

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik

**Synthese und erste *in vitro*- und *in vivo*-Abschätzungen von
2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin als Dioxin-Analagon**

Kristian W. Fried

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. H. Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. h. c. (RO) A. Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. rer. nat. habil. R. Nießner
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 16.03.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.05.2004 angenommen.

Meiner Familie gewidmet

VORWORT

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Kettrup für seine Unterstützung schon während meines Studiums und vor allem während meiner Promotion. Ich danke ihm sowie Herrn Prof. Rozman und Herrn Dr. Schramm sehr für die Überlassung dieses interessanten, herausfordernden und belohnenden Themas und die Möglichkeit, im Rahmen der GSF/KUMC-Kooperation zu forschen. Darüber hinaus danke ich ihnen auch besonders für die Zeit, Rat und Tat, die sie in meine Ausbildung und Forschung investierten.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Nießner für die Übernahme des Korreferats sowie Herrn Prof. Parlar für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.



Ich danke Frau Prof. Georg für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis im Department of Medicinal Chemistry der University of Kansas (KU), wo ich mit ihrer und Herrn Prof. Duttas Unterstützung die Synthesearbeiten durchführte. Mein Dank gilt somit selbstverständlich auch Herrn Prof. Dutta, sowie besonders auch Frau Dr. Diederich und Herrn Dr. Flaherty. Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. VanderVelde, Frau Neuenswander und Herrn Powell sowie Frau Rork und Frau Knickerbocker.



Ebenso danke ich für das freundliche Willkommen in Herrn Prof. Rozmans Arbeitskreis, Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics des University of Kansas Medical Center (KUMC). Besonders Frau Dipl.-Ing. Lebofsky wie auch Frau Crouch, M.S. gilt mein Dank für ihre technische und freundschaftliche Unterstützung bei meinen dortigen *in vivo*-Studien. Des weiteren danke ich Herrn Prof. Terranova, Herrn Prof. Reed, Herrn Dr. Petroff, Herrn Dr. Son, Frau Peterson sowie dem Ehepaar Smith von Laboratory Animal Resources. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Magher sowie Frau Stanley für ihre Unterstützung und Hilfe bei der Überwindung administrativer Hürden.



Am GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit danke ich darüber hinaus besonders Herrn Prof. Lenoir für sein stetes Interesse und seine Unterstützung. Ich danke auch Frau Dr. Lintelmann für ihre Hilfe beim Neuaufbau der HPLC-Anlage, sowie Herrn Prof. Boos des Instituts für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München für die persönliche Beratung. Frau Dr. Chahbane und Frau LTA Corsten gebührt mein herzlichster Dank für die Durchführung des EROD-Assays, sowie im Verband mit Frau Dr. Hafner und Frau Niklaus für die sehr nette Arbeitsatmosphäre. Herrn Dipl.-Ing. Henkelmann danke ich für die zeitweilige Überlassung der GC/MS Anlage, auch danke ich Herrn Dipl.-Chem. Geyer für die äußerst inspirierenden Gespräche. Weiterhin danke ich Frau Danzer und Frau Ranninger für die freundliche Unterstützung, besonders auch während meiner Forschungszeit in den USA. Frau Dr. Hartmann, Frau Naumann und Frau Trautenmüller danke ich für ihre administrative Hilfe bezüglich meines Auslandsaufenthaltes.

Den Lektoren meiner Arbeit, Herrn Prof. Lenoir, Herrn Dr. Hoffmann, Herrn Dr. Rühl, Frau Dr. Diederich und Herrn Forstassessor Brückner gebührt ebenfalls mein tiefster Dank.

Eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre ergänzte in Deutschland wie auch in den USA meine Freude an der Forschung, und so möchte ich neben bereits im fachlichen Kontext Erwähnten und vielen anderen ganz besonders Martha wie auch Jeremy, Melanie, Rosann, Laszlo, Antje, Andreas, Marcella und Popcorn meinen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte auch meiner Familie danken

- allen voran meiner Frau Martha, meinen Eltern Elke & Wolfgang
und meinem Bruder Jörg - **FÜR ALLES.**

Für die finanzielle Unterstützung danke ich neben GSF und KUMC auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der Mellon Foundation.

