte, zum einen ein Ausschnitt eines nicht mizellenbehafteten Spektrums, hier im Verhältnis 0.3:1, zum anderen ein entsprechend gewählter Ausschnitt eines stärker mizellierten Spektrums, hier im Verhältnis 1.3:1, ebenfalls in Abb. 37 stark vergrößert mit dargestellt. Die durch Simulation bestimmten und für weitere Simulationen der CW-ESR-Spektren von NPX-TSL verwendeten Hyperfeinaufspaltungen der freien und gebundenen spektralen Anteile belaufen sich auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.4 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.2 \text{ MHz}$ bzgl. der freien Bindungsanteile, sowie auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 23.9 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{bound}} = 92.7 \text{ MHz}$ bzgl. aller gebundenen Bindungsanteile. Durch Auswerten des in Abb. 38 visualisierten Scatchard-Plots von NPX-TSL konnte somit eine Assoziationskonstante von $2.17 \pm 0.17 \cdot 10^4$ sowie eine charakteristische mittlere Bindungsaffinität von 72.2% ermittelt werden. Anhand des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von NPX-TSL wird deutlich, dass rund zwei NPX-TSL pro Protein gebunden werden. Gegenteilig zu den NPX-TSL:HSA-Spektren sind die aufgenommenen CW-ESR-Spektren von PCM-TSL, welche in Abb. 39 einzusehen sind, absolut mizellenfrei.

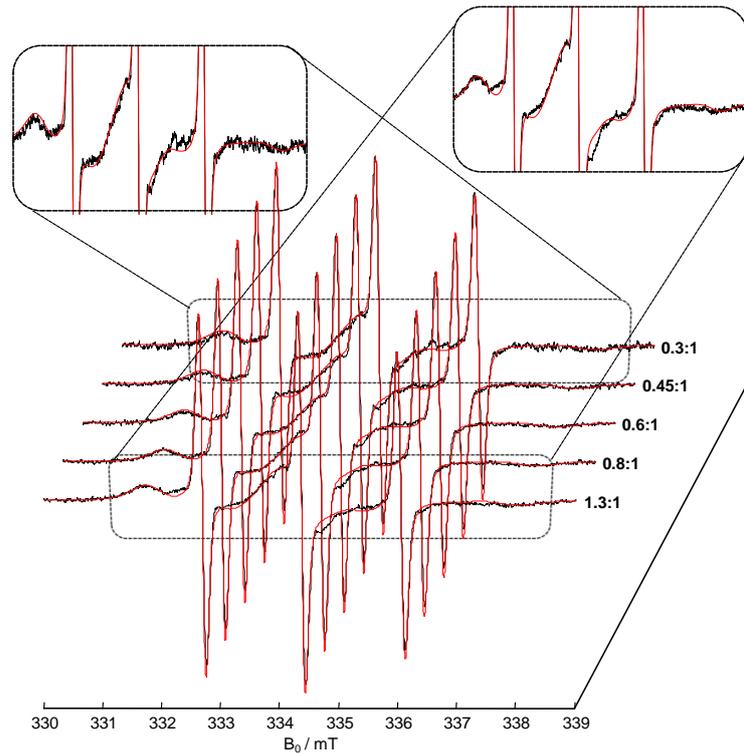


Abb. 37: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von NPX-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von NPX-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

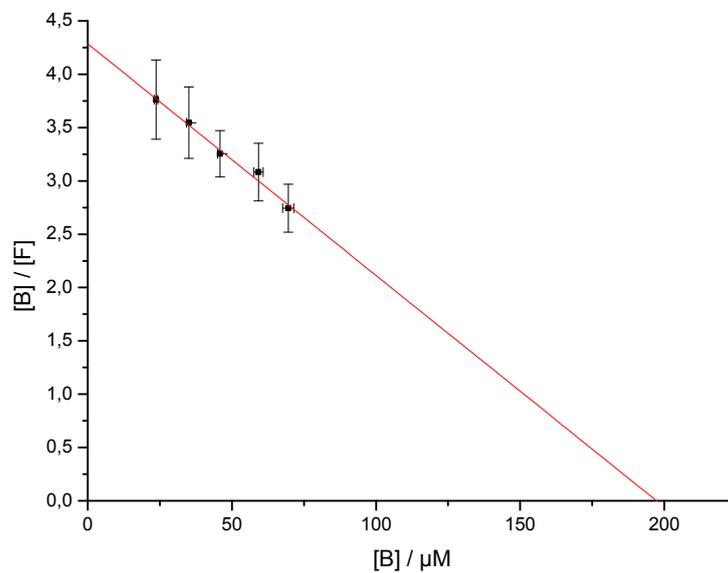


Abb. 38: Scatchard-Plot [6] von NPX-TSL

Es handelt sich also ausschließlich um 2-Komponentenspektren, wobei die durch spektrale Simulation bestimmten Hyperfeintensoren folgende Werte annahmen: $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.4$

MHz und $A_{zz, \text{free}} = 108.5$ MHz bzgl. aller freien Bindungsanteile, sowie $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 24.3$ MHz und $A_{zz, \text{bound}} = 93.0$ MHz bzgl. aller gebundenen Bindungsanteile.

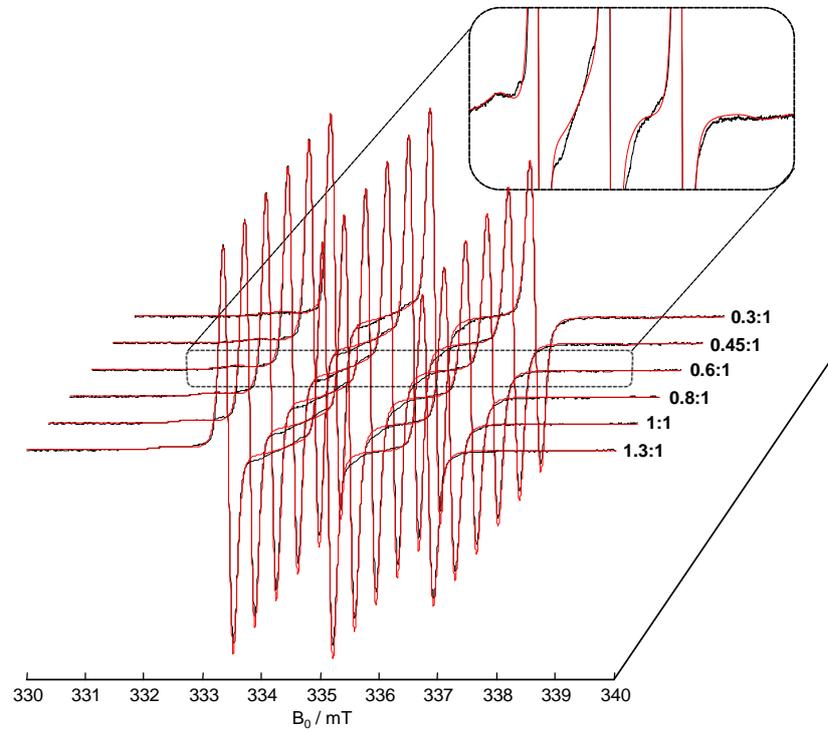


Abb. 39: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von PCM-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von PCM-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $600 \mu\text{M}$.

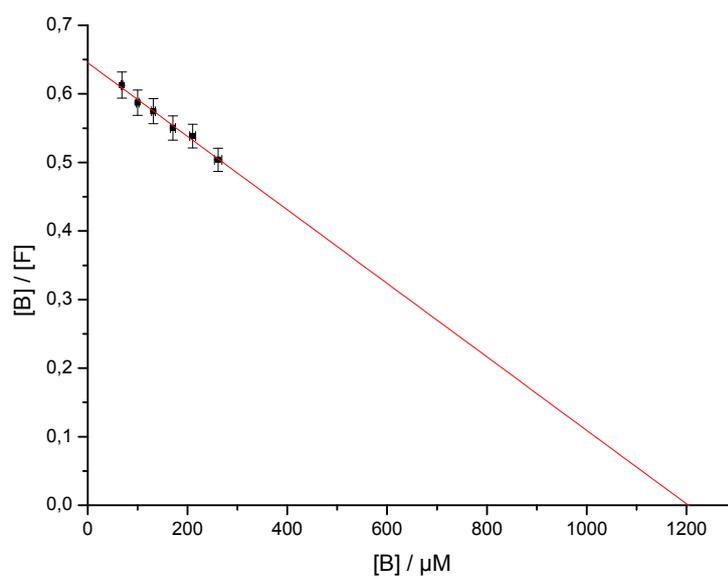


Abb. 40: Scatchard-Plot [6] von PCM-TSL

Anbei wurde wiederum vor allem zur Verdeutlichung der Simulationsgenauigkeit des gemessenen CW-ESR-Spektrums von PCM-TSL im Verhältnis von 0.6:1 durch starke Vergrößerung eines selektiv ausgewählten Ausschnitts des Gesamtspektrums mit abgebildet. Nachfolgend konnte durch des in Abb. 40 dargestellten Scatchard-Plots von PCM-TSL eine Assoziationskonstante von $5.36 \pm 0.29 \cdot 10^2$ sowie eine charakteristische mittlere Bindungsaffinität von 35.9% ermittelt werden. Anhand des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von NPX-TSL wird wiederum ersichtlich, dass rund zwei PCM-TSL pro Protein gebunden werden. Hinsichtlich der aufgenommenen CW-ESR-Spektren von DCF-TSL (s. Abb. 41) sowie von IMC-TSL (s. Abb. 44) kann festgehalten werden, dass es sich bei den Spektren von DCF-TSL um reine 3-Komponentenspektren, wobei es sich bei den gemessenen Spektren von IMC-TSL zunächst bis zu einem Verhältnis von 0.8:1 um sog. 2-Komponentenspektren, d.h. mizellenfreie Spektren, handelt. Dennoch unterscheiden sich die 3-Komponenten beider Analgetika in ihrer Mizellenkonzentration gravierend.

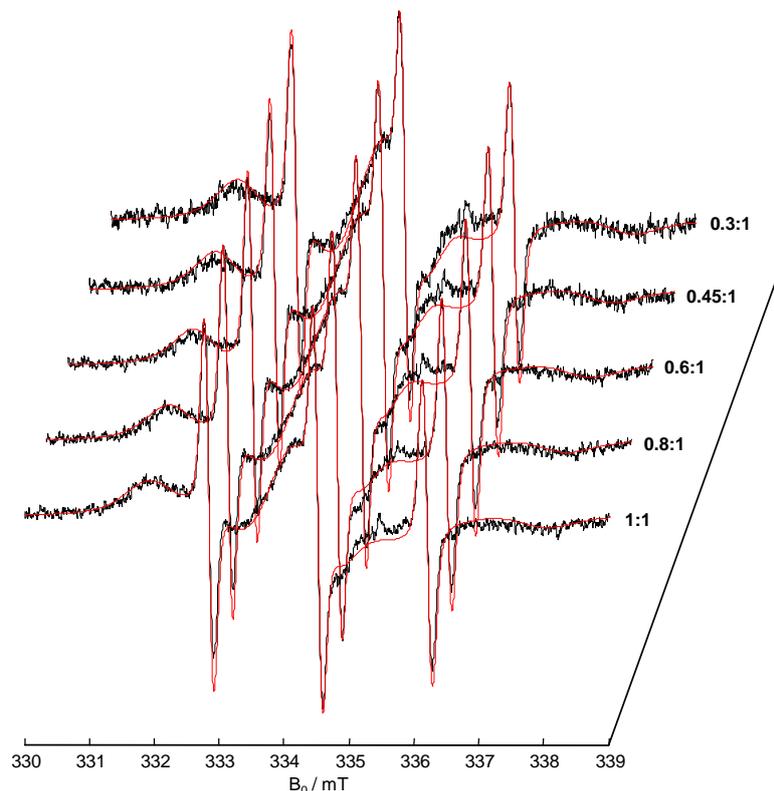


Abb. 41: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von DCF-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von DCF-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μ M.

Wohingegen bei den CW-ESR-Spektren von DCF-TSL ausgehend des Verhältnisses von 0.3:1 bis hin zu einem Verhältnis von 1:1 ein Mizellenanstieg von insgesamt 17% zu

verzeichnen ist, schlägt der Micellenzuwachs bzgl. der aufgenommenen Spektren von IMC-TSL ab einem Verhältnis von 0.8:1 vorerst mit rund 22% zu Buche und steigt bereits bei einem Verhältnis von 1:1 um 13% weiter an, sodass bei diesem Verhältnis eine Gesamt Mizellenkonzentration von rund 35% datiert wurde. Bei DCF-TSL:HSA-Spektrum im Verhältnis von 1:1 beläuft sich die endständige Mizellenkonzentration gerademal auf 23%. Die durch spektrale Simulation der DCF-TSL:HSA-Spektren (s. Abb. 41) spezifisch ermittelten Hyperfeintensoren besitzen folgende Werte: Für die freien Bindungsanteile belaufen sich die Werte der Hyperfeintensoren auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.5 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.0 \text{ MHz}$, bzgl. aller gebundenen Anteile auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 23.4 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{bound}} = 93.4 \text{ MHz}$. Hingegen belaufen sich die entsprechenden Hyperfeintensorwerte bzgl. der aufgenommenen CW-ESR-Spektren von IMC-TSL (s. Abb. 44) auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.4 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.2 \text{ MHz}$ gemäß aller freien Bindungsanteile, sowie auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 23.7 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{bound}} = 92.6 \text{ MHz}$ bzgl. aller gebundenen Bindungsanteile.

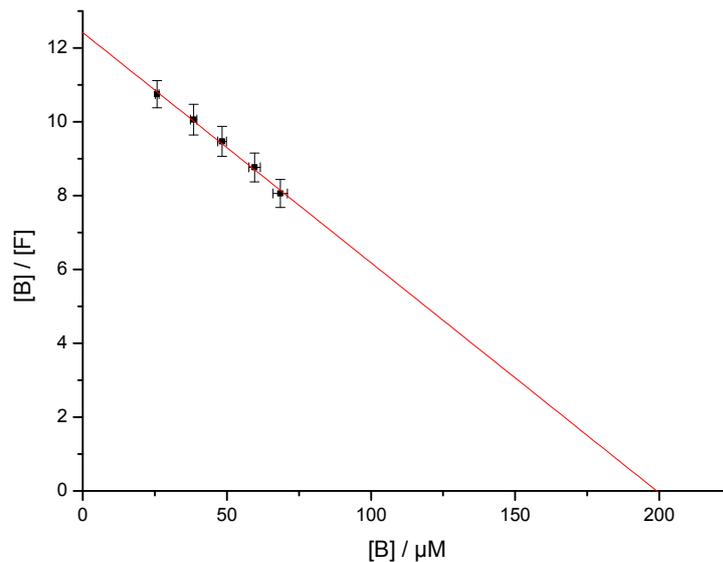


Abb. 42: Scatchard-Plot [6] von DCF-TSL

Gemäß des in Abb. 42 dargestellten Scatchard-Plots von DCF-TSL ließ sich eine Assoziationskonstante von $6.24 \pm 0.24 \cdot 10^4$ sowie eine zugehörige repräsentative mittlere Bindungsaffinität von 79.0% bestimmen. Durch Ablesen des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von DCF-TSL wird manifest, dass rund zwei DCF-TSL pro Protein aufgenommen werden können.

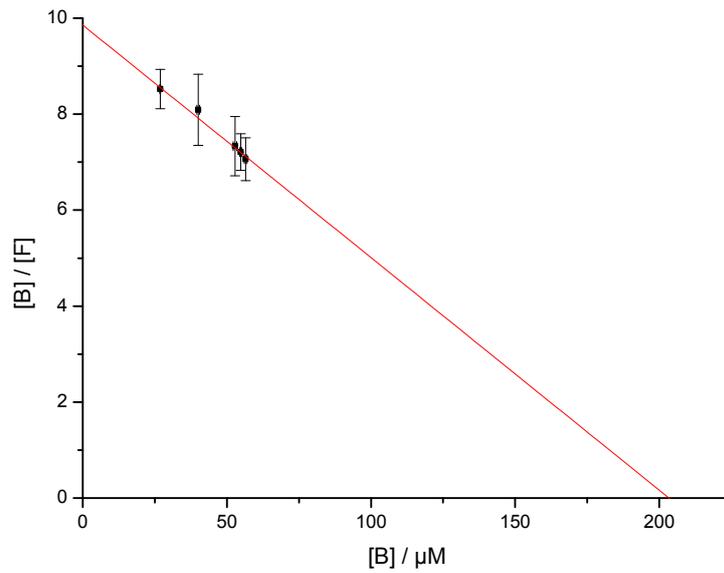
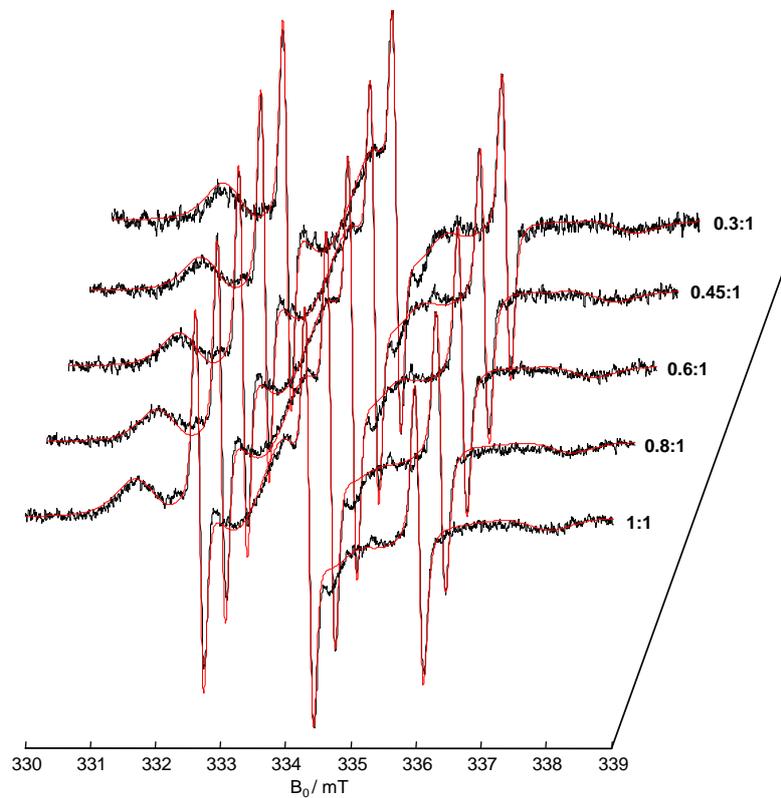


Abb. 43: Scatchard-Plot [6] von IMC-TSL

Abb. 44: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von IMC-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von IMC-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $100 \mu\text{M}$.

