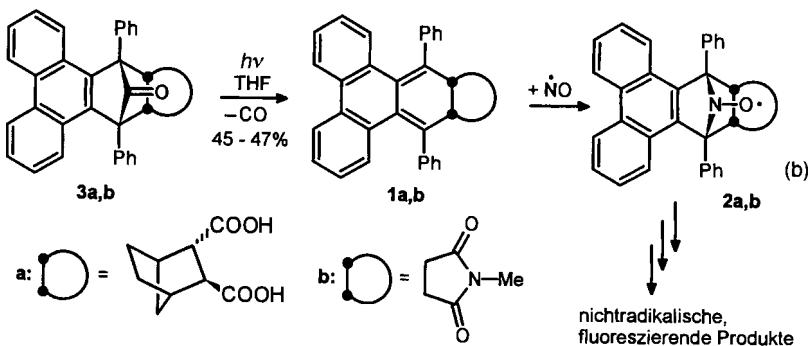


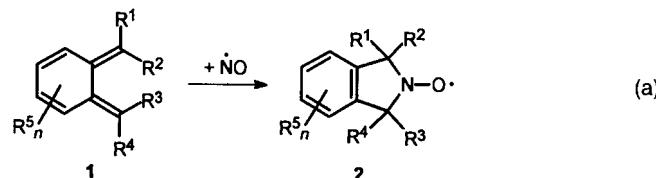
- [8] (+)-Aeroplysinin wurde freundlicherweise von Prof. Proksch, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.
 [9] 3 kann im Chemikalienhandel bezogen werden.
 [10] L. F. Fieser, M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 1, Wiley, New York, 1967, S. 967.
 [11] H.-D. Becker, T. Bremholt, E. Adler, *Tetrahedron Lett.* 1972, 13, 4205. Für neuere Anwendungen der Becker-Adler-Oxidation in der Naturstoffsynthese siehe: E. J. Corey, J. P. Dittami, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 256; S. Danishefsky, M. D. Shair, *J. Org. Chem.* 1996, 61, 16.
 [12] W. J. Wasilenko, D. M. Payne, D. L. Fitzgerald, M. J. Weber, *Mol. Cell Biol.* 1991, 11, 309.
 [13] A. Knebel, H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, P. Herrlich, *EMBO J.* 1996, 15, 5314.
 [14] Die NIH-3T3- β -PDGFR-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A. Ullrich, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.



Eine neuartige Methode zum Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) durch Bildung fluoreszierender Produkte auf der Basis cheletroper Spinfänger

Michael Bätz, Hans-Gert Korth* und Reiner Sustmann*

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges intra- und interzelluläres Signalmolekül im lebenden Organismus.^[1] Wir haben in den letzten Jahren spezifische Nachweismethoden für Stickstoffmonoxid auf der Basis „NOCTs“ (Nitric Oxide Cheletropic Traps; **1**) entwickelt, die NO im Sinne einer formal cheletropen Reaktion in cyclische Nitroxid-Radikale **2** überführen [Gl. (a)], die ESR-spektroskopisch beobachtet werden können.^[2]



Diese Methode ist erfolgreich bei Untersuchungen zur Cytoxizität von NO^[3] und bei anderen Fragestellungen zur Chemie von NO^[2b] eingesetzt worden. Bei der Verwendung von Nitroxid-Radikalen in biologischen Systemen besteht jedoch ein genereller Nachteil in der signifikant verkürzten Lebensdauer dieser Radikale aufgrund ihres leichten reduktiven Abbaus zu Hydroxylamin-Derivaten.^[4] Wir berichten hier nun über eine neue, auf dem NOCT-Konzept basierende Methode, die den Einsatz der Fluoreszenz-Spektroskopie als empfindlicher Sonde für die Erfassung abgesangenen Stickstoffmonoxids erlaubt. Wir machen uns dabei zunutze, daß aromatische π -Elektronensysteme, die bei Einsatz geeigneter NOCTs durch die Reaktion mit NO gebildet werden [Gl. (a)] Fluoreszenzeigenschaften haben. Hierdurch läßt sich einerseits die Nachweisempfindlichkeit gegenüber der ESR-Spektroskopie erhöhen und andererseits die begrenzte Lebensdauer der primär gebildeten Nitroxid-Radikale in vorteilhafter Weise nutzen.^[5] In Analogie zu unserer bisherigen Synthesestrategie haben wir die stabilen cyclischen *o*-Chinodimethan-Derivate **1** als Prototypen für FNOCTs (Fluorescence Nitric Oxide Cheletropic Traps) hergestellt^[6] [Gl. (b)].