Publikationen

1. K. W. Fried, S. A. Saghir, K. K. Rozman
„Dose-Dependent Pharmacokinetics of Monochloroacetic Acid (MCA) in Adult Male Sprague-Dawley Rats“
The Society of Toxicology-Annual Meeting, Toxicologist **1999**, 48, 969.
2. S. A. Saghir, K. W. Fried, K. K. Rozman
„Kinetics of Monochloroacetic Acid in Adult Male Rats after Intravenous Injection of a Subtoxic and a Toxic Dose“
J. Pharmacol. Exp. Ther. **2001**, 296, 617-627.
3. C. R. Croutch, M. Lebofsky, A. DeZoysa, D. S. Son, K. W. Fried,
K. K. Rozman
„Time-Dependence of TCDD- and HxCDD-induced CYP 1A1 Expression as Measured by EROD Activity, Western and Northern Blots“
The Society of Toxicology-Annual Meeting, Toxicologist **2002**, 66, 825.
4. K. W. Fried, X. Gao, B. K. Petroff, K.-W. Schramm, P. F. Terranova,
K. K. Rozman
„Effect of Chlorinated Phenothiazines on Ovulation in Rats“
The Society of Toxicology-Annual Meeting, Toxicologist **2002**, 66, 835.
5. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind Grundlage der
United States Patent Application, **2004**
„Phenothiazine Derivatives and Their Method of Use“.

Auszeichnungen und Stipendien

- *Fonds der Chemischen Industrie:*
Preis zur Abiturzensur in Chemie 1993.
- *Ludwig-Maximilians-Universität München:*
Austauschstipendium zur Kansas State University, USA 1997/98.
- *J. William Fulbright Foreign Scholarship & United States Information Agency:*
Travel Grant 1997/98.
- *The University of Kansas Medical Center:*
Summer Research Internship 1998.
- *Deutscher Akademischer Austauschdienst DAAD:*
Auslandsstipendium für Doktoranden 2001/02.
- *The University of Kansas Medical Center:*
Graduate Student Travel Scholarship to the
Annual Meeting of the Society of Toxicology 2002.

INHALTSVERZEICHNIS

1	HINTERGRUND.....	1
1.1	EINLEITUNG	1
1.2	NOMENKLATUR.....	2
1.2.1	<i>Dioxine</i>	2
1.2.2	<i>Phenothiazine</i>	3
1.3	GESCHICHTE	4
1.3.1	<i>Dioxine</i>	4
1.3.2	<i>Phenothiazine</i>	7
1.4	DARSTELLUNG.....	9
1.4.1	<i>Bildung von Dioxinen</i>	9
1.4.2	<i>Synthese von Phenothiazinen</i>	11
1.5	EIGENSCHAFTEN.....	12
1.5.1	<i>Dioxine</i>	12
1.5.1.1	Physiko-chemische Eigenschaften und Strukturparameter	12
1.5.1.2	Vorkommen.....	12
1.5.1.3	Umweltverhalten.....	14
1.5.2	<i>Phenothiazine</i>	15
1.6	METABOLISIERUNG.....	15
1.6.1	<i>Dioxine</i>	15
1.6.2	<i>Phenothiazine</i>	16
1.7	PHARMAKO-/ TOXIKOKINETIK.....	16
1.7.1	<i>Dioxine</i>	16
1.7.2	<i>Phenothiazine</i>	17
1.8	TOXIZITÄT.....	17
1.8.1	<i>Toxizitäts-Äquivalenz-Konzept</i>	17
1.8.2	<i>Dioxine</i>	18
1.8.2.1	Symptome von TCDD-Exposition.....	18
1.8.2.2	Letalität	19
1.8.2.3	Reproduktive Effekte	20
1.8.2.4	Mechanismus	21
1.8.3	<i>Phenothiazine</i>	22
1.8.3.1	Allgemein	22
1.8.3.2	Reproduktive Effekte	22
1.9	INDUKTION VON ENZYMAKTIVITÄT.....	23
1.9.1	<i>Dioxine</i>	23
1.9.2	<i>Phenothiazine</i>	24
1.10	HORMETISCHE EFFEKTE DER DIOXINE.....	25
1.10.1	<i>Immunsystem</i>	25
1.10.2	<i>Kanzerogenität</i>	25
2	AUFGABENSTELLUNG	27
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	SYNTHESE - EXPERIMENTALANSÄTZE.....	29
3.1.1	<i>Untersuchungen an einstufigen Synthesen</i>	31
3.1.1.1	Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure.....	31
3.1.1.2	Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel.....	32