Durch nähere Betrachtung des in Abb. 43 aufgezeigten Scatchard-Plots von IMC-TSL ließ sich hingegen eine Assoziationskonstante von $4.85 \pm 0.28 \cdot 10^4$ sowie eine beigeordnete, ebenfalls repräsentative mittlere Bindungsaffinität von 78.3% bestimmen. Durch Ablesen des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von IMC-TSL kann wiederum leicht nachvollzogen werden, dass rund zwei Bindungsstellen eines HSA-Moleküls durch zwei IMC-TSL besetzt werden.

4.3.2 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Antikoagulantien

Wie in Kap. 4.3 bereits tiefergehend erläutert, wurden in diesem Unterkapitel die in Kap. 3.3 ff. aufgezeigten synthetisierten TEMPO Spin-Label (TSL) aus der Reihe der Antikoagulantien (PPC-TSL, WFR-TSL und CCS-TSL) untersucht und ausgewertet (s. Abb. 45 ff.). In Bezug auf Abb. 45 ließen sich die Hyperfeinaufspaltungen bzgl. aller freien und gebundenen Bindungsanteile durch spektrale Simulation der mizellenfreien 2-Komponentenspektren von PPC-TSL wie folgt bestimmen zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 109.2 \text{ MHz}$ gemäß aller freien Anteile, sowie zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 22.7 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ bound}} = 96.3 \text{ MHz}$ entsprechend aller gebundenen spektralen Anteile.

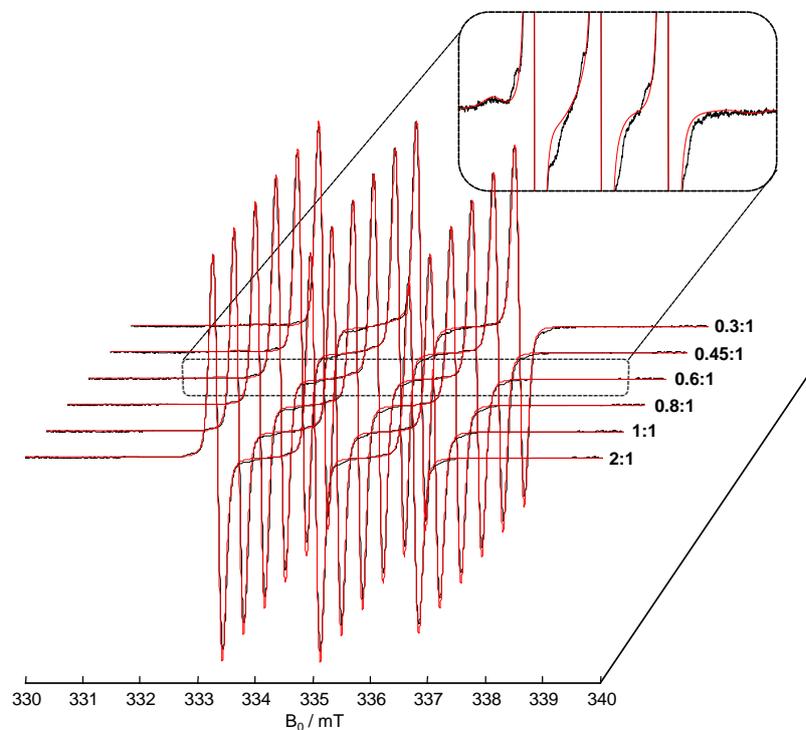


Abb. 45: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von PPC-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von PPC-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $600 \mu\text{M}$.

Fortsetzend konnte anhand des in Abb. 46 gezeigten Scatchard-Plots von PPC-TSL eine beachtliche Assoziationskonstante von $8.04 \pm 0.57 \cdot 10^3$ sowie eine mittlere Bindungsaffinität von glatt 17.0% durch entsprechendes Auswerten der vorliegenden Regressionsgeraden ermittelt werden. Durch Ablesen des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von PPC-TSL wird ersichtlich, dass gewissermaßen eine einzige Bindungsstelle pro HSA-Molekül durch PPC-TSL blockiert wird.

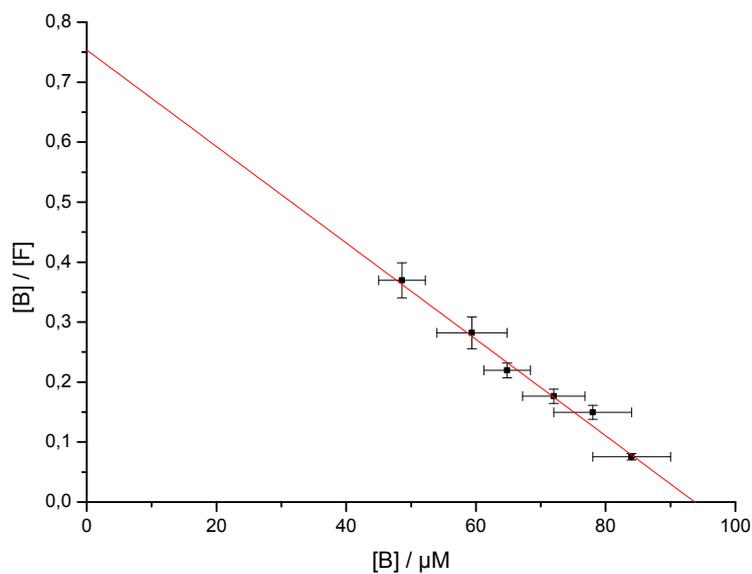


Abb. 46: Scatchard-Plot [6] von PPC-TSL

Konträr zu den aufgenommenen CW-ESR-Spektren von PPC-TSL sind die gemessenen WFR-TSL:HSA-Spektren ab einem Verhältnis von 0.6:1 durchgehend mizellenbehaftet. Aufgrund dessen wurden sowohl zur Illustration der Simulationsgenauigkeit als auch zur Verdeutlichung des Unterschieds zwischen mizelliertem und mizellenfreiem Spektrum, wie in Abb. 47 eingesehen werden kann, die spektralen Ausschnitte der Verhältnisse von 0.45:1 und 0.8:1 in stark vergrößerter Form zusätzlich veranschaulicht. Der Mizellenzuwachs ausgehend des Verhältnisses von 0.6:1 bis hin zu dem Verhältnis von 1.3:1 beträgt hierbei rund 41% und ist somit vergleichsweise gegenüber den anderen untersuchten TEMPO-Estern überdurchschnittlich hoch. Bezüglich Abb. 47 beliefen sich die Hyperfeintensorwerte aller freien und gebundenen Bindungsanteile der überwiegend auftretenden 3-Komponentenspektren von WFR-TSL mit Ausnahme des am niedrigsten verhältnismäßig konzentrierten Spektrums im Verhältnis von 0.3:1 auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 108.3 \text{ MHz}$ entsprechend

aller freien Bindungsanteile, sowie auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 23.2$ MHz und $A_{zz, \text{bound}} = 94.4$ MHz bzgl. aller gebundenen spektralen Anteile.

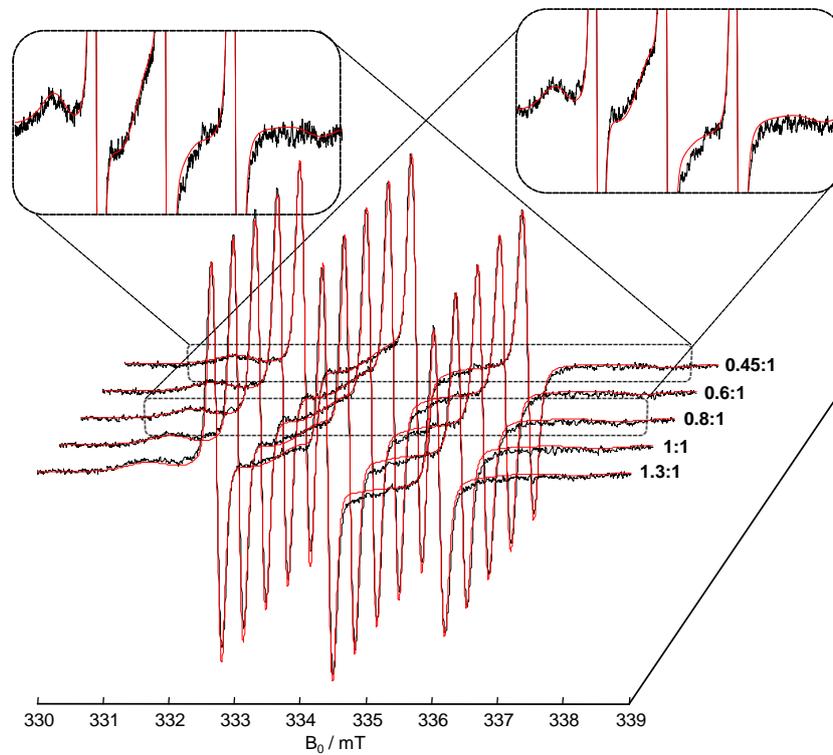


Abb. 47: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von WFR-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von WFR-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

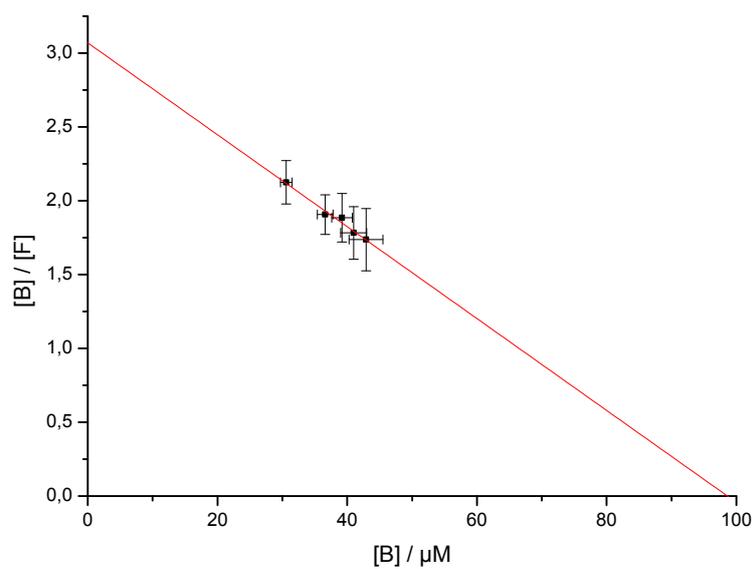


Abb. 48: Scatchard-Plot [6] von WFR-TSL

Durch Auswerten des in Abb. 48 aufgezeigten Scatchard-Plots von WFR-TSL konnte eine Assoziationskonstante von $3.11 \pm 0.29 \cdot 10^4$ sowie eine mittlere Bindungsaffinität von 50.4% bestimmt werden. Durch Ablesen des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von WFR-TSL wird erneut deutlich, dass letztlich ein WFR-TSL pro HSA-Molekül gebunden wird.

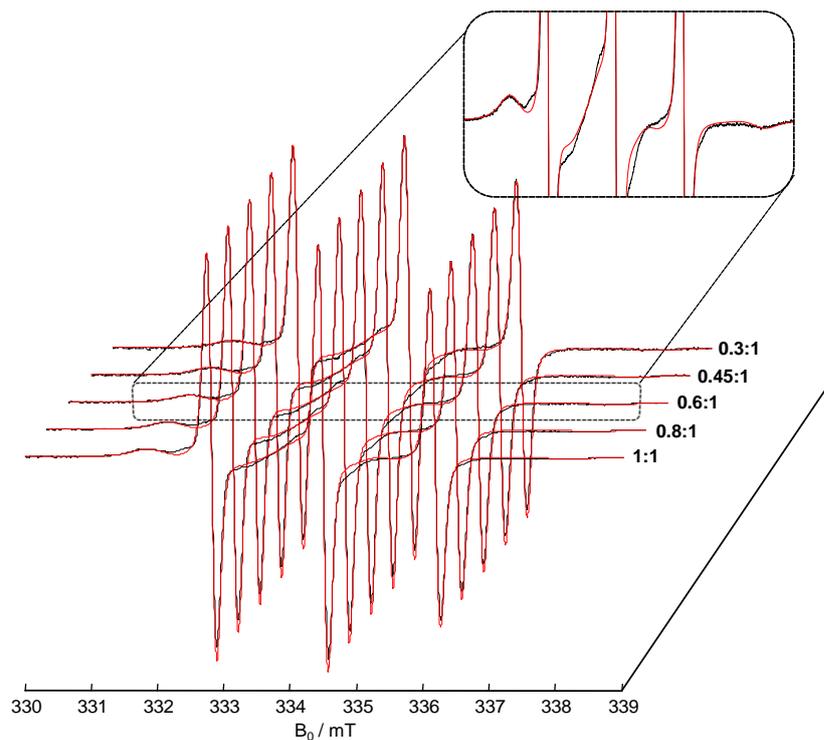


Abb. 49: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von CCS-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von CCS-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $600 \mu\text{M}$.

Gegenüber den gemessenen WFR-TSL:HSA-Spektren sind die in Abb. 49 aufgeführten CW-ESR-Spektren von CCS-TSL ausnahmslos, wenn auch nur vergleichsweise leicht, mizelliert. Der Mizellenanteil beläuft sich bei allen aufgenommenen CCS-TSL:HSA-Spektren auf glatt 2%, wobei erneut zur Verdeutlichung der Simulationsgenauigkeit ein spezifisch ausgewählter spektraler Ausschnitt, hier das experimentelle CW-ESR-Spektrum von CCS-TSL im Verhältnis von 0.6:1, stark vergrößert in Abb. 49 ebenfalls verbildlicht wurde. Durch Auswertung des in Abb. 50 visualisierten Scatchard-Plots von CCS-TSL konnte eine relativ schwache Assoziationskonstante von $8.42 \pm 0.38 \cdot 10^2$ sowie eine mittlere Bindungsaffinität von 55.8% ermittelt werden. Durch Beugung des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von CCS-TSL lässt sich leicht eruieren, dass insgesamt drei Bindungsstellen eines einzigen HSA-Moleküls durch CCS-TSL besetzt werden.

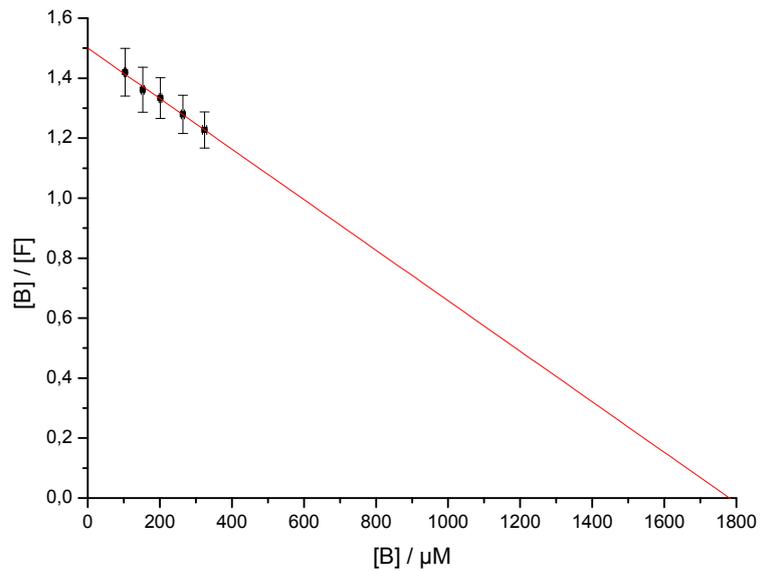
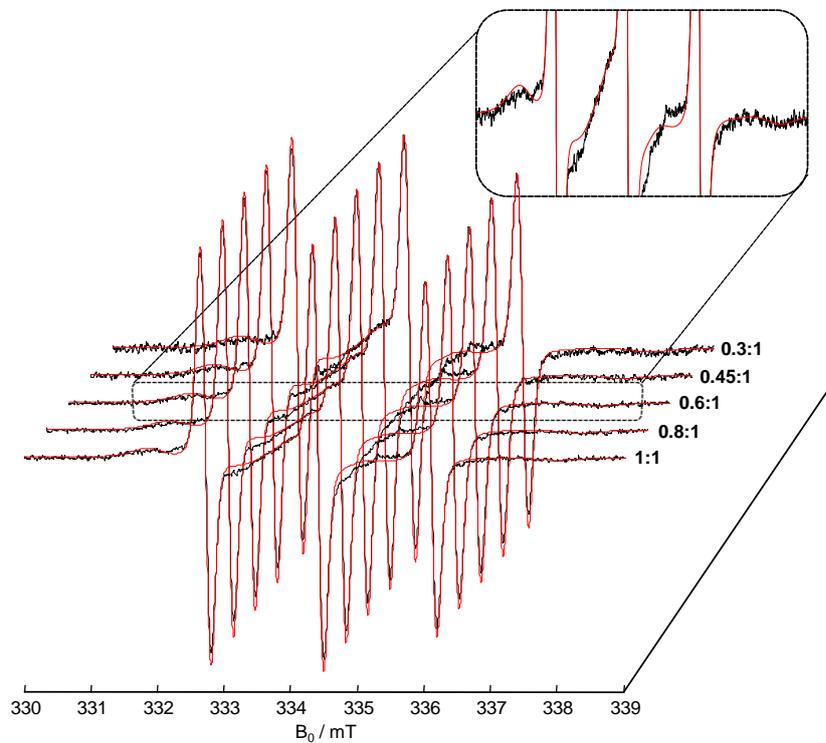


Abb. 50: Scatchard-Plot [6] von CCS-TSL

4.3.3 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Narkotika

Abb. 51: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von PPF-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von PPF-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

Wie in den beiden Unterkapitel zuvor, wurde bzgl. Kap 4.3 in diesem Unterkapitel das in Kap. 3.4 dargestellte synthetisierte TEMPO Spin-Label (TSL) aus der Reihe der Narkotika (PPF-TSL) untersucht und ausgewertet (s. Abb. 51 ff.). Gemäß Abb. 51 stellte sich durch entsprechende Simulation der aufgenommenen CW-ESR-Spektren von PPF-TSL heraus, dass es sich bei den PPF-TSL:HSA-Spektren um rein mizellenbehaftete Spektren mit einem Mizellenanteil von jeweils rund 8% handelt. Die Werte der Hyperfeintensoren der freien und gebundenen Bindungsanteile ergaben sich dabei zu $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.5 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.6 \text{ MHz}$ bzgl. aller freien Bindungsanteile, und zu $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 24.3 \text{ MHz}$ sowie $A_{zz, \text{bound}} = 92.5 \text{ MHz}$ entsprechend aller gebundenen Anteile.