[*] Dr. H.-G. Korth, Prof. R. Sustmann, Dr. M. Bätz
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Universitätsstraße 5, D-45117 Essen
 Telefax: Int. + 201/183-3096
 E-mail: sustmann@oc1.orgchem.uni-essen.de
 hgk@oc1.orgchem.uni-essen.de

Phencyclon^[7] reagiert mit Norbornen-2,3-(*E*)-dicarbonsäure oder *N*-Methyl-maleinimid zu den überbrückten Ketonen **3a** (84%; Schmp. 282 °C) bzw. **3b** (50%; Schmp. 297–298 °C).^[8] Die Verbindungen **3a** und **3b** lassen sich durch 300-nm-Photolyse in 47% bzw. 45% isolierter Ausbeute zu **1a** bzw. **1b** umsetzen.^[8] Die *o*-Chinodimethan-Derivate **1a**, **1b** sind bei Raumtemperatur in Gegenwart von Sauerstoff stabil und gehen nicht die für *o*-Chinodimethane charakteristischen Reaktionen (1,5-H-Verschiebung, [4+2]-Cycloaddition, Cyclisierung zu Benzo-cyclobutenen)^[2a,b] ein. Die beiden Carboxygruppen gewährleisten für **1a** eine hinreichende Löslichkeit in Puffern bei physiologischen pH-Werten.

Die UV/Vis-Spektren von **1a** (Abb. 1, Kurve a) und **1b** sind jeweils durch eine breite, für *o*-Chinodimethan-Derivate cha-

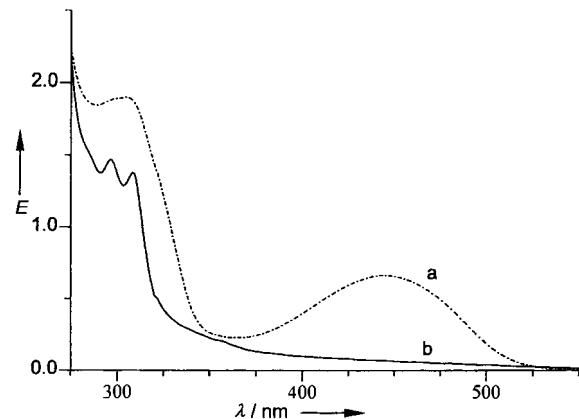
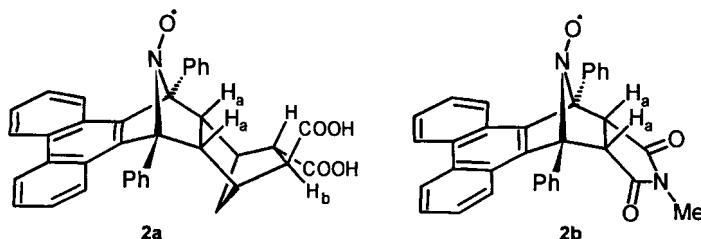


Abb. 1. a) UV/Vis-Spektrum von **1a** (10^{-4} M) in Phosphat-Puffer pH 7.4. b) Spektrum von a) nach Zugabe von NO (Endkonzentration 5×10^{-4} M).

rakteristische Bande bei $\lambda_{\text{max}} (\varepsilon) = 450 \text{ nm}$ (8 300) (in Phosphat-Puffer pH 7.4) bzw. $\lambda_{\text{max}} (\varepsilon) = 384 \text{ nm}$ (8 700) (in THF) gekennzeichnet.