3.1.1.3	Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.....	33
3.1.2	<i>Untersuchungen an zweistufigen Synthesen</i>	33
3.1.2.1	N-Formylierung von Phenothiazin und anschließende Chlorierung.....	33
3.1.2.2	N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid und anschließende Chlorierung.....	34
3.1.2.3	Bildung des Diarylamins und anschließende intramolekulare Reaktion.....	35
3.1.2.4	Bildung des Diarylsulfids und anschließende intramolekulare Reaktion.....	37
3.1.3	<i>Untersuchungen an dreistufigen Synthesen</i>	40
3.1.3.1	Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension.....	40
3.1.3.2	Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin.....	40
3.1.3.3	Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.....	43
3.1.4	<i>Untersuchungen an vierstufigen Synthesen</i>	49
3.1.4.1	Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol durch basische Suspension.....	49
3.1.4.2	Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin.....	49
3.1.4.3	Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung.....	49
3.1.4.4	Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung.....	50
3.2	SYNTHESE – KINETIKSTUDIEN ZUR BILDUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN.....	51
3.2.1	<i>Variation der Katalysatorenzugabe bei der Ullmann-Kupplung</i>	51
3.2.1.1	Einmalige Zugabe der Katalysatoren.....	52
3.2.1.2	Sukzessive Zugabe der Katalysatoren nach jedem zweiten Tag.....	52
3.2.1.3	Tägliche Zugabe der Katalysatoren.....	52
3.2.2	<i>Zeitlicher Verlauf unter optimierten Reaktionsbedingungen</i>	52
3.3	SYNTHESE – GROßMAßSTAB.....	53
3.3.1	<i>Synthese von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol</i>	53
3.3.2	<i>Synthese von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid aus 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid</i>	54
3.3.3	<i>Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid</i>	55
3.3.4	<i>Geräte</i>	56
3.3.5	<i>Feststoffe</i>	57
3.3.6	<i>Flüssigkeiten</i>	58
3.4	KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE.....	58
3.5	GASCHROMATOGRAPHIE/MASSENSPEKTROMETRIE.....	59
3.6	UV/VIS-SPEKTROSKOPIE.....	59
3.7	ELEMENTARANALYSE.....	59
3.8	EINKRISTALL-RÖNTGENSTRUKTURANALYSE.....	60
3.9	IN VITRO-STUDIEN.....	61
3.9.1	<i>Hintergrund in vitro</i>	61
3.9.2	<i>Anwendung EROD-Bioassay</i>	62
3.10	IN VIVO-STUDIEN.....	62
3.10.1	<i>Akute Letalität</i>	63
3.10.1.1	Akute perorale Letalität.....	63
3.10.1.2	Akute intravenöse Letalität.....	64
3.10.2	<i>Ovulationsstudien</i>	65

3.10.3	<i>Kinetik von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Serum</i>	66
3.10.3.1	Intravenöse Dosierung	66
3.10.3.2	Perorale Dosierung	67
3.10.3.3	Probenahme und -aufarbeitung	68
3.11	HPLC-ANALYTIK.....	68
3.11.1	<i>Hintergrund Alkyl-Diol-Silica Technologie</i>	68
3.11.2	<i>Anwendung Alkyl-Diol-Silica-Technologie</i>	71
3.11.3	<i>Herstellung der Standards</i>	75
3.11.4	<i>Messung</i>	76
3.11.5	<i>Auswertung</i>	76
3.12	SICHERHEITSHINWEISE	77
4	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	78
4.1	SYNTHESE - EXPERIMENTALANSÄTZE.....	78
4.1.1	<i>Untersuchungen an einstufigen Synthesen</i>	78
4.1.1.1	Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure.....	78
4.1.1.2	Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel	80
4.1.1.3	Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.....	82
4.1.2	<i>Untersuchungen an zweistufigen Synthesen</i>	83
4.1.2.1	N-Formylierung von Phenothiazin und anschließende Chlorierung.....	83
4.1.2.2	N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid und anschließende Chlorierung	85
4.1.2.3	Bildung des Diarylamins und anschließende intramolekulare Reaktion.....	86
4.1.2.4	Bildung des Diarylsulfids und anschließende intramolekulare Reaktion	88
4.1.3	<i>Untersuchungen an dreistufigen Synthesen</i>	92
4.1.3.1	Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension.....	92
4.1.3.2	Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin	93
4.1.3.3	Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.....	97
4.1.4	<i>Untersuchungen an vierstufigen Synthesen</i>	104
4.1.4.1	Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol durch basische Suspension	104
4.1.4.2	Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin	104
4.1.4.3	Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung.....	104
4.1.4.4	Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung	107
4.1.5	<i>Zusammenfassung der Syntheseveruche</i>	108
4.2	SYNTHESE – KINETIKSTUDIEN ZUR BILDUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN.....	110
4.2.1	<i>Variation der Katalysatorenzugabe zur Ullmann-Kupplung</i>	110
4.2.1.1	Einmalige Zugabe der Katalysatoren.....	110
4.2.1.2	Sukzessive Zugabe der Katalysatoren an jedem zweiten Tag	111
4.2.1.3	Tägliche Zugabe der Katalysatoren.....	112
4.2.2	<i>Zeitlicher Verlauf der Ullmann-Kupplung unter optimierten Reaktionsbedingungen</i>	114
4.3	SYNTHESE – GROBMAßSTAB	116
4.3.1	<i>Synthese von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol</i>	116
4.3.2	<i>Synthese von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid aus 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid</i>	116