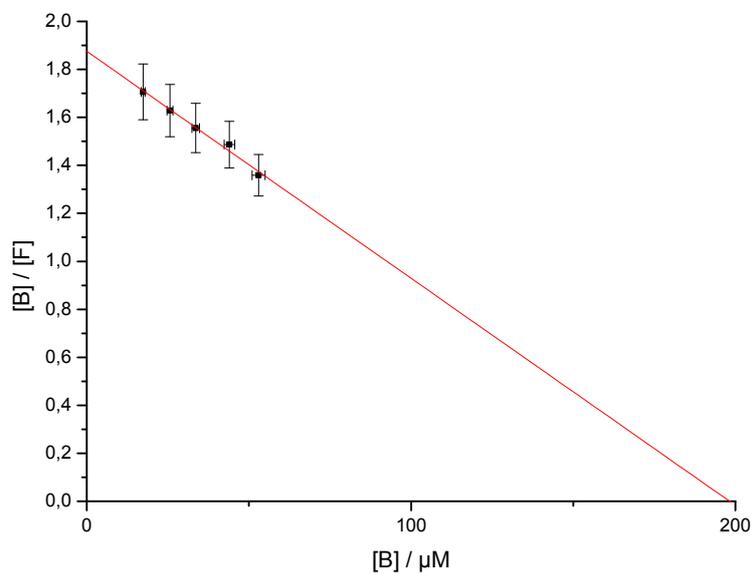


Abb. 52: Scatchard-Plot [6] von PPF-TSL

Ferner ließ sich durch nähere Betrachtung des in Abb. 52 aufgezeigten Scatchard-Plots von PPF-TSL eine Assoziationskonstante von $9.46 \pm 0.69 \cdot 10^3$ sowie eine beigeordnete charakteristische mittlere Bindungsaffinität von 55.8% bestimmen. Durch Bestimmung des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von PPF-TSL lässt sich diagnostizieren, dass rund zwei Bindungsstellen pro HSA-Molekül durch PPF-TSL blockiert werden.

4.3.4 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Urikostatika

Hinsichtlich dieses Unterkapitels sei darauf hingewiesen, dass keine Konzentrationsreihe bzgl. unterschiedlich gewählter Verhältnisse zwischen dem in Kap. 3.5 abgebildeten

synthetisierten TEMPO Spin-Labels von Febuxostat (FBS-TSL) aus der Reihe der Urikostatika und HSA von x:1 vermessen werden konnte. Der Grund hierfür liegt darin, dass die zuvor getätigten Messungen zur Bestimmung einer möglichst niedrigen Mizellkonzentration (sog. kritischen Mizellkonzentration), wie hier bspw. anhand des in Abb. 53 dargestellten CW-ESR-Spektrums, welches bei einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM vermessen wurde, nachvollzogen werden kann, wenig erfolgversprechend waren. Eine Bestimmung der wie in dem Kap. 4.3 ff. zuvor beschriebenen Bindungsparameter mittels der Scatchard-Methode konnte daher ebenfalls nicht vollzogen werden.

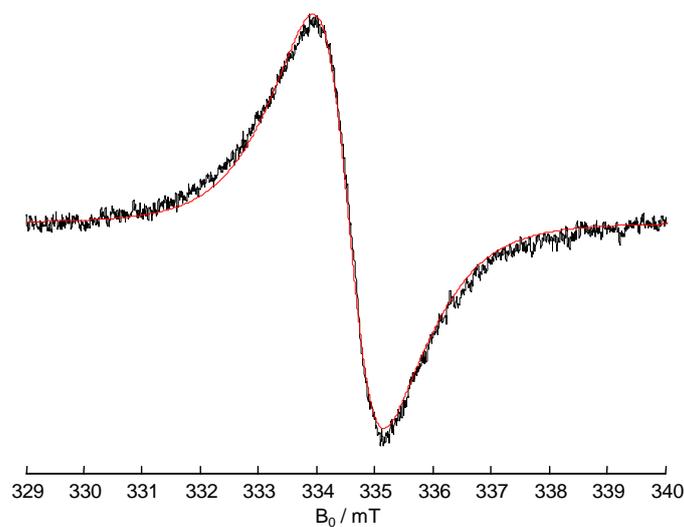


Abb. 53: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von FBS-TSL bei einem Verhältnis von FBS-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM .

Weiterhin wurde anhand der durchgeführten spektralen Simulation gemäß Abb. 53 deutlich, dass das experimentell gemessene CW-ESR-Spektrum von FBS-TSL einen rein mizellierten Anteil von exakt 100 % aufweist. Die sich aus der Simulation ebenfalls ergebende effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz beläuft sich auf einen Wert von $\omega_{\text{ex}} = 57 \text{ MHz}$, was durch eine verstärkte Verbreiterung des Zentralfeldpeaks zum Ausdruck kommt. Bezüglich des Zustandekommens des sog. Heisenberg Austausches sei an dieser Stelle auf Kap. 2 ff. verwiesen. Da, wie in Kap. 4.2.3 gezeigt werden konnte, in wässriger Lösungsumgebung auch geringfügig lösliche TEMPO Spin-Label als auch gemäß Literatur [8, 9] praktisch unlösliche endogene Substanzen durch HSA aufgenommen werden können, liegt es nahe, da die Löslichkeit von FBS-TSL ohne HSA-Beteiligung in wässrigem LM-Umfeld ähnlich wie die von PPF-TSL war, dass FBS-TSL von HSA vermutlich nicht gebunden wird. Allerdings sollte diese Hypothese durch weitere Referenzmessungen u.U. durch Zusatz von

geeigneten Mizellenhemmern, vielleicht sogar auf Basis eines ganz anderen Konzeptes eindringlich überprüft werden.

4.3.5 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Urikosurika

In Hinblick auf das folgende Unterkapitel sollte im Vorhinein festgehalten werden, dass bzgl. des in Kap. 3.6 gezeigten synthetisierten TEMPO Spin-Labels von Probenecid (PBC-TSL) aus der Reihe der Urikosurika, ebenfalls, wie im Kap. 4.3.6 zuvor, keine Konzentrationsreihe in den Verhältnissen x:1 zur Durchführung von HSA-Bindungsstudien aufgrund des Auftretens ausschließlich freier und mizellierter Bindungsanteile (vgl. Abb. 54) aufgenommen werden konnte. Hingegen konnte in Anlehnung an Kap. 4.3 das in Kap. 3.6 ebenfalls dargestellte synthetisierte TEMPO Spin-Label von Benzbromaron (BBR-TSL) einer HSA-Bindungsstudie unterzogen sowie daran anschließend die resultierenden CW-ESR-Spektren (s. Abb. 55) mittels der Scatchard-Methode ausgewertet werden (s. Abb. 56). Entsprechend der durchgeführten spektralen Simulation bzgl. Abb. 54 ergab sich, dass sich das experimentell gemessene CW-ESR-Spektrum von PBC-TSL aus einem mizellierten spektralen Anteil mit rund $(85 \pm 5)\%$ und aus einem freien Anteil, hier $(15 \pm 5)\%$, zusammensetzt. Die sich ebenfalls aus der Simulation ergebende effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz beläuft sich auf einen Wert von $\omega_{\text{ex}} = 45$ MHz.

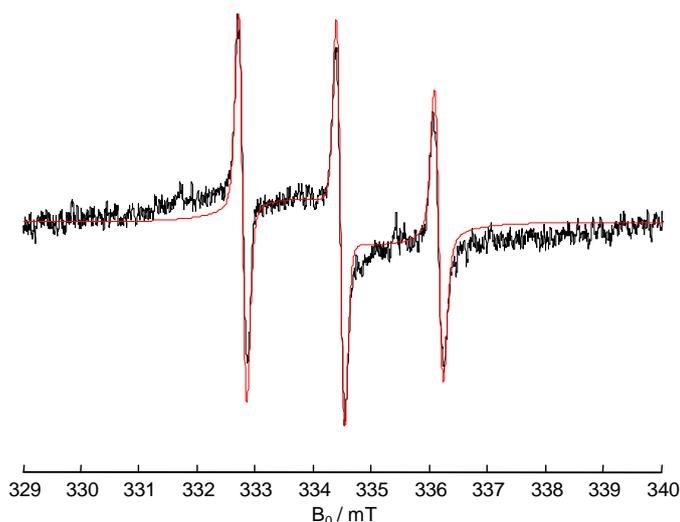


Abb. 54: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von PBC-TSL bei einem Verhältnis von PBC-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $100 \mu\text{M}$.

Ferner konnten gemäß Abb. 54 folgende Hyperfeintensorwerte bzgl. der freien spektralen Anteile durch entsprechende Simulation ermittelt werden zu $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.5 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 107.5 \text{ MHz}$.

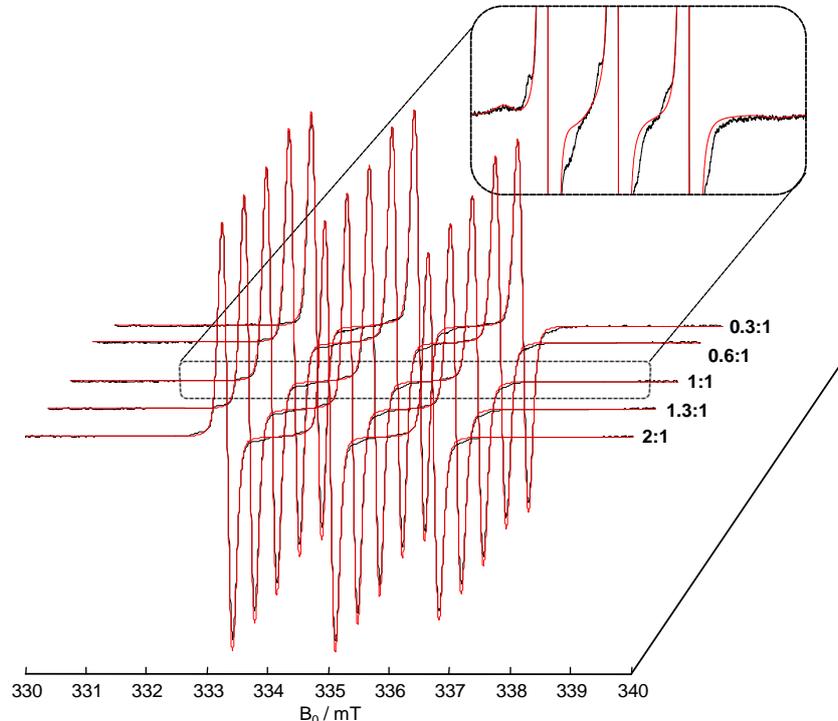


Abb. 55: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von BBR-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von BBR-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 600 μM.

Gegensätzlich zu dem in Abb. 37 gezeigten CW-ESR-Spektrum von PBC-TSL sind die experimentell gemessenen BBR-TSL:HSA-Spektren (s. Abb. 55) durchgängig mizellenfrei. Die gleichwohl durch entsprechende spektrale Simulation in EasySpin [1] bestimmten Werte der Hyperfeintensoren bzgl. der freien und gebundenen Bindungsanteile von BBR-TSL beliefen sich dabei auf $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{free}} = 108.9 \text{ MHz}$ gemäß aller freien Bindungsanteile, sowie auf $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 22.5 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{bound}} = 96.5 \text{ MHz}$ bzgl. aller gebundenen Anteile. Weiterführend ließ sich durch nähere Betrachtung des in Abb. 56 gezeigten Scatchard-Plots von BBR-TSL eine Assoziationskonstante von $1.96 \pm 0.29 \cdot 10^2$ sowie eine beigeordnete mittlere Bindungsaffinität von 9.8% ermitteln. Durch Ermittlung des Schnittpunktes mit der x-Achse des Scatchard-Plots von BBR-TSL manifestierte sich, dass ein BBR-TSL von einem Albumin gebunden wird.

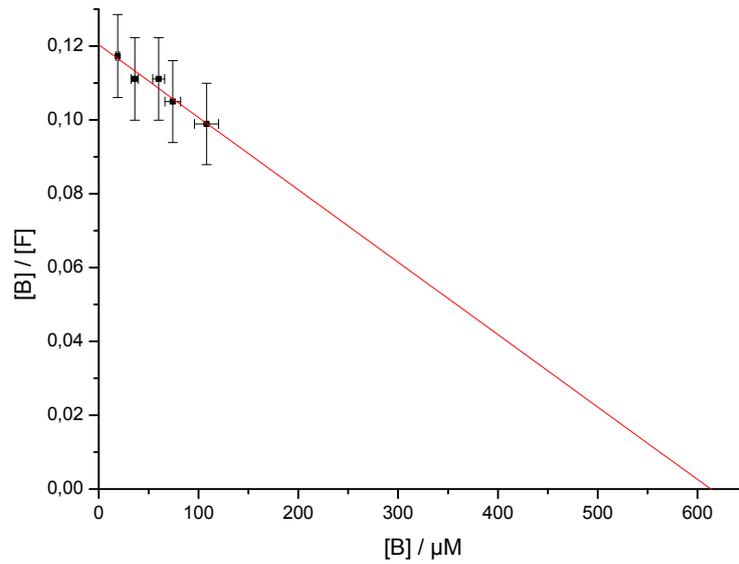
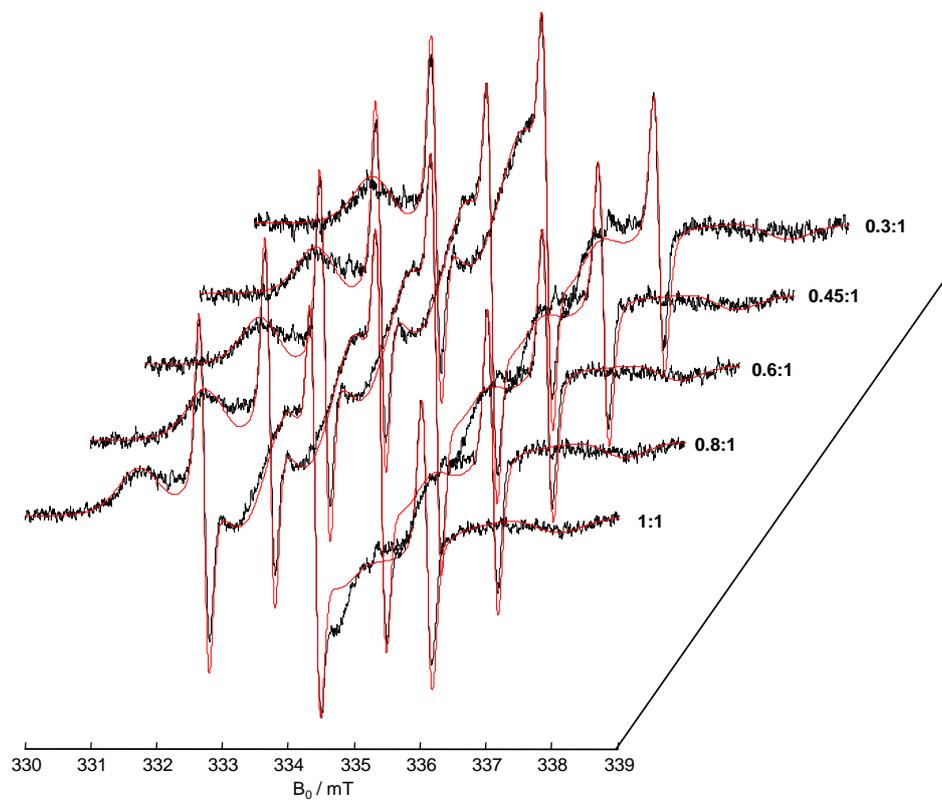


Abb. 56: Scatchard-Plot [6] von BBR-TSL

4.3.6 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Zytostatika

Abb. 57: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von CBL-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von CBL-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

Wie in nahezu allen Unterkapiteln zuvor näher erläutert, wurde auch in diesem Unterkapitel gemäß Kap. 4.3 das in Kap. 3.7 ff. aufgezeigte synthetisierte TEMPO Spin-Label von Chlorambucil (CBL-TSL) aus der Reihe der Zytostatika untersucht und ausgewertet (s. Abb. 57 ff.). Bei den in Abb. 40 aufgeführten CW-ESR-Spektren von CBL-TSL handelt es sich um reine 3-Komponentenspektren. Die Mizellenkonzentration nimmt ausgehend des Verhältnisses von 0.3:1 mit einem Mizellenanteil von rund 6% bis hin zu dem Verhältnis von 1:1, wobei sich der Mizellenanteil hierbei auf 44% beläuft, stetig zu. Der Mizellenzuwachs innerhalb der hier verwendeten Konzentrationsreihe ergibt sich somit zu 38%. Für die Hyperfeintensorwerte ergaben sich bzgl. Abb. 57 folgende Werte zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 107.9 \text{ MHz}$ bzgl. aller freien Bindungsanteile, sowie zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 24.2 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ bound}} = 92.7 \text{ MHz}$ entsprechend aller gebundenen Bindungsanteile.