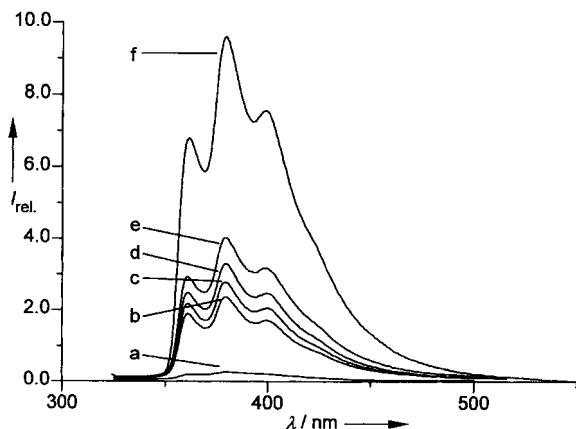
Unmittelbar nach Zugabe einer Stickstoffmonoxid-Lösung im gleichen Lösungsmittel läßt sich diese Bande bei NO in leichtem Überschuß nicht mehr nachweisen (Abb. 1, Kurve b). Statt dessen geben sich die erwarteten Nitroxid-Radikale **2a** (Abb. 2) und **2b** durch ihre ESR-Spektren zu erkennen. Anhand der ESR-Aufspaltungsparameter^[9] lassen sich den Nitroxid-Radikalen die in Schema 1 gezeigten Strukturen zuordnen.

Die Radikale **2a** und **2b** sind nicht sehr persistent und zerfallen zu nichtradikalischen Produkten. Die zeitliche Verfolgung der Intensitätsabnahme der ESR-Signale bei 20 °C ergibt für **2a** eine Halbwertszeit von ca. 40 min in Puffer pH 7.4, **2b** weist in THF eine ca. fünfzehnmal höhere Lebensdauer auf.

Abb. 2. ESR-Spektrum (9.4 GHz) von **2a** in THF bei 20 °C.Schema 1. Aus ESR-Parametern abgeleitete Strukturen von **2a, b**.

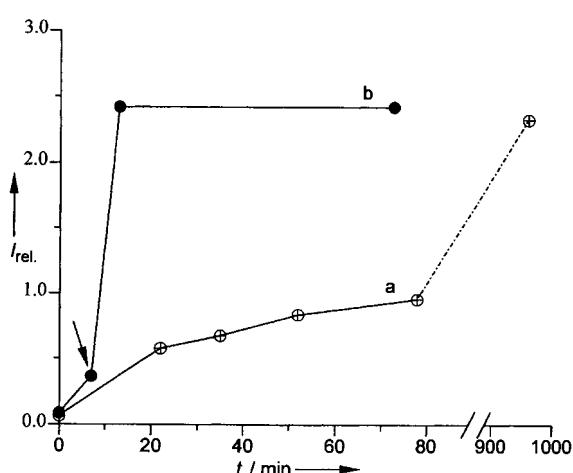
Die Geschwindigkeit der Reaktion von **1a** und **1b** mit NO wurde mit der Stopped-flow-Technik über die Abnahme der UV/vis-Absorptionen bei $\lambda = 450$ bzw. 384 nm gemessen: Die Reaktion von **1a** in Phosphat-Puffer pH 7.4 verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k(\mathbf{1a} + \text{NO}) = (60 \pm 8) \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ bei 20 °C, **1b** reagiert in Benzol mit $k(\mathbf{1b} + \text{NO}) = (134 \pm 12) \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Die Lösungen der *o*-Chinodimethane **1a** und **1b** zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 315 nm nur eine schwache Fluoreszenz (Abb. 3). Fügt man jedoch zu einer $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ Lö-

Abb. 3. Fluoreszenz-Spektren von **1a** ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$; Phosphat-Puffer pH 7.4), a) vor und b) 1 min, c) 35 min, d) 52 min, e) 78 min und f) 960 min nach Zugabe von NO im Überschuß (Endkonzentration $5 \times 10^{-4} \text{ M}$). Anregungswellenlänge: 315 nm.

sung dieser FNOCTs Stickstoffmonoxid im Überschuß, so beobachtet man – in Übereinstimmung mit den zuvor angegebenen kinetischen Daten – unmittelbar nach Zugabe die charakteristische Fluoreszenzbande des Phenanthren-Systems.^[11] Die Intensität der Fluoreszenzsignale nimmt im Laufe der Zeit langsam weiter zu, bis nach einigen Stunden (ca. 16 h für **2a**, ca. 26 h für **2b**) ein konstantes Maximum erreicht wird (Abb. 3).