4.3.3	<i>Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlordiphenylsulfid</i>	117
4.4	CHARAKTERISIERUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN.....	118
4.4.1	<i>Kernresonanz-Spektroskopie</i>	119
4.4.2	<i>Gaschromatographie/Massenspektrometrie</i>	119
4.4.3	<i>UV/VIS-Spektroskopie</i>	120
4.4.4	<i>Elementaranalyse</i>	121
4.4.5	<i>Einkristall-Röntgenstrukturanalyse</i>	122
4.5	IN VITRO-STUDIEN.....	124
4.6	AKUTE LETALITÄT.....	125
4.6.1	<i>Akute perorale Letalität</i>	125
4.6.2	<i>Akute intravenöse Letalität</i>	126
4.7	OVULATIONSSTUDIEN	127
4.8	HPLC-ANALYTIK.....	128
4.8.1	<i>Methodenentwicklung</i>	128
4.9	KINETIK.....	129
4.9.1	<i>Intravenöse Dosierung</i>	129
4.9.1.1	<i>Ratte i.v. 5 mg/kg TCPT</i>	130
4.9.1.2	<i>Ratte i.v. 10 mg/kg TCPT</i>	131
4.9.1.3	<i>Meerschweinchen i.v. 10 mg/kg TCPT</i>	133
4.9.2	<i>Perorale Dosierung</i>	136
5	DISKUSSION	137
5.1	SYNTHESE.....	137
5.2	EIGENSCHAFTEN 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN	143
5.3	EROD-BIOASSAY.....	143
5.4	TOXIZITÄT.....	143
5.5	OVULATION	146
5.6	KINETIK.....	146
5.7	FAZIT: 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN ALS DIOXIN-ANALOGON.....	149
6	AUSBLICK	150
6.1	SYNTHESE.....	150
6.2	TOXIKOLOGISCHE STUDIEN.....	151
7	ZUSAMMENFASSUNG	154
8	ABSTRACT	155
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	156
10	ANHANG	159
10.1	ORIGINAL-DATENSATZ ZUR EINKRISTALL-RÖNTGENSTRUKTURANALYSE.....	159
10.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	164
10.3	FORMELVERZEICHNIS.....	166
10.4	GLEICHUNGENVERZEICHNIS	166
10.5	SCHEMATAVERZEICHNIS	167
10.6	TABELLENVERZEICHNIS.....	168
10.7	LITERATURVERZEICHNIS.....	169

CESSANTE CAUSA CESSAT EFFECTUS

1 HINTERGRUND

1.1 EINLEITUNG

Dioxine sind bekannte Umweltchemikalien, die sich durch Chemieunfälle und andere anthropogene Emissionen sowie durch hohe biosphärische Persistenz, Lipophilie, und daraus resultierende Anreicherung in der Nahrungskette einen zweifelhaften Namen gemacht haben. Der potenteste Vertreter, 2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD), ist etwa zehntausendmal toxischer als Zyanid, doch wird seine Giftigkeit noch um mehrere Zehnerpotenzen durch die natürlicher Bakterientoxine übertroffen*. Der genaue *in vivo*-Wirkmechanismus der Dioxine ist bis heute umstritten. Weniger bekannt als ihre hohe Toxizität sind die bei niedriger Dosierung auftretenden, für den Organismus förderlichen Effekte.

Phenothiazine wurden schon vor Jahrhunderten zur Seidenfärberei verwendet. In der Geschichte ihrer über 125-jährigen synthetischen Herstellung wurden bedeutende pharmakologische Eigenschaften verschiedener Derivate entdeckt, die in der Medizin breite Anwendung finden. Der prominenteste Vertreter dieser Substanzklasse ist Chlorpromazin, welches in den 1950er Jahren den Anfang moderner Psychopharmakologie begründete.

So verschieden beide Substanzklassen auf diesen ersten Blick zu sein scheinen, teilen sie doch wesentliche strukturelle Merkmale miteinander (Abbildung 1-1).