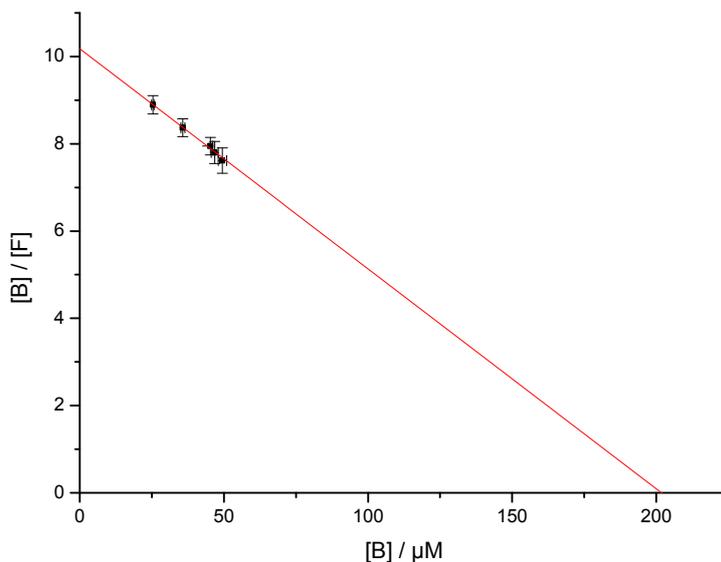


Abb. 58: Scatchard-Plot [6] von CBL-TSL

Ferner konnte durch nähere Begutachtung des in Abb. 58 dargestellten Scatchard-Plots von CBL-TSL eine Assoziationskonstante von $5.05 \pm 0.24 \cdot 10^4$ sowie eine beigeordnete charakteristische mittlere Bindungsaffinität von 69.5% bestimmt werden. Durch Ablesen des Schnittpunktes an der x-Achse des Scatchard-Plots von CBL-TSL kann leicht nachvollzogen werden, dass CBL-TSL zwei Bindungsstellen pro HSA-Molekül besetzt.

4.3.7 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Steroidhormone

In Anlehnung an Kap. 4.3.5 sollte ebenso in diesem Unterkapitel darauf hingewiesen werden, dass bzgl. des in Kap. 3.8 illustrierten synthetisierten TEMPO Spin-Labels von Cholesterin (CSO-TSL) keine Konzentrationsreihe in den Verhältnissen $x:1$ zur Durchführung von HSA-Bindungsstudien aufgrund einer äußerst stark auftretenden Mizellenbildung (vgl. Abb. 59) aufgenommen werden konnte. Hingegen ließ sich bzgl. des ebenfalls in Kap. 3.8 ff. abgebildeten synthetisierten TEMPO Spin-Labels von Testosteron (TSO-TSL) aus der Reihe der Steroidhormone eine entsprechende Konzentrationsreihe messen und die somit erhaltenen CW-ESR-Spektren bzgl. Kap. 4.3 standardmäßig auswerten (s. Abb. 60 ff.).

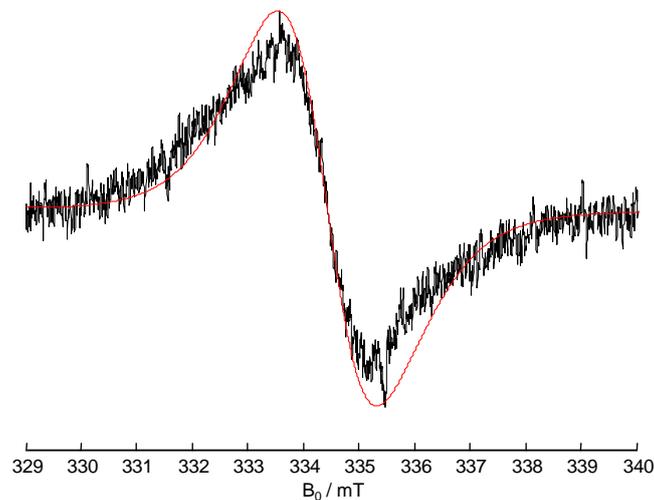


Abb. 59: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von CSO-TSL bei einem Verhältnis von CSO-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM .

Mittels der durchgeführten spektralen Simulation bzgl. Abb. 59 konnte nachgewiesen werden, dass das experimentell gemessene CW-ESR-Spektrum von CSO-TSL einen mizellen-behafteten Anteil von 100% besitzt. Die sich ebenfalls aus der Simulation ergebende effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz beläuft sich auf einen Wert von $\omega_{\text{ex}} = 55$ MHz, und liegt damit vergleichsweise gegenüber dem ebenfalls ausschließlich mizellierten CW-ESR-Spektrum von FBS-TSL in einem Frequenzbereich, wo der Heisenberg Austausch sich durch starke Verbreiterung des Resonanzfeldes verstärkt bemerkbar macht. Weiterhin sei anzumerken, dass CSO-TSL aus gleichen Gründen, wie zuvor in Kap. 4.3.4 beschrieben wurde, vermutlich nicht durch HSA transportiert wird. Gemäß Abb. 60 konnten wiederum mit Hilfe der bewerkstelligten spektralen Simulation der jeweiligen experimentellen Spektren unter Verwendung von EasySpin [1] folgende Werte für die Hyperfeintensoren der freien und

gebundenen Bindungsanteile ermittelt werden zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 108.4 \text{ MHz}$ entsprechend aller freien Bindungsanteile, sowie zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 24.2 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ bound}} = 92.7 \text{ MHz}$ bzgl. aller gebundenen spektralen Anteile.

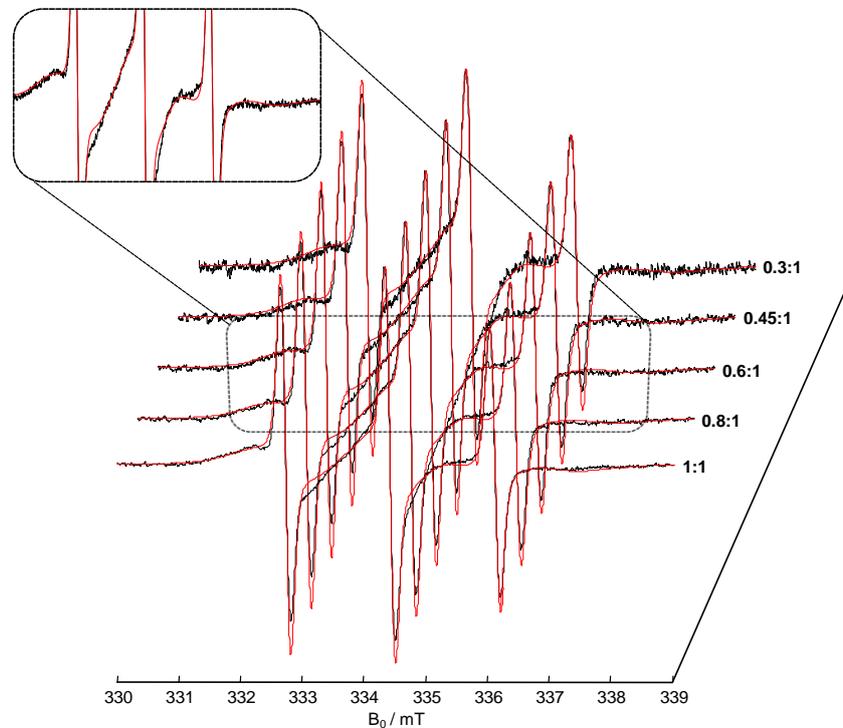


Abb. 60: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von TSO-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von TSO-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $100 \mu\text{M}$.

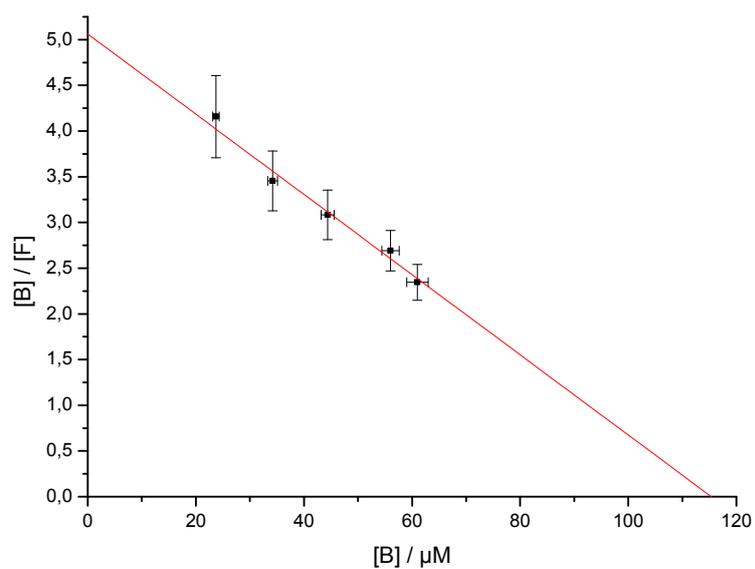


Abb. 61: Scatchard-Plot [6] von TSO-TSL

Weiterhin ist anzumerken, dass es sich bei allen gemessenen TSO-TSL:HSA-Spektren um, wenn auch nur leicht mizellierte, 3-Komponentenspektren handelt, wobei vor allem zur Verdeutlichung der Simulationsgenauigkeit ein charakteristisch ausgewählter Ausschnitt des aufgenommenen CW-ESR-Spektrums von TSO-TSL, welches bei einem Verhältnis von 0.6:1 vermessen wurde, in stark vergrößerter Form hinsichtlich Abb. 60 ebenso verbildlicht wurde. Der Mizellenzuwachs ausgehend des Verhältnisses von 0.3:1 mit einem Mizellenanteil von 2% bis hin zu einem Verhältnis von 1:1 (TSO-TSL:HSA) mit einem Mizellenanteil von rund 13% beläuft sich hierbei auf knapp 11%. Fortfolgend konnte im Hinblick auf des in Abb. 61 gezeigten Scatchard-Plots von TSO-TSL eine Assoziationskonstante von $4.39 \pm 0.37 \cdot 10^4$ sowie eine repräsentative mittlere Bindungsaffinität von 72.0% bestimmt werden. Durch Ablesen des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von TSO-TSL zeigt sich, dass eine einzige Bindungsstelle pro Protein durch TSO-TSL blockiert wird.

4.3.8 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Vitamine

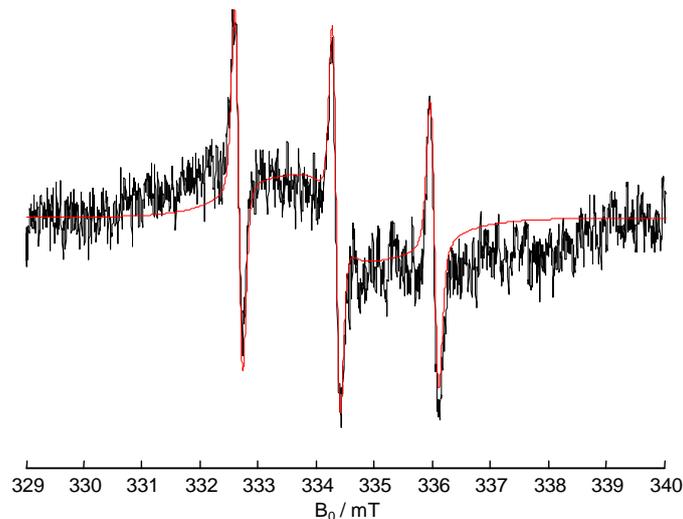


Abb. 62: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von DVE-TSL bei einem Verhältnis von DVE-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM .

Dieses Unterkapitel lässt sich wiederum in zwei Teilbereiche untergliedern. Während bei den in Kap. 3.9 dargestellten synthetisierten TEMPO-Estern von D-(+)-Biotin (Vitamin B₇; s. Abb. 65) und Niacin (Vitamin B₃; s. Abb. 63) aus der Reihe der Vitamine, genauer B-Vitamine, die ursprünglich angedachte Realisierung der angestrebten CW-ESR-Bindungsstudien unter Verwendung von HSA gelang, konnten bei den ebenfalls in Kap. 3.9 veranschaulichten synthetisierten TEMPO Spin-Labeln von D- α -Tocopherol (Vitamin E; s.

Abb. 62), Cholecalciferol (Vitamin D₃; s. Abb. 67) und Ergocalciferol (Vitamin D₂; s. Abb. 68) keine Konzentrationsreihen zur Bestimmung wichtiger Bindungsparameter durchgeführt werden. Die Auswertung der durchgeführten HSA-Bindungsstudien erfolgte wiederum entsprechend Kap. 4.3.

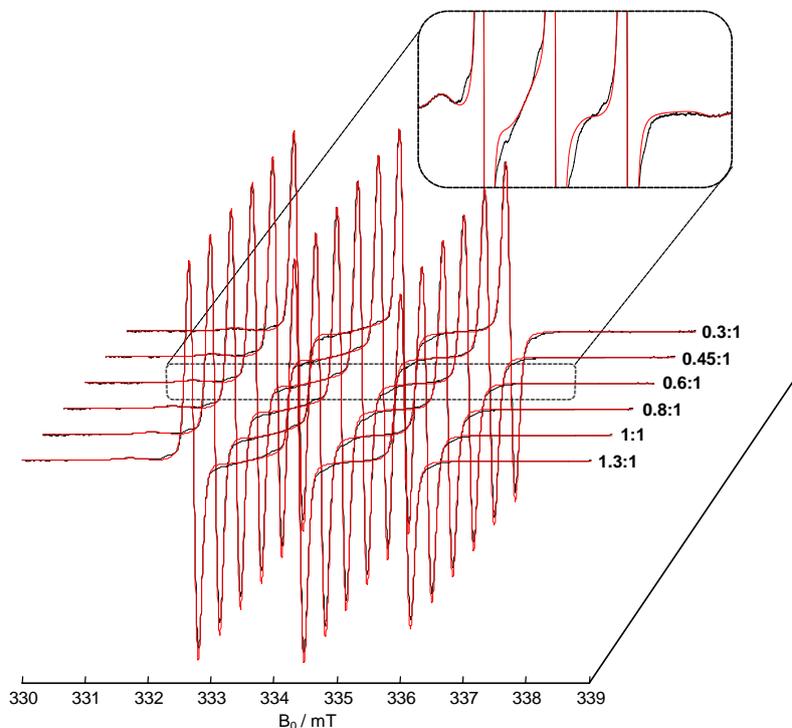


Abb. 63: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von VB3-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von VB3-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 600 μ M.

Unter zur Hilfenahme der spektralen Simulation des bei 200 μ M experimentell gemessenen CW-ESR-Spektrums von DVE-TSL (s. Abb. 62) konnte herausgestellt werden, dass sich das aufgenommene Spektrum sowohl aus einem mizellierten Anteil von $(92.5 \pm 3.5)\%$ als auch aus einem freien spektralen Anteil von $(7.5 \pm 3.5)\%$ zusammensetzt. Die sich ebenfalls aus der Simulation ergebende effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz beläuft sich auf einen Wert von $\omega_{\text{ex}} = 45$ MHz und liegt damit in einem Frequenzbereich, wo Heisenberg-Austausch zwar auftritt (vgl. Abb. 54), dieser aber aufgrund des mit rund 8% vorliegenden freien spektralen Anteils nicht uneindeutig zu Geltung kommt (s. Abb. 62). Die Hyperfeinaufspaltungen bzgl. der simulierten freien Anteile nahmen hierbei folgende Werte an: $A_{\text{xx, free}} = A_{\text{yy, free}} = 17.5$ MHz und $A_{\text{zz, free}} = 107.3$ MHz. Fortfolgend konnte anhand spektraler Simulationen der in Abb. 63 und Abb. 65 aufgeführten CW-ESR-Spektren von VB3-TSL und VB7-TSL überprüft werden, dass es sich bei beiden synthetisierten TEMPO-Estern um durchgehend mizellenfreie Spektren handelt.