Die zeitabhängige Intensitätszunahme der Fluoreszenz korreliert mit der Abnahme der ESR-Signale und damit mit der Abreaktion der Nitroxide **3a**, **3b** zu nichtradikalischen Folgeprodukten mit intaktem Phenanthren-Fluorophor.^[12] Da Nitroxide als Fluoreszenzlöscher wirken können,^[13] d.h. im vorliegenden Fall die eigenen Fluoreszenz-Intensitäten negativ beeinflussen, wurde im Hinblick auf eine praktikable Meßmethode für NO eine Vorgehensweise gewählt, bei der nach rascher Bildung des Nitroxids unmittelbar die maximale Intensität der Fluoreszenz durch Zugabe eines geeigneten Reduktionsmittels erhalten wird. Da **1a** insbesondere für Anwendungen in biologischen Systemen konzipiert wurde, haben wir als Reduktionsmittel die in allen lebenden Zellen vorkommende Ascorbinsäure gewählt. Abbildung 4 beweist die sehr schnelle Zunahme der

Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität bei 380 nm. a) Nach Reaktion von **1a** mit NO. b) Nach Zugabe von Ascorbinsäure im Überschuß (10^{-3} M). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Ascorbinsäurezugabe.

Fluoreszenz auf ihren Maximalwert nach Zugabe von Ascorbinsäure im Überschuß. Ein analoges Verhalten zeigt sich auch nach Zugabe anderer „physiologischer“ Reduktionsmittel wie Glucose oder Fe^{2+} .

Die beiden hier vorgestellten FNOCTs weisen die für biologische Anwendungen notwendige hohe Nachweisempfindlichkeit für NO auf. So konnten neben dem Auffang aus wäßrigen und nichtwäßrigen NO-Lösungen nanomolarer Konzentration unter anderem auch in 10 nM Lösungen (Puffer pH 7.4) der NO-freisetzenden Verbindung „SpermineNONOate“^[14] mit **1a** ($c = 10^{-5} \text{ M}$) noch gute Fluoreszenzspektren registriert werden. (Bei diesen NO-Konzentrationen können keine ESR-Signale von **2a** mehr detektiert werden). Die Fluoreszenzintensität verläuft im untersuchten Bereich von 2 nM bis 4 μM NO linear ($r^2 = 0.993$, 95 % Vertrauensintervall) mit der NO-Konzentration.

Von entscheidender Bedeutung für die biochemische Anwendung der FNOCTs ist weiterhin ihre Stabilität gegenüber typischen, in Zellsystemen ubiquitären, reaktiven Verbindungen, insbesondere den „reaktiven Sauerstoffspezies“. Einige davon haben wir auf ihre Wirkung gegenüber **1a** getestet: Abbildung 5 verdeutlicht, daß der Auffang von NO bei weitem die schnellste Reaktion ist und z. B. eine weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber der Zellkultur selbst, Glucose, Superoxid oder Fe^{2+} besteht. Eine langsame Reaktion tritt mit Wasserstoffperoxid ein. Das OH-Radikal-erzeugende Fenton-System $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ hat jedoch einen geringeren Einfluß als H_2O_2 alleine.

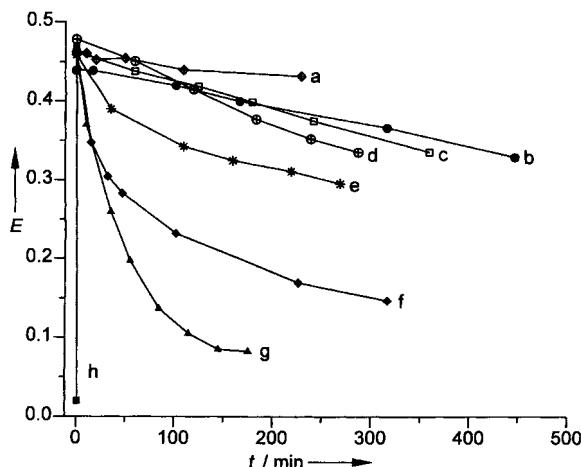


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der UV/vis-Absorption ($\lambda = 450$ nm) von **1a** (1×10^{-4} M; Phosphat-Puffer pH 7.4) in a) einer Zellkultur von Rattenleber-Endothelzellen, b) in reinem Phosphat-Puffer und in Gegenwart von c) Glucose (9×10^{-4} M), d) O_2^- (3×10^{-3} M), e) Fe^{2+} (7×10^{-4} M), f) $Fe^{2+} + H_2O_2$ (4×10^{-4} M, 1×10^{-3} M), g) H_2O_2 (2×10^{-3} M), h) NO (2×10^{-4} M).