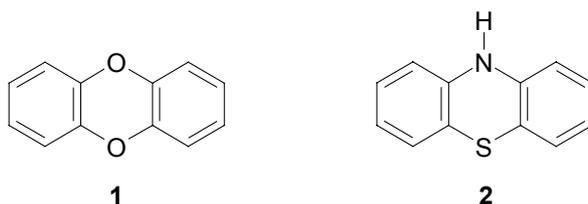


Abbildung 1-1:
Strukturformeln von unsubstituiertem Dioxin (1) und Phenothiazin (2).

* Spezies-abhängige, ungefähre Werte.

1.2 NOMENKLATUR

1.2.1 Dioxine

Als Dioxine werden die in Abbildung 1-2 dargestellten polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und auch polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs) bezeichnet. Es handelt sich um trizyklische Di- bzw. Monoether chlorierter Arylringe. Symmetriebedingt existieren 75 Isomere der PCDDs und 135 Isomere der PCDFs, die je als Kongenere bezeichnet werden. Hier soll der Begriff „Dioxine“ nomenklaturbedingt auf PCDDs beschränkt werden. Die Beschreibung des Chlorierungsmusters erfolgt anhand der in Abbildung 1-2 dargestellten Atomnummern.

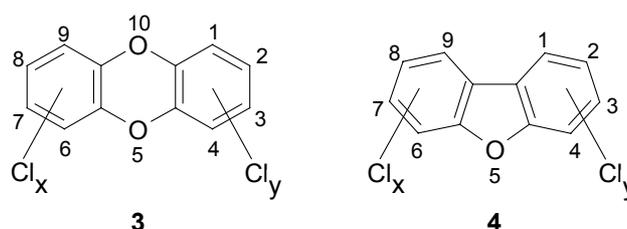


Abbildung 1-2:
Atomnummerierung. Polychloriertes Dibenzo-*p*-dioxin (3) und polychloriertes Dibenzofuran (4).

Die erste als Dioxinsynthese belegbare Veröffentlichung datiert auf Merz und Weith zurück [1]. Sie synthetisierten 1872 eine Verbindung, die sie mit der Summenformel $(C_6OCl_4)_x$ als „Perchlorphenylenoxyd“ bezeichneten. Sandermann benannte diese Verbindung 1957, als er sie bei eigenen Synthesen herstellte und als die bei Merz und Weith gebildete Substanz wiedererkannte, gemäß damaliger Nomenklatur als „Oktachlor-diphenylendioxyd“ [2]. Heute trägt sie die Bezeichnung Octachlordibenzo-*p*-dioxin.

1.2.2 Phenothiazine

Im 19. Jahrhundert wurden Phenothiazine als Thiodiphenylamine bezeichnet [3]. Gegen Mitte des letzten Jahrhunderts überschritten sich unterschiedliche Nomenklaturen, und so wurden sie sowohl Phenthiazine [4,5], als auch Phenothiazine genannt [6] - letzteres schon früher im englischen Sprachraum [7,8]. Die Beschreibung der Substitutionsmuster erfolgt anhand der in Abbildung 1-3 dargestellten Nummerierung der Atome.

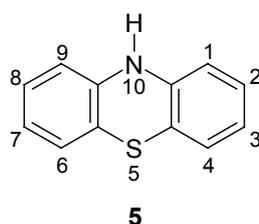


Abbildung 1-3:
Atomnummerierung. Phenothiazin (5).

Medizinisch eingesetzte Phenothiazine werden anwendungsbezogen anhand ihrer N-Substituenten in drei Klassen eingeteilt (siehe Abbildung 1-4).

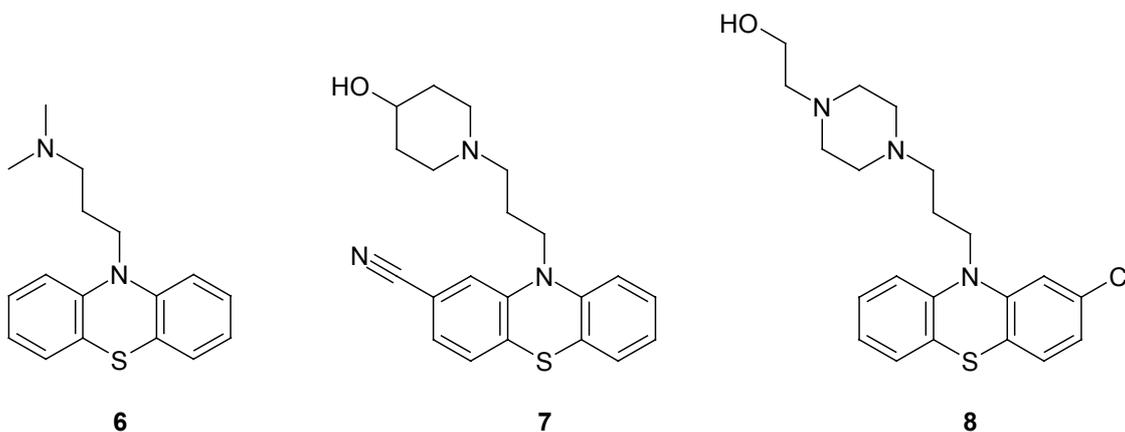


Abbildung 1-4:
Die drei Klassen medizinischer Phenothiazine: Aliphatische Seitenkette (6) (Promazin), Piperidyl Seitenkette (7) (Periciazin), Piperazinyl Seitenkette (8) (Perphenazin).