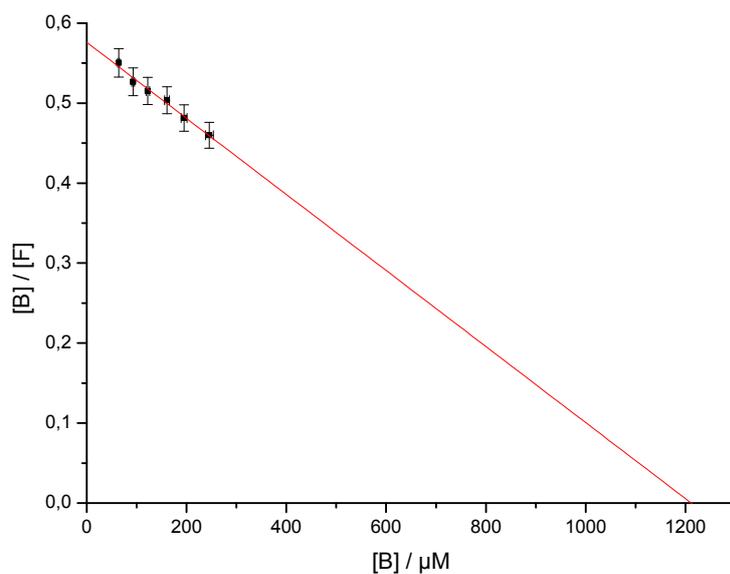
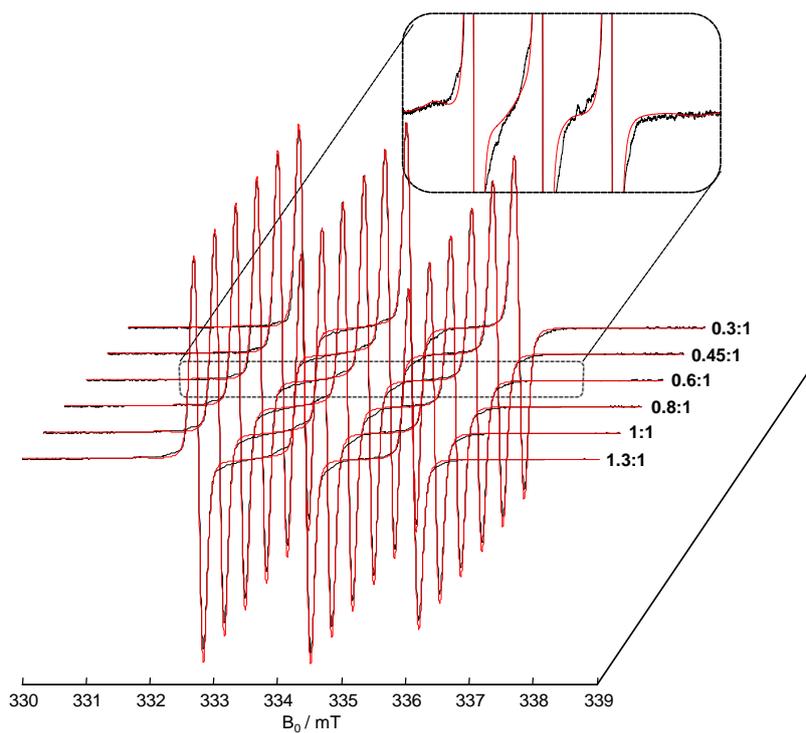


Abb. 64: Scatchard-Plot [6] von VB3-TSL

Abb. 65: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von VB7-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von VB7-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 600 μM .

Zur Unterstreichung der Simulationsgenauigkeit wurde jeweils für jede vermessene Konzentrationsreihe der beiden TSL ein individuell ausgewählter spektraler Ausschnitt, hier der

Verhältnisse von 0.6:1, durch starke Vergrößerung in die oben genannten Abbildungen mit integriert. Bezüglich der gemessenen VB3-TSL:HSA-Spektren konnten die Hyperfeintensorwerte zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.4$ MHz und $A_{zz, \text{ free}} = 107.0$ MHz gemäß aller freien Bindungsanteile, sowie zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 23.2$ MHz und $A_{zz, \text{ bound}} = 93.5$ MHz entsprechend aller gebundenen Anteile, ermittelt werden. Gemäß aller aufgenommenen CW-ESR-Spektren von VB7-TSL ließen sich die Werte der Hyperfeintensoren zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.4$ MHz und $A_{zz, \text{ free}} = 107.3$ MHz bzgl. aller freien spektralen Anteile, sowie zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 23.7$ MHz und $A_{zz, \text{ bound}} = 92.6$ MHz entsprechend aller gebundenen Bindungsanteile, bestimmen.

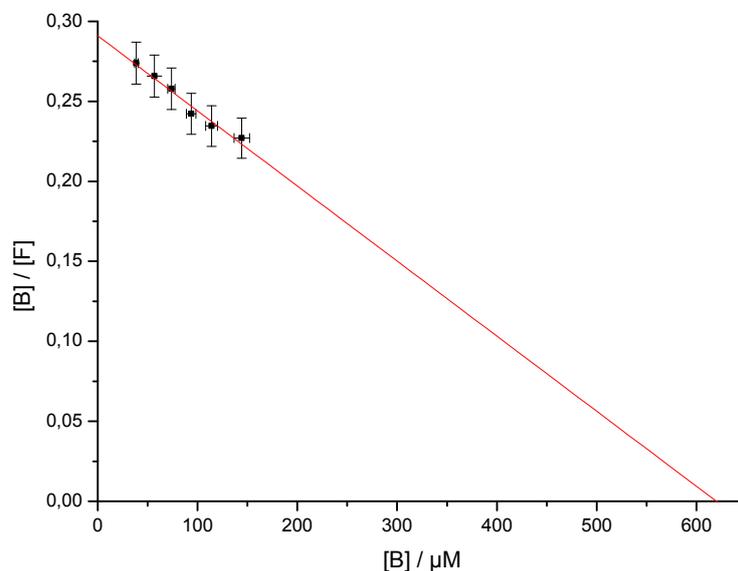


Abb. 66: Scatchard-Plot [6] von VB7-TSL

Ferner konnte durch nähere Begutachtung des in Abb. 64 dargestellten Scatchard-Plots von VB3-TSL eine Assoziationskonstante von $4.75 \pm 0.28 \cdot 10^2$ sowie eine spezifische mittlere Bindungsaffinität von 33.6% ermittelt werden. Durch Ablesen des Schnittpunktes an der x-Achse des Scatchard-Plots von VB3-TSL wird manifest, dass zwei Bindungsstellen pro Protein durch VB3-TSL eingenommen werden. Durch Auswertung des in Abb. 66 dargestellten Scatchard-Plots von VB7-TSL ließ sich eine Assoziationskonstante von $4.69 \pm 0.42 \cdot 10^2$ sowie eine mittlere Bindungsaffinität von 20.0% bestimmen. Durch Ermittlung des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von VB7-TSL konnte eruiert werden, dass lediglich ein VB7-TSL pro Albumin (HSA) gebunden wird.

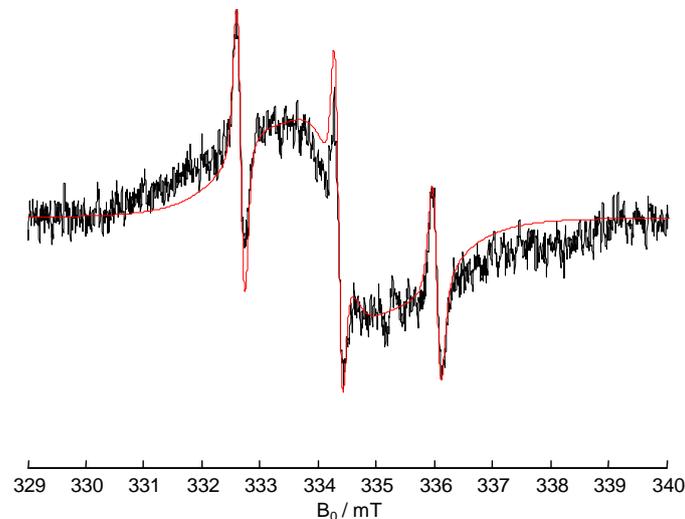


Abb. 67: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von VD3-TSL bei einem Verhältnis von VD3-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 200 μM .

Entsprechend der durchgeführten spektralen Simulation bzgl. Abb. 67 wurde ersichtlich, dass das experimentell gemessene CW-ESR-Spektrum von VD3-TSL einerseits einen stark mizellenbehafteten Anteil von $(97 \pm 1)\%$, andererseits einen freien spektralen Anteil von $(3 \pm 1)\%$, aufweist. Weiterhin nahm die effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz einen Wert von $\omega_{\text{ex}} = 45 \text{ MHz}$ an, sodass von einem ausgeprägten Heisenberg-Austausch durch starke Verbreiterung des Resonanzfeldes keine Rede sein kann. Zudem konnten hinsichtlich Abb. 67 folgende Hyperfeintensorwerte bzgl. der freien spektralen Anteile wie folgt bestimmt werden, zu $A_{\text{xx, free}} = A_{\text{yy, free}} = 17.4 \text{ MHz}$ und $A_{\text{zz, free}} = 107.5 \text{ MHz}$. Anhand der durchgeführten Simulation entsprechend Abb. 68 kann zunächst festgehalten werden, dass sich das aufgenommene VD2-TSL:HSA-Spektrum hauptsächlich aus einem Mizellenanteil von $(99.3 \pm 0.2)\%$ sowie freien spektralen Anteil von $(0.7 \pm 0.2)\%$ zusammensetzt. Konträr zum aufgenommenen VD3-TSL:HSA-Spektrum lag die durch spektrale Simulation bestimmte effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz des CW-ESR-Spektrums von VD2-TSL mit $\omega_{\text{ex}} = 49 \text{ MHz}$ bei einem Frequenzwert, bei dem der Heisenberg-Austausch, wie in Abb. 68 eingesehen werden kann, auch deutlich sichtbar wird. Eine Interpretation des Spektrums bzgl. freier, jedoch vielmehr gebundener spektraler Anteile wird daher durch eine verminderte Auflösung zunehmend erschwert bzw. ist bei einem Mizellenanteil von rund 100%, wie es bei den CW-ESR-Spektren von FBS-TSL bzw. CSO-TSL der Fall ist, gar nicht mehr möglich. Gemäß Abb. 68 ergaben sich für die Hyperfeinaufspaltungen bzgl. der prozentual sehr gering

ausfallenden freien Anteile folgende Werte zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.4 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 107.4 \text{ MHz}$.

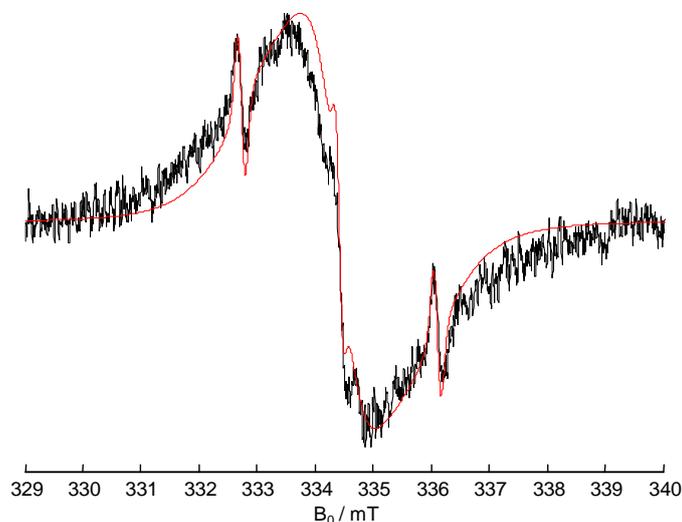


Abb. 68: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum von VD2-TSL bei einem Verhältnis von VD2-TSL zu HSA (1:1) und einer fixen Proteinkonzentration von $200 \mu\text{M}$.

4.3.9 Auswertung der Messergebnisse TEMPO-modifizierter Antiauxine

Ebenso, wie in den meisten Unterkapiteln zuvor, konnte auch in diesem Unterkapitel die Durchführung der HSA-Bindungsstudien des in Kap. 3.10 dargestellten TEMPO-Esters von 2,3,5-Triiodbenzoesäure (TIB-TSL) aus der Reihe der Antiauxine realisiert und die dabei aufgenommenen CW-ESR-Spektren von TIB-TSL (s. Abb. 69) entsprechend Kap. 4.3 ausgewertet werden (s. Abb. 70). Gemäß Abb. 52 stellte sich durch entsprechende Simulation der aufgenommenen CW-ESR-Spektren von TIB-TSL heraus, dass es sich bei den TIB-TSL:HSA-Spektren um rein mizellenbehaftete Spektren mit einem Mizellenanteil von jeweils glatt 8% – mit Ausnahme des gemessene Verhältnisses von 1.3:1 mit einem mizellierten Anteil von rund 19% – handelt. Die Werte der Hyperfeintensoren der freien und gebundenen Bindungsanteile ergaben sich dabei zu $A_{xx, \text{ free}} = A_{yy, \text{ free}} = 17.3 \text{ MHz}$ und $A_{zz, \text{ free}} = 107.9 \text{ MHz}$ entsprechend aller freien Bindungsanteile, und zu $A_{xx, \text{ bound}} = A_{yy, \text{ bound}} = 23.4 \text{ MHz}$ sowie $A_{zz, \text{ bound}} = 93.9 \text{ MHz}$ entsprechend aller gebundenen Anteile. Weiterführend ließ sich durch nähere Betrachtung des in Abb. 70 gezeigten Scatchard-Plots von TIB-TSL eine Assoziationskonstante von $1.82 \pm 0.02 \cdot 10^5$ sowie eine beigeordnete charakteristische mittlere Bindungsaffinität von 88.1% bestimmen.

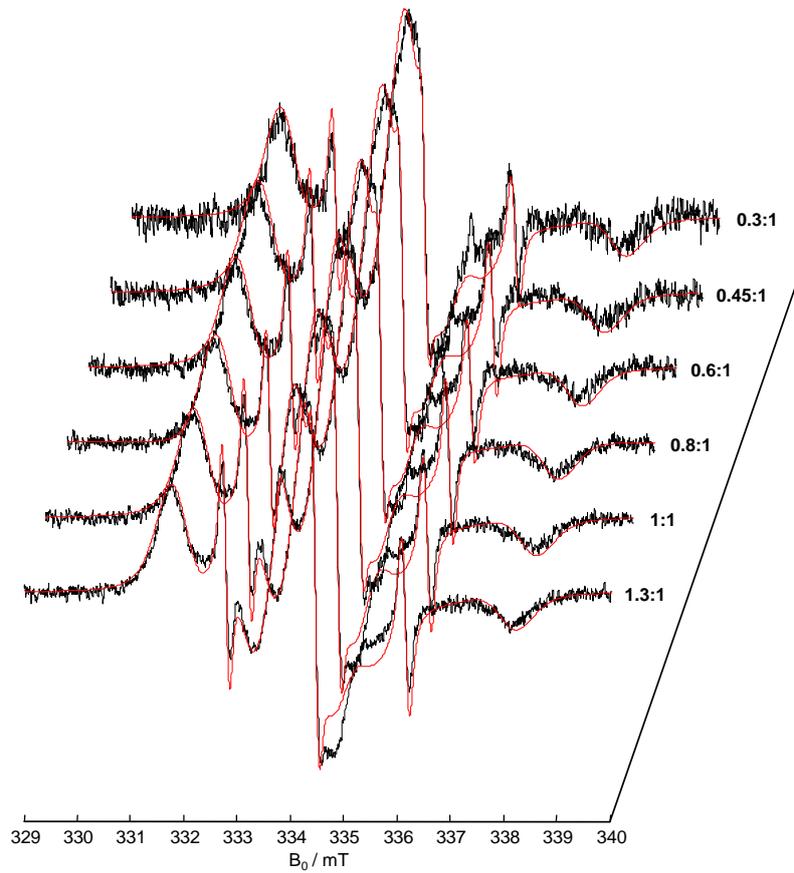


Abb. 69: Gemessene (schwarz) und simulierte (rot) CW-ESR-Spektren von TIB-TSL bei verschiedenen Verhältnissen von TIB-TSL zu HSA (x:1) und einer fixen Proteinkonzentration von 100 μM .

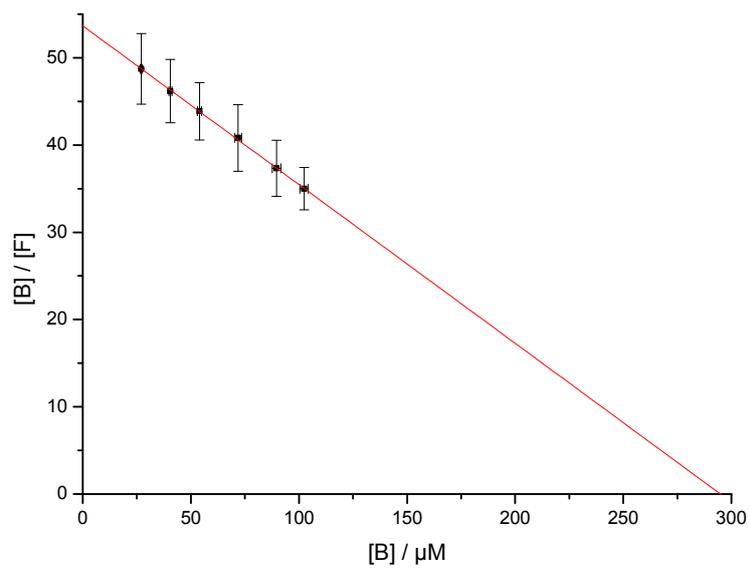


Abb. 70: Scatchard-Plot [6] von TIB-TSL

Durch Bestimmung des Abszissenschnittpunktes des Scatchard-Plots von TIB-TSL lässt sich feststellen, dass rund drei Bindungsstellen pro HSA-Molekül durch TIB-TSL blockiert werden.