Mit unseren FNOCTs ist es somit möglich, die Bildung und Abreaktion von NO mit drei komplementären spektroskopischen Methoden zu verfolgen, UV/vis-Spektroskopie, ESR-Spektroskopie und – insbesondere für sehr niedrige NO-Konzentrationen in biologischen Proben – Fluorimetrie. Durch synthetische Modifizierungen des *o*-Chinodimethan-Gerüstes sollte sich eine Familie von NO-Fängern mit maßgeschneiderten Eigenschaften für den Nachweis geringer Mengen NO in chemischen und biochemischen Systemen gewinnen lassen.

Eingegangen am 13. November 1996,
veränderte Fassung am 7. Februar 1997 [Z 9766]

Stichworte: Chinodimethane · ESR-Spektroskopie · Fluoreszenz-Spektroskopie · Radikale · Stickstoffoxide

- [1] a) *The Biology of Nitric Oxide, Part 5* (Hrsg.: S. Moncada, J. Stamler, S. Gross, E. A. Higgs), Portland Press, London, 1996, und vorhergehende Bände; b) *Methods in Nitric Oxide Research* (Hrsg.: M. Feilisch, J. S. Stamler), Wiley, Chichester, 1996.
- [2] a) T. Paul, M. A. Hassan, H.-G. Korth, R. Sustmann, D. V. Avila, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6835–6848, zit. Lit.; b) H.-G. Korth, R. Sustmann, *Aspects of Nitric Oxide Chemistry in Free Radicals in Biology and Environment* (Hrsg.: F. Minisci), Kluwer, Dordrecht, **1996**, S. 63–78.
- [3] a) I. Ioannidis, M. Bätz, T. Paul, H.-G. Korth, R. Sustmann, H. de Groot, *Biochem. J.* **1996**, *318*, 789–795; b) I. Ioannidis, M. Bätz, H.-G. Korth, R. Sustmann, H. de Groot, *ibid.*, im Druck.
- [4] a) V. Yelinova, A. Krainev, A. Savelov, I. Grigor'ev, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 2053; b) R. I. Zhdanov, I. B. Kadenatsi, L. E. Kholodov in *Bioactive Spin Labels* (Hrsg.: R. I. Zhdanov), Springer, Berlin, **1992**, S. 527, zit. Lit.
- [5] Dieser Ansatz unterscheidet sich konzeptionell grundlegend von den bisher beschriebenen Anwendungen der Fluoreszenz-Spektroskopie zum Nachweis von Radikalen, siehe z. B.: S. Pou, A. Bhan, U. S. Bhadri, S. Y. Wu, R. S. Hosmane, G. M. Rosen, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1085–1090.
- [6] M. Bätz, Dissertation, Universität – GH Essen, **1997**.
- [7] W. Dilthey, *J. Prakt. Chem.* **1935**, *143*, 189–210.
- [8] Die Verbindungen **1a**, **1b**, **3a** und **3b** wurden spektroskopisch (1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR, UV/vis), massenspektrometrisch und elementaranalytisch vollständig charakterisiert.
- [9] Die ESR-Spektren konnten durch Simulation mit den folgenden Aufspaltungsparametern vollständig reproduziert werden: **2a**: $a(^{14}N) = 2.284$, $a(H) = 0.077$ (2H), $a(H) = 0.048$ (1H) mT, $g = 2.00622$; **2b**: $a(^{14}N) = 2.261$, $a(H) = 0.09$ (2H), $a(H) = 0.027$ (3H), $a(^{14}N_{\text{mid}}) = 0.05$ mT, $g = 2.00628$. Die Größe der ^{14}N -Aufspaltung der Nitroxid-Stickstoffatome ist charakteristisch für überbrückte Nitroxid-Radikale [10]. Die zusätzliche Hyperfeinaufspaltung der Nitroxid-Triplettsignale wird wegen ihrer relativen Stellung zum radikalischen Zentrum bei **2a** den *exo*-ständigen Wasserstoffatomen H_a und dem Proton H_b , bei **2b** den H_a -Protonen, dem Imid-Stickstoffatom und der *N*-Methyl-Gruppe zugeordnet.