Phenothiazine mit aliphatischer Seitenkette, z.B. Promazin, Chlorpromazin, Promethazin, sind vor allem stark sedativ wirksam. Solche mit Piperidyl-Seitenkette, z.B. Periciazin, Thioridazin, sind mittelstark sedativ. Piperazinyl-Seitenketten, z.B. in Perphenazin, Fluphenazin, Trifluoperazin, bewirken nur schwache Sedation, besitzen jedoch antihistamine und stark antipsychotische sowie antiemetische Eigenschaften.

1.3 GESCHICHTE

1.3.1 Dioxine

Wilhelm Sandermann arbeitete Mitte des letzten Jahrhunderts als Ordinarius für Holztechnologie der Universität Hamburg im Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Reinbek, Hamburg. Er forschte an Pentachlorphenol (PCP) als fungizides Grundierungsmittel für Holz, um eine Alternative zu den damals verwendeten organischen Quecksilberverbindungen zu entwickeln. Nach der Markteinführung des PCPs kam es rasch zu berufsbedingten Krankheitsbildern bei exponierten Arbeitern, v.a. in der Fertigung von Spanplatten mittels Heißpresse. Bei der Untersuchung der Pyrolyse von PCP stieß Sandermann auf Octachlordibenzo-*p*-dioxin (OCDD), welches bereits seit 1872 bekannt war ^[1]. In Folge synthetisierte er 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) – ohne sich des neuen, tetrachlorierten Kongeners zunächst bewußt zu sein. Die Synthese des Dioxin-Grundgerüsts, welches durch Sandermann chloriert wurde, erfolgte analog der bereits 1906 beschriebenen ^[9] und von der damaligen Firma Bayer & Co. patentierten Route ^[10] über die Kondensation von Guajacol*. Untersuchungen an der neu synthetisierten Substanz auf ihre biologische Aktivität zeigten, daß sie im Gegensatz zu OCDD eine starke Wirkung gegen Termiten und Bläuepilze aufwies. Dies führte zur letztendlichen Entdeckung von TCDD, welches sich zum prominentesten Vertreter

* Guajacol = o-Methoxyphenol

einer ganzen Substanzklasse entwickeln sollte. Aufgrund der festgestellten extremen Giftigkeit von TCDD auch bei Mitarbeitern verbot das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Sandermann eine Veröffentlichung eigens über TCDD sowie weitere Forschung und stimmte lediglich der Erwähnung dieser Substanz in einer Publikation über PCP zu, welche 1957 veröffentlicht wurde [2]. Das Verbot basierte auf der Sorge um einen möglichen Mißbrauch als Kampfmittel sowie um die Sicherheit der Mitarbeiter und des Institutes [11]. So schloß Sandermann seine Veröffentlichung über die Pyrolyse von PCP mit den Worten: „*Da diese Verbindung (TCDD) sehr leicht Chlorakne auslöst, lud sie nicht zu weiteren Versuchen ein*“. Jedoch nicht ohne zu erwähnen: „*Während Perchlorbenzol und Oktachlor-diphenylendioxyd (OCDD) gegen holzerstörende Pilze und Insekten unwirksam waren, war Tetrachlor-diphenylendioxyd (TCDD) sehr wirksam*“.

Als erste brachten Kimmig und Schulz TCDD mit berufsbedingten Erkrankungen von Chemikern in Verbindung [12-14]. Schulz untersuchte in Zusammenarbeit mit dem Leiter eines chemischen Betriebs, Sorge, Arbeiter, die nach Exposition mit Trichlorphenol und Trichlorphenoxyessigsäure-Herbiziden Chlorakne aufwiesen. Durch Untersuchung eines chemisch-technischen Assistenten aus Sandermanns Labor zur gleichen Zeit wurden die Symptome als identisch befunden, wodurch letztlich auf TCDD als Verursacher geschlossen werden konnte.