4.4 Abschließende Diskussion der Messergebnisse aller CW-ESR-Studien

In diesem Kapitel wurden alle Bindungsparameter, welche durch Auswerten der jeweiligen und in Kap. 4.3 ff. visualisierten Scatchard-Plots bzgl. der verschiedenen synthetisierten und in Kap. 3.2 ff. verbildlichten TEMPO-Ester erhalten werden konnten, in Tab. 14 komprimiert dargestellt und untereinander, wenn es sich als sinnvoll erwies, verglichen. Weiterhin konnten einige aller in Kap. 4.3 ff. mittels der Scatchard-Methode bestimmten Bindungsstellen der TEMPO-modifizierten Wirkstoffe mit entsprechenden Literaturwerten der gleichnamigen, aber unmodifizierten pharmazeutischen Wirkstoffe, welche hier wie in Kap. 3.2 ff. beschrieben in Reinform zur Synthese der TSL eingesetzt wurden, ebenfalls verglichen und in Tab. 14 unter der Bezifferung n_{Lit} gelistet werden. Ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Assoziationskonstanten mit gegebenenfalls vorhandener Literatur ist durchaus nicht praktikabel, da einerseits die Methodik zur Ermittlung dieser Konstanten nicht die selbige war, andererseits die Vielzahl unterschiedlich verfügbarer Affinitätswerte für ein und dieselbe Wirkstoffkomponente gemäß existenter Literaturvielfältigkeit einen wissenschaftlich präzisen Vergleich nicht zuließ. Dennoch sollte sich nochmals vor Augen geführt werden, dass sich die gelabelten Wirkstoffe, der in dieser Arbeit zu Synthese eingesetzten Liganden, strukturell durch Eliminierung funktioneller Gruppen, wie hier die Umwandlung der jeweiligen Carbonsäure- (-COOH) oder Hydroxygruppen (-OH) unter Verwendung der beiden TEMPO-Derivate, 4-Hydroxy- bzw. 4-Carboxy-TEMPO, in entsprechende Estergruppen (-COOR; mit R = TEMPO), via der durchgeführten Steglich-Veresterungen (s. Kap. 3.2 ff.) grundlegend von den ungelabelten Wirkstoffen unterscheiden. Diese strukturellen Unterschiede machen sich nicht nur im sterischen und dynamischen Sinne bemerkbar, sondern auch durch Zuwachs der molekularen Dimension. Dies lässt die Vermutung zu, dass die gelabelten Liganden anders durch HSA aufgenommen werden als die freien, ungelabelten Substanzen und somit gravierende Unterschiede im Vergleich zu den in dieser Arbeit ermittelten Assoziationskonstanten bzw. errechneten mittleren Bindungsaffinitäten vorliegen. Diese Hypothese muss allerdings, wie in Kap. 5 beschrieben, bewiesen werden. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass sich alle zur Synthese eingesetzten

Wirkstoffe bzgl. ihrer individuellen funktionellen Gruppenmodalität, wie bspw. Halogen- (Chlor, Brom und Iod), Hydroxy-, Methoxy-, Acetoxy-, Alkyl- oder Arylgruppen, um nur einige zu nennen, sowohl im gelabelten als auch im ungelabelten Zustand untereinander gravierend unterscheiden, was, wie weiterfolgend erörtert wurde, sich ebenfalls in der Bindungsstärke zu HSA ausdrückt. Ein grober Überblick über die einzelnen Bindungsparameter kann sich in Tab. 14 verschafft werden.

Tab. 14: Übersicht aller mittels der Scatchard-Methode erhaltenen wichtigen Bindungsparameter

TSL-Typ	$K_a \pm \Delta K_a / M^{-1}$	$B_{\text{aff}} / \%$	n	n^*	$n_{\text{Lit.}}^{\S}$
ASS-TSL	$6.33 \pm 0.31 \cdot 10^3$	48.6	1.98	2	2
SAL-TSL	$1.48 \pm 0.07 \cdot 10^4$	66.3	2.01	2	2
IBU-TSL	$2.90 \pm 0.03 \cdot 10^4$	73.9	2.01	2	2
NPX-TSL	$2.17 \pm 0.17 \cdot 10^4$	72.2	1.97	2	2
PCM-TSL	$5.36 \pm 0.29 \cdot 10^2$	35.9	2.01	2	-
DCF-TSL	$6.24 \pm 0.24 \cdot 10^4$	79.0	1.99	2	-
IMC-TSL	$4.85 \pm 0.28 \cdot 10^4$	78.3	2.03	2	2
PPC-TSL	$8.04 \pm 0.57 \cdot 10^3$	17.0	0.94	1	-
WFR-TSL	$3.11 \pm 0.29 \cdot 10^4$	50.4	0.99	1	1
CCS-TSL	$8.42 \pm 0.38 \cdot 10^2$	55.8	2.97	3	-
PPF-TSL	$9.46 \pm 0.69 \cdot 10^3$	55.8	1.98	2	2
BBR-TSL	$1.96 \pm 0.29 \cdot 10^2$	9.8	1.02	1	-
CBL-TSL	$5.05 \pm 0.24 \cdot 10^4$	69.5	2.02	2	-
TSO-TSL	$4.39 \pm 0.37 \cdot 10^4$	72.0	1.15	1	1
VB3-TSL	$4.75 \pm 0.28 \cdot 10^2$	33.6	2.02	2	-
VB7-TSL	$4.69 \pm 0.42 \cdot 10^2$	20.0	1.03	1	-
TIB-TSL	$1.82 \pm 0.02 \cdot 10^5$	88.1	2.95	3	2

[§] Alle Werte wurden gemäß der Referenzen [10, 11, 12, 13, 14] angegeben.

K_a : Assoziationskonstante; B_{aff} : mittlere Bindungsaffinität, gemittelt über alle gebunden Anteile bzgl. gemessener TSL:HSA-Spektren im Verhältnis von x:1; n : max. Anzahl an Bindungsstellen pro Protein ($n^* \equiv$ gerundeter Wert).

Weiterhin kann bezüglich Tab. 14 festgehalten werden, dass alle mittels der Scatchard-Methode bestimmten Bindungsstellen, bis auf die von TIB-TSL, mit den entsprechenden Literaturwerten genau übereinstimmen. Der Grund liegt vermutlich darin, dass die angegebene Bindungsstellenanzahl von TIB-TSL gemäß Literatur [14] in Gegenwart von Myristinsäure bestimmt wurden, sodass statt einer erhofften Bindungsstellenerweiterung

Bindungsstellen von HSA blockiert wurden, da Fettsäuren gemäß [15, 29] eine verstärkte Bindungsaffinität zu HSA aufweisen. Daher ist es auch von entscheidender Bedeutung eine Vielzahl von Medikamenten bzw. pharmazeutischen Wirkstoffen entweder nüchtern oder ohne vorher fettreiche Kost zu sich genommen zu haben einzunehmen. Da es sich bei den meisten synthetisierten TEMPO Spin-Labels um Verbindungen mit eher unpolarem Charakter handelt, scheint die HSA-Aufnahme gegenüber Verbindungen, welche polare und unpolare Gruppen, wie bspw. VB7-TSL, besitzen, verstärkt zu sein. Die Aufnahme bzw. Bindung von Liganden, wie z.B. durch die verstärkte Bindung von Fettsäuren an HSA [16, 17] offengelegt werden konnte, durch hydrophobe Kanäle als auch durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den TSL sowie flexiblen Aminosäureresten im Inneren sowie an der Oberfläche des Proteins ist hierbei ein wichtiger Aspekt der gleichwohl vor allem unpolaren funktionellen Gruppen der synthetisierten TSL ein Schlupfloch im Protein ermöglicht. Ebenso spielen ionische Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. So lässt sich bspw. die erhöhte Bindungsaffinität von TIB-TSL durch die erhöhte Substitution von Iod erklären. Da die Iod-Atome einen stark negativ polarisierten Charakter besitzen und die Aminosäure-Reste im Protein als Zwitterion vorliegen können, erfolgt die Anbindung von TIB-TSL wahrscheinlich aufgrund zunehmender elektrostatischer Wechselwirkungen (prozentual auf die Anzahl von Iod-Atomen bezogen). Vergleichsweise hierzu besitzt PPF-TSL, welches zwar wie das chemisch verwandte TIB-TSL rein unpolaren Charakter aufweist, jedoch statt dem negativen Substitutionsmuster durch Iod-Atome zwei sperrige Isopropylgruppen in 2- und 6-Position am aromatischen Ring trägt, eine um zwei Zehnerpotenzen geringere Assoziationskonstante als TIB-TSL. Es wird wohl an Ort und Stelle durch hydrophobe Kanäle von HSA gebunden. Weiterhin fällt beim direkten Vergleich der beiden ebenfalls chemisch verwandten TEMPO-modifizierten Analgetika, ASS-TSL und SAL-TSL, auf, dass die freien OH-Gruppen des TEMPO Spin-Labels von Salicylsäure (SAL-TSL) mit rund 18% zu einer recht starken Erhöhung der mittleren Bindungsaffinität, was auch durch die gegenüber ASS-TSL um eine ganze Zehnerpotenz größer ausfallende Assoziationskonstante zum Ausdruck kommt, beitragen. Diese Tatsache liegt vermutlich darin begründet, dass sich SAL-TSL zum einen den hydrophoben Effekt zunutze macht, andererseits die Wasserstoffbrückenbindungstendenz der OH-Gruppen gegenüber des Acetatrestes von ASS-TSL weitgehend stärker ausgeprägt ist und somit SAL-TSL zusätzliche Stabilisierung im Protein erfährt. Zudem sollte in Erwägung gezogen werden, dass der sperrigere Charakter des Acetatrestes gegenüber dem der OH-Gruppe, wenn auch nur leicht erhöht ist. Bei IBU-TSL und NPX-TSL ist erwartungsgemäß kein großer Unterschied im Bindungsverhalten zu

beobachten, da beide Verbindungen einerseits stark hydrophoben Charakter besitzen, andererseits auch auf molekularer Ebene annähernd gleich groß sind. Die Flexibilität des Isobutylrestes von Ibuprofen gegenüber dem 6-Methoxynaphthylrest des TEMPO-Esters von Naproxen scheint sich dennoch bemerkbar zu machen, da die mittlere Bindungsaffinität von IBU-TSL gegenüber der von NPX-TSL um näherungsweise 2% erhöht ist. Unter Betrachtung der Bindungsaffinitäten von DCF-TSL, IMC-TSL und BBR-TSL fällt auf, dass die Affinitäten der synthetisierten TEMPO-Ester von Indometacin und Diclofenac gegenüber derer von Benzbromaron um einen Faktor von ca. 8 deutlich höher liegen. Bei diesen Verbindungen kann zwar aufgrund fehlender chemischer Verwandtheit kein direkter Vergleich erfolgen, dennoch zeichnet sich ab, dass die Bindung dieser Wirkstoffe an HSA neben der Ausnutzung des hydrophoben Effektes sowie ionischer bzw. elektrostatischer Wechselwirkungen scheinbar ebenfalls durch dessen Sperrigkeit und molekulare Größe stark eingeschränkt ist. Dennoch lässt sich belegen, dass elektrostatische Effekte einen großen Anteil an der Proteinbindung haben, da die Assoziationskonstante von PCM-TSL, welches definitiv nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen im Protein gehalten wird, sondern vermutlich, wenn überhaupt, durch hydrophobe Kanäle bzw. H-Brücken gebunden wird, um zwei Zehnerpotenzen kleiner ist als die Assoziationskonstanten von DCF- bzw. IMC-TSL. Bezüglich dem TEMPO Spin-Label von Testosteron scheint die molekulare Größe dem hydrophoben Effekt zu trotzen, da die Assoziationskonstante recht groß ausfällt. Zusätzlich bieten sich dem hauptsächlich aus C-H-Einheiten bestehenden Steroidhormon unzählige Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch TSO-TSL durch eine erhöhte Form der Stabilisierung verstärkt an HSA gebunden wird. CBL-TSL zeichnet sich dagegen durch mehrere langkettige, flexible Kohlenstoffeinheiten mit zusätzlicher Substitution von Chlor aus, wodurch neben der Stabilisierung durch H-Brückenbildung, elektrostatische Wechselwirkungen zur Bindung an HSA vermehrt eine Rolle spielen könnten. Hinsichtlich unternommener Bindungsstudien aus der Reihe der Vitamine konnte gezeigt werden, dass im Besonderen die fettlöslichen D-Vitamine sowie Vitamin E im wässrigen Lösungsumfeld stark mizelliert vorlagen und somit trotz mizellenbrechender Wirkung von HSA nicht gebunden werden konnten. Ebenso, wie Tab. 14 entnommen werden kann, zeichnen sich die beiden wasserlöslichen TEMPO-modifizierten B-Vitamine (VB3-TSL und VB7-TSL) nicht durch sonderlich große Assoziationskonstanten aus, dennoch ist nicht von der Hand zu weisen, dass beide durch HSA, wenn auch nur schwach unter physiologischen Bedingungen (s. Kap. 4.1.1 ff.) gebunden werden. Die pharmakologisch und pharmakokinetische sinngemäße Rangfolge der in dieser Arbeit

TEMPO-modifizierten Antikoagulantien, die da wären PPC-TSL, WFR-TSL und CCS-TSL, konnte letztendlich anhand der in Tab. 14 dargestellten und mittels der Scatchard-Methode dank durchgeführter CW-ESR-Bindungsstudien erhaltenen Bindungsparameter leicht nachvollzogen werden. Während WFR-TSL erwartungsgemäß die stärkste Affinität zu HSA besitzt, weist PPC-TSL eine um 33.4% niedrigere Bindungsaffinität auf. Der Grund hierfür könnte im Gegensatz zu PPC-TSL, welches an gleicher Position bzgl. der zusätzlich eingeführten Seitenkettenmodifikation wie bei WFR-TSL ausgehend vom Cumarin-Grundkörper einen Ethylrest trägt, eine erhöhte Flexibilität des 3-Oxobutylrestes sowie eine damit verbundene verstärkte Anlagerung an OH-trächtige Aminosäure, wie bspw. Serin, durch Ausbildung einer vermehrt auftretenden Wasserstoffbrückenbindung sein. Hingegen kommt die eher schwach ausfallende blutverdünnende, in großen Mengen toxische Wirkung von CCS-TSL, wobei der Grundkörper Cumarin gerne zum Würzen vieler Speisen [18] genutzt wird, durch eine sehr spärliche Assoziationskonstante zum Ausdruck (vgl. Tab. 14). Diese divergiert um deutliche zwei Zehnerpotenzen von der Assoziationskonstanten des WFR-TSL's und liegt ebenso eine Zehnerpotenz unter derer von PPC-TSL. Zudem wird CCS-TSL zugleich einer äußerst niedrigen Affinität zu HSA dreifach gebunden, wohingegen PCC-TSL und WFR-TSL jeweils nur einfach gebunden werden und daher medikamentös in Reinform als sog. Antikoagulantien, d.h. zur Hemmung plasmatischer Blutgerinnung, vielfältig eingesetzt. Hierbei stellt Marcumar[®] unter Verwendung der Wirkstoffkomponente Phenprocoumon deutschlandweit das bekannteste und meist verschriebene Präparat dar [19].

5. Zusammenfassung/Ausblick

Abschließend kann festgehalten werden, dass die selektiv an den Carbonsäuregruppen via Steglich-Veresterung und in Kap. 3.2 dargestellten synthetisierten TEMPO-Ester in zur Vermessung mittels der CW-ESR-Methode ausreichenden Mengen erhalten werden konnten und die gewünschte Reinheit der Syntheseprodukte mittels angewandter typischer radikalbezogener Charakterisierungsmethoden überprüft werden konnte. Weitergehend wurde auf eine Charakterisierung der verschiedenen TEMPO-Ester mittels NMR-Spektroskopie zunächst verzichtet, da die mühsam aufgereinigten TEMPO Spin-Label (TSL) nur in mg-Bereich anfielen und zur Aufnahme von bspw. ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren die radikalischen Syntheseprodukte zunächst üblicherweise mit Hilfe von Phenylhydrazin reduziert sowie zur Aufnahme sauberer Spektren anstandsgemäß säulenchromatographisch hätten aufgereinigt werden müssen. Dennoch sei darauf hingewiesen, dass neben, wie in Kap. 3.2 beschrieben wurde, bisher stichprobenhaltig vier der dreiundzwanzig synthetisierten TEMPO-Ester mittel durchgeführter Einkristallstrukturanalyse eindeutig strukturell bestimmt werden konnten. Weitere Röntgenstrukturanalysen der TSL werden, sobald eine Züchtung von Einkristalle nach verrichtetem Umzug an die MLU Halle-Wittenberg wieder möglich ist, in Kürze folgen. Weiterhin konnten bei siebzehn der dreiundzwanzig synthetisierten TEMPO Spin-Label (s. Kap. 4.3 ff.) die angestrebten HSA-Bindungsstudien CW-ESR-spektroskopisch unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, alle bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen aufgenommenen experimentellen CW-ESR-Spektren sachgemäß in EasySpin [1] unter Verwendung des Ansatzes von Schneider und Freed [2] simuliert (vgl. Kap. 4.3 ff.) und alle unter Kap. 4.4 in Tab. 14 angegebenen Bindungsparameter mittels der geeigneten und von Scatchard entwickelten Methode [6] teils graphisch sowie rein rechnerisch bestimmt werden. Um jedoch die erhaltenen Messwerte pharmakologisch nutzbarer zu machen, ist es von entscheidender Bedeutung eine entsprechende Referenzierungsstudie mittels der altbewährten ITC-Methode (engl. Isothermal Titration Calorimetry) durchzuführen, sodass jeweils der unmodifizierte pharmazeutische Wirkstoff, welcher ESR-spektroskopisch nicht vermessen werden kann, sowie der TEMPO-modifizierte Wirkstoff unter HSA-Beteiligung zu gleichen Bedingungen¹⁸, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, vermessen werden können. Da die durchgeführten CW-ESR-Bindungsstudien und die somit erhaltenen Messergebnisse nicht mit anderen Methoden wie bspw. der ITC-Methode vergleichbar sind,

¹⁸ D.h., bezogen auf alle in dieser Arbeit verwendeten physikalischen sowie physiologischen Parameter.

muss in Zukunft ebenso die Art der Methode konstant gehalten werden. In Anbetracht dessen, wird es in ferner Zukunft möglich sein, da alle durchgeführten Veresterungen mittels jeweils geeignetem TEMPO-Derivat (s. Kap. 2.1 ff., Kap. 2.3.6 ff. sowie Kap. 4.4 ff.) selektiv an den Carbonsäure- bzw. Hydroxylenden der unterschiedlich zur Synthese eingesetzten Wirkstoffe zu entsprechenden Carbonsäureesterderivaten stattfanden, mehr über das Bindungsverhalten bzw. den prozentualen Bindungsanteil der jeweils veresterten funktionellen Gruppe (-COOH bzw. -OH) dieser Wirkstoffe an HSA oder auch weiteren wichtigen Proteinen zu erfahren. Dieser Anteil kann folglich leicht durch Subtraktion des gebundenen Anteils des reinen unmodifizierten Wirkstoffes von dem gebundenen Anteil des TEMPO-modifizierten pharmazeutischen Wirkstoffes ermittelt werden.