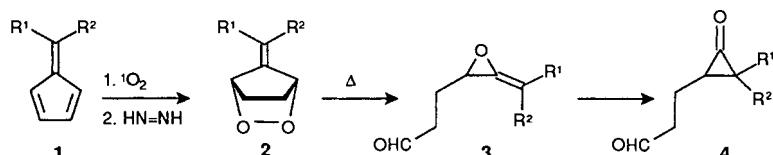
- [10] A. R. Forrester in *Landolt-Börnstein, Neue Serie, Magnetische Eigenschaften freier Radikale, Bd. 9, Teil c 1* (Hrsg.: H. Fischer, K. H. Hellwege), Springer, Berlin, **1979**, S. 524–538.
- [11] G. G. Guibault, *Practical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York, **1973**, S. 84.
- [12] Erste Produktanalysen zeigen, daß in Abhängigkeit von der eingesetzten NO-Menge aus den Nitroxid-Radikalen neben dem zugehörigen Hydroxylamin-Derivat mehrere (> 6) Nitroso- und Nitro-substituierte Produkte, z. T. über Ringöffnungsreaktionen, entstehen. Über die detaillierte Produktstudie wird in einer ausführlichen Originalmitteilung berichtet werden.
- [13] S. A. Green, D. J. Simpson, G. Zhou, P. S. Ho, N. V. Blough, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7337–7346.
- [14] (*Z*)-1-{*N*-[3-Aminopropyl]-*N*-[4-(3-aminopropylammonio)-butyl]amino}-diazien-1-iun-1,2-diolat: J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1472–1476.

Sigmatrope Verschiebungen bei Allenoxid-Umlagerungen: der erste allgemeine Zugang zu [3,4]-Verschiebungen in aliphatischen Systemen**

Ihsan Erden,* Fu-Pei Xu und Wei-Guo Cao

Bei thermischen Umlagerungen gesättigter Fulvenendoperoxide konnten wir zuerst Allenoxid- und Cyclopropanon-Zwischenstufen durch inter- und intramolekulare Abfangreaktionen nachweisen.^[1] Anschließend haben wir durch die Isolierung und Charakterisierung eines stabilen Derivats von **3** das Auftreten von Allenoxiden als Zwischenstufen in diesen Isomerisierungen gesichert ($R^1 = tBu$, $R^2 = H$).^[2] Der Mechanismus der Fulvenendoperoxid-Allenoxid-Isomerisierung war somit vollständig aufgeklärt (Schema 1).

Anwendungen der Endoperoxid-Allenoxid-Umlagerungen in der Synthese wurden danach von uns beschrieben, wobei von Säureabfangreaktionen und intramolekularen Vinylcyclopropanon-Cyclopentenon-Cyclisierungen Gebrauch gemacht wurde.^[3, 4] Bei ähnlichen intramolekularen Abfangreaktionen ha-



Schema 1. Mechanismus der thermischen Umlagerung von gesättigten Fulvenendoperoxiden.

ben wir nun einen neuartigen Aspekt der Endoperoxid-Allenoxid-Methodik entdeckt: eine 3-Butenylgruppe an der exocyclischen Doppelbindung der gesättigten Endoperoxide **5** führt dazu, daß diese Verbindungen in CCl_4 bei $60–80^\circ C$ unter sigmatroper [3,4]-Verschiebung der 3-Butenylgruppe zu den 5-Oxo-6-heptenal-Derivaten reagieren (Schema 2).

[3,4]-Verschiebungen wurden erstmals von Schmid und Mitarbeitern bei 1,4-Cyclohexadienol-Benzol-Umlagerungen beobachtet, die mit gleichfalls erlaubten [1,2]- und [3,3]-Verschiebungen konkurrierten.^[5] Aufgrund ihrer erfolglosen Versuche, die Cyclohexadienol-Benzol-Umlagerungen auf acyclische Analo-

[*] Prof. Dr. I. Erden, Dr. F.-P. Xu, W.-G. Cao

Department of Chemistry and Biochemistry

San Francisco State University

1600 Holloway Avenue, San Francisco, CA 94132 (USA)

Telefax: Int. + 415/338-2384

E-mail: ierden@sfsu.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (CHE-8904016) gefördert.