Während des Vietnamkriegs wurde 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) als aktiver Bestandteil der Entlaubungsmittel Dinoxol, Trinoxol, Agent Green, Pink und Purple (1962-1964) sowie Agent Orange (1965-1970) und Orange II (1968-1969) eingesetzt. Bei der Verwendung der n-Butylester von 2,4,5-T und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) im Verhältnis 1:1 in den Agent Orange Mischungen wirkten beide Auxin-Analoga synergistisch [15], was zur fragwürdigen Berühmtheit dieser Mischung führte. So stellte Agent Orange über 80 % der im Vietnamkrieg verwendeten Herbizide dar. Laut US Air Force Research Laboratory wurden 41,6 Millionen Liter Agent Orange zwischen Januar 1965 und April 1970 als Entlaubungsmittel über Vietnam ausgebracht.

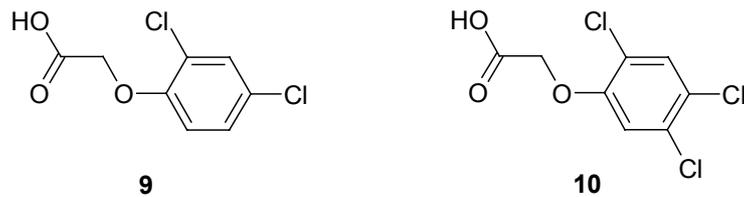


Abbildung 1-5:
Hauptbestandteile von Agent Orange: 2,4-D (9) und 2,4,5-T (10).

Erst spät wurde TCDD als Nebenprodukt der 2,4,5-T Präparationen identifiziert; bei Konzentrationen von 0,1-47 µg TCDD/g Agent Orange ^[16] waren etwa 166 kg TCDD unkontrolliert über Vietnam ausgebracht worden ^[17]. Mit öffentlichem Bekanntwerden dieser TCDD-Kontamination in Agent Orange sowie Erkrankungen von Veteranen setzte die Forschung und Publikationsflut über Dioxine ein ^[11].

In der chemischen Industrie hatten schon lange vor Vietnam dutzende Unfälle mit TCDD-Exposition von Arbeitern stattgefunden ^[11]. Doch ein Unfall in Meda nahe Seveso, Norditalien, am 10. Juli 1976 avancierte zum bekanntesten ^[18]. Bei der Herstellung von 2,4,5-T kam es durch Überhitzung der Anlage zur Entstehung und Freisetzung von TCDD. Schätzungen der freigesetzten Menge reichen von 300 g ^[19] bis zu mindestens 34 kg ^[20] TCDD. Am anerkanntesten ist die Annahme von ca. 1,3 kg TCDD, welches ein Gebiet von 2,8 km² mit etwa 37.000 Menschen kontaminierte ^[21].

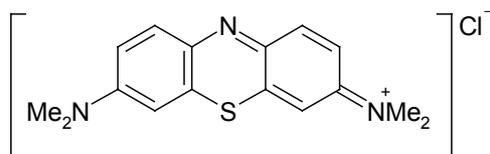
Exposition findet jedoch nicht nur durch direkte Kontamination, sondern auch indirekt über die Nahrungskette statt. Die Beispiele in Deutschland reichen bis in die jüngste Vergangenheit zurück ^[22]: Zwischen dem 20. November 2002 und 31. Januar 2003 gelangten 1188,5 t mit Dioxinen kontaminierte Backreste als Futtermittel thüringischer Produktion an bundesweit 27 Agrarbetriebe. Der Grenzwert im Fett damit gefütterter Schweine wurde z.T. um das Doppelte überschritten. Tausende Schweine und 12.000 Enten mußten vernichtet werden. Schon im darauf folgenden April 2003 gelangten erneut 2000 t kontaminiertes Mischfutter aus einem

Trockenwerk in Brandenburg an 39 deutsche Betriebe. Meßwerte im Futter lagen mit 5 ng/kg weit über dem Grenzwert von 0,1 ng/kg.

Dioxine sind somit kein Thema vergangener Tage oder von Chemieunfällen, sondern vielmehr allgegenwärtig. Das Spektrum ihrer Effekte von niedriger bis hoher Exposition ist so komplex, daß weitere Forschung an Dioxinen unverzichtbar ist.

1.3.2 Phenothiazine

Im Jahre 1876 gelang Heinrich Caro bei Bayer die erste synthetische Herstellung des Phenothiazin-Farbstoffs Methylenblau (Abbildung 1-6). 1877 erhielt er dafür das erste deutsche Reichspatent auf dem Farbengebiet [23]. Als Farbstoffe spielen Phenothiazinderivate auch heute noch eine Rolle, u.a. zur Vitalfärbung von Gewebe vor operativen Eingriffen [24].