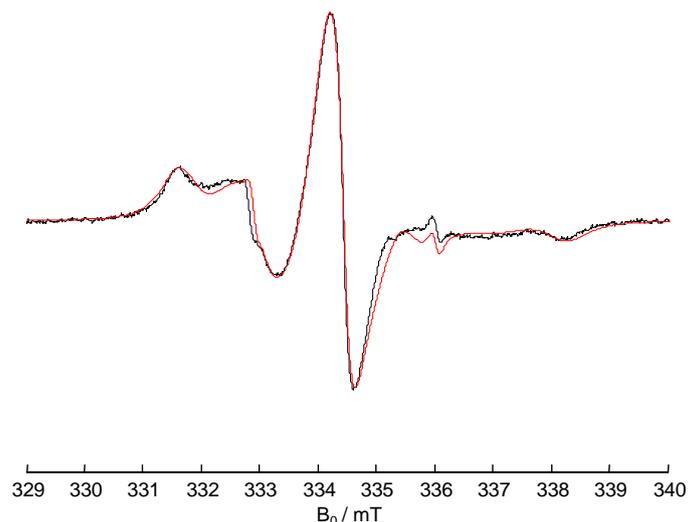


Abb. 71: Gemessenes (schwarz) und simuliertes (rot) CW-ESR-Spektrum des MTS-HSA Spin-Labels bei einer Proteinkonzentration von 50.6 μM unter physiologischen Bedingungen (vgl. 4.1.1 ff.). Zur Simulation der experimentellen CW-ESR-Spektren wurden die g-Tensorwerte $g_{xx} = 2.0087$, $g_{yy} = 2.0061$ und $g_{zz} = 2.0021$ verwendet. Hierbei wurde sich an den literaturbekannten g-Tensorwerten von MTSSL gemäß [22] orientiert. Das Spektrum weist einen gebundenen Anteil von 68.0%, einen helikalen Anteil von 31.7% sowie einen lediglich freien Anteil von MTSSL von 0.3% auf. Die simulierten A-Tensorwerte ergaben sich für die jeweiligen Bindungsanteile wie folgt: $A_{xx, \text{bound}} = A_{yy, \text{bound}} = 14.9 \text{ MHz}$, $A_{zz, \text{bound}} = 100.4 \text{ MHz}$; $A_{xx, \text{helix}} = A_{yy, \text{helix}} = 12.3 \text{ MHz}$, $A_{zz, \text{helix}} = 107.2 \text{ MHz}$; $A_{xx, \text{free}} = A_{yy, \text{free}} = 14.0 \text{ MHz}$, $A_{zz, \text{free}} = 103.8 \text{ MHz}$.

Nichts desto trotz bietet die CW-ESR-Methode als hochempfindliche Methode gegenüber anderen Methoden wie bspw. FRET (engl. Förster resonance energy transfer) einen brauchbaren Ansatz, um zum einen Bindungsmechanismen, wie in Kap. 4.2.3 dargestellt

nachvollziehbar deuten zu können, als auch zum anderen Proteinbindungsstudien hoch qualitativ und quantitativ durch starke Minimierung sich einschleichender Fehler durchführen zu können. Bezüglich dessen wurden allein schon bei der Probenpräparation sowohl durch vorherige Bestimmung einer kritischen Mizellkonzentration, des LM-Einflusses auf HSA sowie des Bindungseinflusses der zur Synthese eingesetzten TEMPO-Derivate (4-Hydroxy- bzw. 4-Carboxy-TEMPO) mittels CW-ESR-spektroskopischen Aufnahmen als auch durch die Einstellung exakt physiologischer Parameter (s. Kap. 4.1.1 ff.) viele Fehlerquellen eliminiert, die bei anderen Methoden entweder nicht bedacht wurden oder schlichtweg nicht auszumerzen sind. Fortfolgend bietet daher die ESR-Spektroskopie einen neuen Ansatz von dem sich ein großer pharmakologischer Nutzen versprochen wird. Auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und durch die bewerkstelligte Fixierung der max. Anzahl an Bindungsstellen der jeweiligen TSL an HSA (vgl. Kap. 4.4, Tab. 14) lässt sich darauf aufbauend mittels der DEER-Methode [23] eine präzise ortgebundene Bestimmung der sich im Protein befindlichen bzw. durch HSA gebundenen TEMPO-modifizierten pharmazeutischen Wirkstoffe realisieren. Dies ist für die Zukunft geplant.

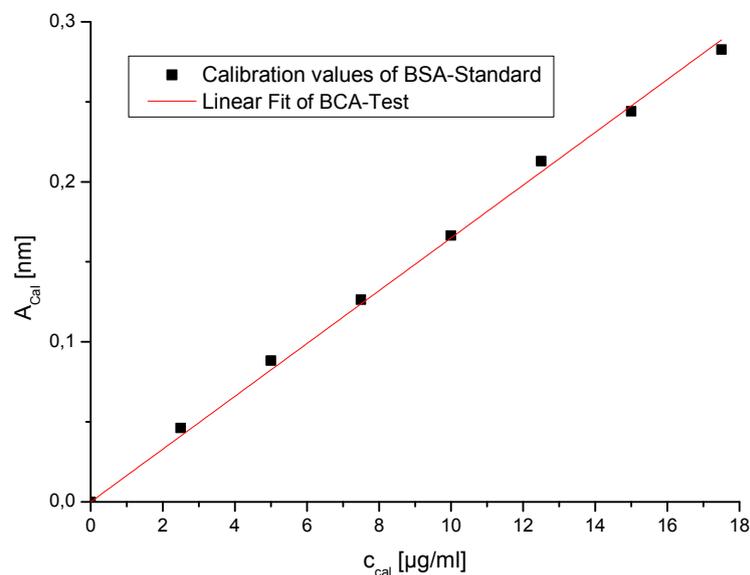


Abb. 72: Kalibrationsgerade des durchgeführten BCA-Tests [21, 66] vom MTS-HSA Spin-Label. Alle vorkalibrierten Konzentrationen (c_{cal}) wurden bei $\lambda = 562$ nm (BCA-Absorptionsmaximum, [67]) unter Verwendung des Plate Readers Infinite[®] M1000 des Herstellers Tecan Group AG vermessen.

HSA wurde dafür thiol-spezifisch an der einzig frei zugänglichen Cysteingruppe mittels MTSSL (s. Abb. 71) gelabelt [20], da bei einer solchen Messung der Abstand zwischen einer

fixen Spinsonde am Protein und des jeweilig gebundenen TEMPO-Esters, d.h. der Abstand zwischen beiden Elektronenspins beider im Protein vorliegenden radikalischen Sonden, gemessen wird. Zur Referenzierung der Konzentration des gelabelten Proteins konnte anschließend ein BCA-Test gemäß [21] durchgeführt werden, wobei sich diese zu 50.6 μM bzgl. einer vorkonzentrierten 300 μl MTS-HSA Spin-Labelösung bestimmen ließ. Die dem durchgeführten BCA-Test zugrundeliegende Kalibrationsgerade wurde in Abb. 72 graphisch dargestellt. Die Gewinnung neuer Erkenntnisse in der pharmakologisch relevanten Forschung durch Nutzung der DEER-Methode wäre auch für diese Methodik eine Neuerung mit viel Potential. Bisherige Methoden zur Bestimmung des ortsgebundenen Zustandes vieler Wirkstoffe bietet derzeit v.a. die Röntgenstrukturanalyse. Allerdings ist die Probenherstellung in einer Kältematrix, da verwendete Röntgenstrahlung die aufwändig hergestellten Proben sonst zerstören würde, immer noch ein höchst aufwendiges Unterfangen, wobei die DEER-Methode aufgrund einer recht schnellen Probenpräparation praktikabler erscheint.

6. Literaturverzeichnis

- [1] S. Stoll, A. Schweiger
EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR
J. Magn. Reson. **178**(1), 42-55 (2006)
- [2] D.J. Schneider, J.H. Freed
Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra: A User's Guide
In: Biol. Magn. Reson. **8**, 1-76 (1989): Spin Labeling-Theory and Applications, L.J. Berliner and J. Reuben (eds.), New York 1989, Plenum Press
- [3] J.L. Du, G.R. Eaton, S.S. Eaton
Temperature, Orientation, and Solvent Dependence of Electron Spin-Lattice Relaxation Rates for Nitroxyl Radicals in Glassy Solvents and Doped Solids
J. Magn. Reson. A **115**, 213-221 (1995)
- [4] R. Dulbecco, M. Vogt
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses
J. Exp. Med. **99**(2), 167-182 (1954)
- [5] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi
Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution
Protein Eng. **12**, 439-446 (1999); pdb-ID: 1BM0, s. under Biology and Chemistry report
- [6] G. Scatchard
The attractions of protein for small molecules and ions
Ann. NY. Acad. Sci. **51**, 660-672 (1949)
- [7] D. Nelson, M. Cox (Hrsg.)
EXKURS 12-1: Die Scatchard-Analyse misst die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor
In: Lehninger Biochemie, 4. vollst. überarb. und erw. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2009
- [8] U. Kragh-Hansen
Structure and ligand binding properties of human serum albumin
Den. Med. Bull. **37**(1), 57-84 (1990)
- [9] T. Peters
All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications
Academic Press, San Diego 1995
- [10] F. Yang, C. Bian, L. Zhu, G. Zhao, Z. Huang, M. Huang
Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin
J. Struct. Biol. **157**(2), 348-355 (2007)

- [11] X.M. He & D.C. Carter
Atomic structure and chemistry of human serum albumin
Nature, **358**, 209-215 (1992)
- [12] S. Leyon, J.F. Cramer, P. Nordberg
Structural basis for the binding of naproxen to human serum albumin in the presence of fatty acids and the GA module
Acta Cryst. F **64**, 64-69 (2008)
- [13] W.H. Pearlman, O. Crépy, and M. Murphy
Testosterone-Binding Levels in the Serum of Women During the Normal Menstrual Cycle, Pregnancy and the Post-partum Period
J. Clin. Endocrinol. Metab. **27(7)**, 1012-1018 (1967)
- [14] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri and S. Curry
Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin
J. Mol. Biol. **353**, 38-52 (2005), pdb-ID: 2BXM
- [15] J.R. Simard, P.A. Zunszain, J.A. Hamilton, S. Curry
Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-competition Analysis
J. Mol. Biol. **361(2)**, 336-351 (2006)
- [16] A.A. Bhattacharya, T. Grüne and S. Curry
Crystallographic Analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin
J. Mol. Biol. **303(5)**, 721-732 (2000)
- [17] A.A. Spector
Fatty acid binding to plasma albumin
J. Lipid Res. **16**, 165-179 (1975)
- [18] R. Ebermann, I. Elmadfa
Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung
2. Aufl., Springer-Verlag, Wien New York, 2008 und 2011, ISBN 978-3-7091-0210-7
- [19] Prof. Dr. P. Berlit (Hrsg.)
Klinische Neurologie
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1999, ISBN 978-3-662-08118-1 (ebook), S. 1292-1306
- [20] J.B. Feix and C.S. Klug
Site-Directed Spin Labeling of Membrane Proteins and Peptide-Membrane Interactions
In: L.J. Berliner (ed.), Spin Labeling – The Next Millennium, Biol. Magn. Reson. **14**, Plenum Press, New York 1998, ISBN 0-306-45644-3

- [21] Prof. Dr. W.E. Trommer
Quantitative Proteinbestimmungsmethoden
In: Biochemisches Praktikum, Skriptum zum Biochemie-Praktikum, TU Kaiserslautern, 2012, S. 26 ff.
- [22] Dr. E. Bordignon
Spin-Labeling EPR of Proteins: Dynamics and Water Accessibility of Spin-Label Side Chains
In: G.C.K. Roberts (ed.), Encyclopedia of Biophysics: S-Z, 5, 2439-2447, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013
- [23] A. Schweiger, G. Jeschke
Principles of pulse electron paramagnetic resonance
Oxford University Press, New York 2001
- [24] K. Münnemann, D. Hinderberger
Physik, Chemie, Biologie & Medizin: Der Spin macht den Unterschied
Forschungsbericht 2011 - MPI-P Mainz, Nr. 1179941
- [25] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger
DEER in Biological Multispin-Systems: A Case Study on the Fatty Acid Binding to Human Serum Albumin
J. Magn. Reson. 210(2), 210-217 (2011)
- [26] B.J. Gaffney
The Chemistry of Spin Labels
In: L.J. Berliner (ed.), Spin Labeling – Theory and Applications, Vol. 1, Academic Press, Inc., New York 1976, ISBN 0-12-092350-5
- [27] S.-Y. Cheng, G. Rakhit, F. Erard, J. Robbins, C.F. Chignell
A Spin Label Study of the Thyroid Hormone-binding Sites in Human Plasma Thyroxine Transport Proteins
J. Biol. Chem. 256(2), 831-836 (1981)
- [28] E. Zavoisky
Relaxation of liquid solutions for perpendicular fields
J. Phys. USSR 9, 211-245 (1945)
- [29] J. Reichenwallner, D. Hinderberger
Using Bound Fatty Acids to Disclose the Functional Structure of Serum Albumin
BBA General Subjects, published online (2013), DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.04.031
- [30] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting
Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
9. Aufl., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2008, ISBN 978-3-8047-1952-1

- [31] A. Bertolini, A. Ferrari, A. Ottani, S. Guerzoni, R. Tacchi, S. Leone
Paracetamol: New Vistas of an Old Drug
In: CNS Drug Reviews **12(3-4)**, 250-275 (2006)
- [32] Y.E. Choi, M. Katsumi, H. Sano
Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*
Plant Sci. **160(6)**, 1183-1190 (2001)
- [33] D.A. Morris, P.H. Rubery, J. Jarman und M. Sabater
Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo L.* hypocotyl segments
J. Exp. Bot. **42(6)**, 773-783 (1991)
- [34] Prof. Dr. R. Kuhn
Vitamine und Arzneimittel
Angew. Chem. **55(1-2)**, 1-6 (1942)
- [35] H. Dunkelberg, T. Gebel und A. Hartwig
Vitamine und Spurenelemente
1. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2012, ISBN 978-3-527-33289-2
- [36] W.N. Taylor
Anabolic Steroids and the Athlete
2th Ed., McFarland, North Carolina 2002, ISBN 978-0-7864-1128-3
- [37] H. Schneemann, G. Wurm (Hrsg.)
HAGERS HANDBUCH der pharmazeutischen Praxis
Folge Bd.1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1995, ISBN 3-540-58958-9
- [38] K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
9. Aufl., Urban & Fischer/Elsevier-Verlag, München 2006, ISBN 978-3-437-44490-6
- [39] F. von Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A.W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgrabe
HAGERS HANDBUCH der pharmazeutischen Praxis, Stoffe P-Z
Bd.9, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1994, ISBN 3-540-52688-9
- [40] Dr. M. Ufer
Comparative Pharmacokinetics of Vitamin K Antagonists: Warfarin, Phenprocoumon and Acenocoumarol
Clin. Pharmacokinet. **44(12)**, 1227-1246 (2005)
- [41] J. Ansell, J. Hirsh, L. Poller, H. Bussey, A. Jacobson, E. Hylek
The Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy
Chest. **126(3)**, 204S-233S (2004)

- [42] K. Schrör
Acetylsalicylic acid
Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2009, ISBN 978-3-527-32109-4
- [43] W. Gröbner, N. Zöllner
Differentialindikation Urikosurika und Allopurinoll
Klin. Wochenschr. **67(5)**, 313-315 (1989)
- [44] N.L. Edwards
Febuxostat: a new treatment for hyperuricaemia in gout
Rheumatology **48(2)**, ii15-ii19 (2009)
- [45] U. Bonnet
Sucht und Propofol: Unstillbares Verlangen nach einem Anästhetikum
In: InFo Neurologie & Psychiatrie **13(4)**, 40-44 (2011)
- [46] J. Schüttler
Pharmakokinetik und -dynamik des intravenösen Anaesthetikums Propofol (Disoprivan®): Grundlagen für eine optimierte Dosierung
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1990, ISBN 978-3-540-52463-2
- [47] B. Neises, W. Steglich
Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids
Angew. Chem. Int. Ed. **17(7)**, 522-524 (1978)
- [48] M.J.N. Junk, H.W. Spiess, D. Hinderberger
The Distribution of Fatty Acids Reveals the Functional Structure of Human Serum Albumin
Angew. Chem. Int. Ed. **49(46)**, 8755-8759 (2010)
- [49] P. Zeeman
Ueber einen Einfluss der Magnetisirung auf die Natur des von einer Substanz emittirten Lichtes
Verhandlungen der PGzB, Jahrg. **15**, Nr. **7**, 127-130 (1896)
- [50] W. Gerlach, O. Stern
Der experimentelle Nachweis der Richtungsquantelung im Magnetfeld
Z. Phys. **9(1)**, 349-352 (1922)
- [51] W. Gerlach, O. Stern
Das magnetische Moment des Silberatoms
Z. Phys. **9(1)**, 353-355 (1922)
- [52] W. Demtröder
Experimentalphysik 3 – Atome, Moleküle und Festkörper
3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 2005, ISBN 3-540-21473-9

- [53] S. Goudsmit, G.E. Uhlenbeck
The coupling possibilities of quantum vectors in the atom
Z. Phys. **35(8-9)**, 618-625 (1926)
- [54] G.E. Uhlenbeck, S. Goudsmit
Spinning Electrons and the Structure of Spectra
Nature **117(2938)**, 264-265 (1926)
- [55] P.M. Skrabal
Spektroskopie: Eine methodenübergreifende Darstellung vom UV- bis zum NMR-Bereich
vdf Hochschulverlag AG, Zürich 2009, ISBN 978-3-8252-8355-1
- [56] J. Vaara, J. Jokisaari, R.E. Wasylshen, D.L. Bryce
Spin-spin coupling tensors as determined by experiment and computational chemistry
Progress in Nuc. Magn. Reson. Spec. **41(3)**, 233-304 (2002)
- [57] A. Abragam and M.H.L. Pryce
Theory of the Nuclear Hyperfine Structure of Paramagnetic Resonance Spectra in Crystals
Proc. R. Soc. Lond. A, Math. Phys. Sci. **205(1080)**, 135-153 (1951)
- [58] Y.N. Molin, K.M. Salikhov, K.I. Zamaraev
Spin Exchange: Principles and Applications in Chemistry and Biology
Springer Ser. Chem. Phys. **8**, Springer-Verlag, Berlin 1980, ISBN 3-540-10095-4
- [59] J.H. Freed
Theory of Slow Tumbling ESR Spectra for Nitroxides
In: L.J. Berliner (ed.), Spin Labeling – Theory and Applications, Vol. 1, Academic Press, Inc., New York 1976, ISBN 0-12-092350-5
- [60] N.M. Atherton
Principles of Electron Spin Resonance
Ellis Horwood Ltd., New York 1993, ISBN 0-137-21762-5
- [61] F. Schneider und M. Plato
Elektronenspin-Resonanz
Thiemig-Taschenbücher - Bd. 40, Verlag Karl Thiemig KG, München 1971
- [62] G. Jeschke
Instrumentation and Experimental Setup
Biol. Magn. Reson. **27**, 17-47 (2007)
- [63] W.L. Hubbell, D.S. Cafiso, and C. Altenbach
Identifying conformational changes with site-directed spin labeling
Nat. Struct. Biol. **7(9)**, 735-739 (2000)

- [64] N. Kocherginsky and H.M. Swartz
Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry
CRC Press, Boca Raton 1995, ISBN 978-0-849-34204-2
- [65] C.P. Poole
Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques
2nd Ed., Courier Dover Publications, 1996, ISBN 0-486-69444-5
- [66] G. Richter
Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, ISBN 3-13-132381-7, S. 198 ff.
- [67] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk
Measurement of protein using bicinchoninic acid
Anal Biochem. **150**(1), 76-85 (1985)
- [68] E. Breitmaier
Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen
3. vollst. überarb. und erw. Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005, ISBN 978-3-527-31499-7
- [69] H. Günzler, H. Böck
IR-Spektroskopie: Eine Einführung
2., überarb. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1983; Physik Verlag, Weinheim 1983; ISBN 3-527-21089-X (Verlag Chemie, Taschentext), ISBN 3-87664-589-1 (Physik Verlag, Taschentext)
- [70] L. Rintoul, A.S. Micallef, S.E. Bottle
The vibrational group frequency of the N-O• stretching band of nitroxide stable free radicals
Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. **70**(4), 713-717 (2008)

Anhang

A. Symbole und Abkürzungen

$ \alpha\rangle$	parallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichteter Spinzustand
A	^{14}N -Hyperfeinkopplungstensor
Å	Angström (Einheit); $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
Abb.	Abbildung
A_{cal}	kalibrierte Absorptionswerte
ACE	Aceton
A_{iso}	isotrope ^{14}N -Hyperfeinkopplungskonstante
allg.	allgemein
altgr.	Altgriechisch
Ar	Arylgruppe
ASS	Acetylsalicylsäure
Aufl.	Auflage
$ \beta\rangle$	antiparallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichteter Spinzustand
[B]	Konzentration des gebundenen TSL-Anteils
B	Magnetische Flussdichte; $\mathbf{B} = \mu_0 \times \mathbf{H}$
B_0	Magnetische Flussdichte des statischen Magnetfeldes
B	Magnetische Flussdichte des angelegten Magnetfeldes
B_{aff}	mittlere Bindungsaffinität (bzgl. aller Protein in Lösung)
BBR	Benzbromaron
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin/Bicinchoninsäure
Bd.	Band
Bezugspkt.	Bezugspunkt
B_{max}	max. Anzahl an Bindungsstellen; engl.: maximal number of binding sites
bspw.	beispielsweise

bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c_{cal}	vorkalibrierte Konzentrationswerte
C-Atom	Kohlenstoffatom
CBL	Chlorambucil
CCS	Cumarin-3-carbonsäure
CDCl_3	deutertes Chloroform (NMR)
-COOH	Carboxygruppe, d.h. funktionelle Gruppe aller Carbonsäuren
COX	Cyclooxygenase
CSO	Cholesterol
CW	engl.: continuous wave
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR)
D	Nullaufspaltungstensor
D_r	Rotationsdiffusionskoeffizient
dB	Dezibel
DCF	Diclofenac
DCM	Dichlormethan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
dd	Dublett vom Dublett (NMR)
DEE	Diethylether
def.	Deformationsschwingung (IR)
DEER	engl.: double electron-electron resonance
deut.	deutsch
d.h.	das heißt

DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	deutertes DMSO (NMR)
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl.: deoxyribonucleic acid
DOI	engl.: <i>Digital Object Identifier</i>
DPBS	engl.: Dulbecco's phosphate buffered saline; Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung
16-DSA	engl.: 16-DOXYL-stearic acid (free radical); deut.: 16-Doxyl-Stearinsäure
DVE	D-Vitamin E (D- α -Tocopherol); ugs.: Vitamin E
e	Elementarladung, $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
E	Energie
E ₁	Energieniveaus unterhalb von E ₂
E ₂	Energieniveaus oberhalb von E ₁
Ed.	Edition
ed.	engl.: <i>editor</i> , deut.: Herausgeber
eds.	engl.: <i>editors</i> , deut.: Herausgeber
EE	Essigsäureethylester; ugs.: Essigester, auch Ethylacetat genannt
engl.	englisch
EPR	engl.: electron paramagnetic resonance
ESR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
eq.	Äquivalent
η	Viskosität
[F]	Konzentration des freien TSL-Anteils
FBS	Febuxostat
FD	Felddesorption; engl.: Field Desorption

ff.	fortfolgend
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer; engl.: Förster resonance energy transfer
FS	Fettsäuren; engl.: fatty acids
FV	Füllvolumen
g	metrischer g-Tensor (ESR)
g	Gramm; $1\text{ g} = 10^{-3}\text{ kg}$
G	Gauss (Einheit); $1\text{ G} = 0,1\text{ mT}$
g_e	g-Faktor des freien Elektrons, $g_e = 2.0023193043737(82)$
GHz	Gigahertz; $1\text{ GHz} = 10^9\text{ Hz}$
g_{iso}	isotroper g-Faktor
g_K^i	g-Faktor des i-ten Kerns
Gl.	Gleichung
gr.	griechisch
H	magnetische Feldstärke
\hat{H}	Hamiltonoperator
h	Planck'sches Wirkungsquantum, $h = 6,626 \cdot 10^{-34}\text{ Js}$
\hbar	reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum, $\hbar = h/2\pi$
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
Hrsg.	Herausgeber
HSA	Serum Albumin des Menschen; engl.: human serum albumin; int. ugs.: Serum Albumin
Hz	Hertz
I	Gesamtspindrehimpuls des Kerns
\hat{I}	Kernspinoperator bzw. Drehimpulsoperator der freien Kerne
IBU	Ibuprofen

IMC	Indometacin
int.	International
ISBN	internationale Standardbuchnummer, engl.: International Standard Book Number
IR	Infrarot
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie; engl.: Isothermal titration calorimetry
J	Austauschtensor
$^xJ_{a,b}$	Kopplungskonstante (NMR); a,b = jeweils koppelnde Kerne; x = Anzahl der Bindungen zwischen beiden koppelnden Kernen
K	Kelvin
K_A	Assoziationskonstante, auch Bindungskonstante genannt
Kap.	Kapitel
k_B	Boltzmannkonstante, $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
KBr	Kaliumbromid
K_D	Dissoziationskonstante; reziprokes Maß zu K_A
kg	Kilogramm; $1 \text{ kg} = 10^3 \text{ g}$
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
L	Bahndrehimpuls
Lit.	Literatur
Litverz.	Literaturverzeichnis
LM	Lösungsmittel
μ	magnetisches Moment
μ_0	Magnetische Feldkonstante
μ_B	Bohrsches Magneton
μg	Mikrogramm; $1 \mu\text{g} = 10^{-3} \text{ mg} = 10^{-6} \text{ g}$
μ_K	Kernmagneton
μl	Mikroliter

μM	Mikromolar; $1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ M} = 10^{-6} \text{ mol/l}$
max.	maximal
M	Molarität \equiv mol/l, Molpeak
M_w	Molekulargewicht in g/mol
m	Multipllett (NMR) o. mittlere IR-Absorptionsbande
m_e	Elektronenmasse; $m_e = 9,10938291(40) \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
MeOH	Methanol
mg	Milligramm; $1 \text{ mg} = 10^{-3} \text{ g}$
MHz	Megahertz
min.	Minute
m_l	magnetische Quantenzahl des Drehimpulses („azimutale“ Quantenzahl)
ml	Milliliter
mmol	Millimol; $1 \text{ mmol} = 10^{-3} \text{ mol}$
mm	Millimeter
mM	Millimolar; $1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ M} = 10^{-3} \text{ mol/l}$
Mn-Std.	Manganstand (ESR)
Mo-K α	Molybdän-K α -Strahlung; $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$
m_s	magnetische Spinquantenzahl des Elektrons
m-s	mittlere bis starke IR-Absorptionsbande
mT	Millitesla
MTSSL	Methanthiosulfat Spin-Label; genauer: Spinlabel von (1-Oxyl-2,2',5,5'-tetramethylpyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (MTSSL)
MTS-HSA	Selektiv mittels MTSSL an der Thiolgruppe (-SH) des freizugänglichen Cysteins gelabeltes (deut.: spinmarkiertes) Serum Albumin (HSA)
m-w	mittlere bis schwache IR-Absorptionsbande
MW	Mikrowelle
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
n	identisch mit B_{max}

NaOH	Natriumhydroxid
N-Atom	Stickstoffatom
n-Hex	n-Hexan
nm	Nanometer; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$
NMR	engl.: Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
NO-	Nitroxid-
NPX	Naproxen
ns	Nanosekunde; $1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$
NSAID	engl.: non steroidal anti inflammatory drugs; deut.: Nicht steroidale entzündungshemmende Medikamente
Ø	Durchmesser
o.	oder
O-Atom	Sauerstoffatom
-OH	Hydroxygruppe, d.h. funktionelle Gruppe aller Alkohole/Phenole
PBC	Probenecid
PCM	Paracetamol
pdb-ID	engl.: protein data base identifier
PE	Petrolether
PGzB	Physikalische Gesellschaft zu Berlin
Ph.Eur.	synonym: Pharmacopoea Europaea (Ph.Eur.); Europäisches Arzneibuch
PNS	peripheres Nervensystem
PPC	Phenprocoumon
PPF	Propofol
PSD	phasensensitiver Detektor
ppm	engl.: parts per million $\equiv 10^{-6}$
ps	Picosekunde; $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$
RCSB	engl.: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

R_f	Retentionsfaktor (DC)
R_H	Hydrodynamischer Radius eines Moleküls
RNA	Ribonukleinsäure; engl.: ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
S	Spindrehimpuls des freien Elektrons
\hat{S}	Spindrehimpulsoperator des freien Elektrons, auch Spinoperator genannt
s	Singulett (NMR) o. starke IR-Absorptionsbande
s	Sekunde
s	Spinquantenzahl des Elektrons
s.	siehe; engl.: <i>see</i>
SAL	Salicylsäure
SiO ₂	hier: amorphes Siliciumdioxid; Kieselgel
Smp.	Schmelzpunkt
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis, engl.: signal-to-noise ratio
s.o.	siehe oben
ss	sehr starke IR-Absorptionsbande
ss-s	sehr starke bis starke IR-Absorptionsbande
Stlsg.	Stammlösung
t	Triplett (NMR)
τ_R	Rotationskorrelationszeit
T	Temperatur in Kelvin (bzw. °C)
T	Dipolarer Kopplungstensor
Tab.	Tabelle
TD	TEMPO-Derivat
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
THF	Tetrahydrofuran
TIB	2,3,5-Triiodbenzoesäure

TOL	Toluol
TSL	TEMPO Spin-Label
TSO	Testosteron
u.a.	unter anderem
ugs.	Umgangssprachlich
URAT 1	Urat-Austauscher 1; in den Nieren lokalisiertes Harnsäure-Transportprotein
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolette Strahlung
ν, ν_L	Frequenz, Larmorfrequenz
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl (IR) in cm^{-1}
v.a.	vor allem
VB3	Vitamin B ₃ (Niacin)
VB7	Vitamin B ₇ (Biotin); veraltet: Vitamin H
VD2	Vitamin D ₂ (Ergocalciferol)
VD3	Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)
V_{ges}	Gesamtvolumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen; bzgl. Litverz.: engl.: <i>Volume</i> , deut.: Buchauflage, Band
Vol%	Volumenprozent
ψ	Wellenfunktion des Elektrons
ω_{ex}	effektive Heisenberg-Spinaustauschfrequenz in MHz
WFR	Warfarin
x	Verhältnis des TSL-Anteils bezogen auf konstanten HSA-Anteil (x:1)
X-Band	Mikrowellenfrequenzbereich von ~ 9,1 bis ~ 9,8 GHz
XRD	engl.: X-ray Diffraction; Röntgenbeugung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Weitere wichtige Anmerkungen:

- ❖ Alle in dieser Arbeit verwendeten Matrizen und Vektoren sind „**fetten**“ Buchstaben gekennzeichnet worden. Ausnahmen bilden Werte die sich in Tabellen und Abbildungen befinden, wie bspw. **n**.
- ❖ Alle Operatoren wurden standardmäßig mit einem Dach „[^]“ versehen.

B. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in wertungsfreier Reihenfolge bei vielen lieben Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken:

- ❖ Zunächst bei Prof. Dr. H.-W. Spiess, für das Ermöglichen der Anfertigung dieser Arbeit am MPI-P in Mainz, aber vor allem meinem „Chef“ Dariush Hinderberger, der mir stets meine Freiheiten bei der Ausarbeitung und Gestaltung meines Themas ließ, jedoch auch durch seinen beherzten Enthusiasmus jederzeit dafür sorgte, mich mit kreativen Ideen und Vorschlägen zu versorgen, sodass die Arbeit zum einen abwechslungsreicher wurde, zum anderen zielorientiert blieb. Auf das die kürzlich akkreditierte Professur in Physikalischer Chemie an der MLU Halle-Wittenberg dich einerseits mit noch mehr Leben erfülle, andererseits auf rein wissenschaftlicher Ebene noch weiter nach Vorne bringen möge. Bleib so, wie du bist!
- ❖ Meiner Freundin, Franziska Roth, die mich während der gesamten Studienzeit sowie auch in dieser Zeit in jeglicher Hinsicht stets tatkräftig unterstützte und viel Verständnis dafür aufbrachte, wenn ich es vorzog an den Wochenenden zu arbeiten. Anbei danke ich ihren Eltern, Matthias und Evelyn Roth, für ihre Hilfsbereitschaft in vielerlei Dingen und vor allem für das Drucken dieser Arbeit.
- ❖ Weiterhin danke ich meiner Oma Hannelore für die immer netten und aufbauenden Gespräche an den Wochenenden sowie die seelische und moralische Unterstützung während der kompletten Studienzeit. Vielen, vielen Dank, du bist die Beste!
- ❖ Bei meinem Vater, Dr. Stefan Hauenschild, einerseits für die Ermöglichung einer humanistischen Ausbildung mit dem sich daran anschließenden Chemiestudium, andererseits für das Beisteuern kreativer Ideen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen herzlichen Dank!
- ❖ Bei meiner Mutter, Kerstin Hauenschild, dafür, dass sie, auch wenn sie nicht viel mit „Chemie“ anfangen kann, doch reges Interesse zeigte und für mich, wie auch in der Zeit davor, immer da war. Vielen lieben Dank!

- ❖ Dr. Volker Enkelmann für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen, sowie Walter Scholdai für die ausgiebige Einweisung in unterschiedliche Methoden der IR-Spektroskopie.
- ❖ Stephan Türk, „The man of mass spectrometry“, für die schnelle Einweisung in die FD-Massenspektrometrie, was mir letztlich die eigenständige Aufnahme unzähliger Massenspektren ermöglichte.
- ❖ Meinem Arbeitskollegen, Jörg Reichenwallner, für die Zeit, die er investierte, um mich mit der CW-ESR-Methode sowie der Simulation der CW-ESR-Spektren vertraut zu machen, und für sein offenes Ohr, wenn sich gelegentlich Fragen ergaben, die einer Diskussion bedurften. Vielen Dank dafür!
- ❖ Weiterhin danke ich Verona Maus, Michelle Beuchel, Eva Jaumann, Nina Forler, Oliver Neudert, Timo Bund sowie den beiden Ex-Arbeitskollegen Dennis Kurzbach und Daniel Kattnig, die mir die Zeit am MPI-P auf ihre eigene Art und Weise sehr versüßt haben, sodass die Zeit leider wie im Fluge vorbeiging. Ihr werdet mir immer in Erinnerung bleiben!
- ❖ Zuletzt, aber nicht weniger minder, danke ich allen meinen Freunden und Bekannten, vor allem meinem alten Klassenkamerad Philip Schröder und meinem Studienkollegen Julian Weber für die, wenn auch leider nur gelegentlich, schönen Abende sowie für die in dieser Zeit immerwährende Unterstützung und Bekräftigungen in meinem eigenen Tun. Vielen lieben Dank dafür!

C. Posterpräsentationen

Spin-labeling of small molecule drugs and drug transport using human serum albumin

9th European Magnetic Resonance Conference

30th June – 5th July, 2013

Hersonissos, Crete, Greece

D. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich Eides statt, dass ich meine Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mir ist bewusst, dass unrichtige Angaben dem Tatbestand § 23 DiplPro (1991) unterliegen.

Mainz, den 09. September 2013

(Till Hauenschild)