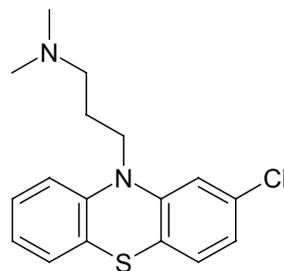
11

Abbildung 1-6:
Methylenblau (11), das erste synthetisch hergestellte Phenothiazin.

Paul Ehrlich erkannte 1891 eine mögliche Eignung von Methylenblau als Malariamittel [25], doch stellten sich Phenothiazine 1944 letztendlich als nicht geeignet heraus [26]. 1946 wurde in Frankreich die starke Wirkung von Promethazin als Antihistaminikum entdeckt. Somit war der erste größere medizinische Anwendungsbereich gefunden, in dem die Phenothiazine auch im Vergleich zu neueren Medikamenten noch heute effektiv eingesetzt werden [27]. Aufgrund sedativer Eigenschaften und Anzeichen von Besserung in mit Phenothiazin-Antihistaminika behandelten Parkinson-Patienten rief Paul Koetsch der Firma Rhône-Poulenc im Oktober 1950 die Untersuchung von Wirkungen der

Phenothiazine am zentralen Nervensystem ins Leben. Paul Charpentier synthetisierte daher Chlorpromazin, das nach nur dreimonatigen Laborstudien 1951 in die klinische Testphase gebracht wurde (Abbildung 1-7).

Im April 1951 wurden seine Eigenschaften zur potenzierten Narkose durch Schneider entdeckt. Im Juni des selben Jahres berichtete der Chirurg Henri Laborit von einem „Dämmerungszustand“, in den Patienten nach Erhalt eines zur postoperativen Stabilisation verabreichten Chlorpromazingemischs verfielen. Er erkannte als erster die psychotropen Eigenschaften der Phenothiazine [26].



12

Abbildung 1-7:
Chlorpromazin (12), prominentestes Phenothiazin.

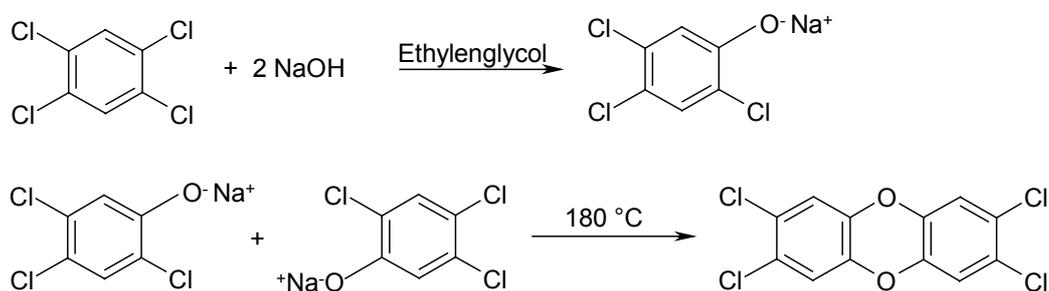
Bereits seit 1949 waren Lithium-Salze von Cade als erste moderne Psychopharmaka untersucht worden, doch erlangten sie aus Bedenken bezüglich möglicher Toxizität keine schnelle Anerkennung in der Medizin. Chlorpromazin und die zunehmende Anzahl seiner Derivate hingegen fanden mit ihrer Einführung Mitte der 1950er Jahre sofort breite Anwendung und werden heute als der Anfang moderner Psychopharmakologie angesehen [28].

1.4 DARSTELLUNG

1.4.1 Bildung von Dioxinen

Dioxine werden nur zu wissenschaftlichen Zwecken in geringen Mengen gezielt synthetisiert. Grundsätzlich stellt die Bildung der Dioxine eine unerwünschte Nebenreaktion dar. Hier ist zwischen den Großquellen naßchemische und thermische Prozesse zu unterscheiden.

Dioxine können als Nebenprodukte bei der Synthese organischer Chlorverbindungen auftreten, z.B. wie in Seveso als Folgereaktion bei der Herstellung von 2,4,5-T (Schema 1-1). Grundsätzlich stellen erhöhte Temperaturen ($>150\text{ °C}$), basische Bedingungen (v.a. bei Aufreinigungsprozessen) und UV-Bestrahlung bzw. die Gegenwart anderer Radikalstarter besonders günstige Bildungsbedingungen für Dioxine in der synthetischen Chlorchemie dar.



Schema 1-1:
Chemische Bildung von TCDD in Lösung als Nebenprodukt bei der Synthese von 2,4,5-T.

Zur thermischen Entstehung von Dioxinen bei technischen Verbrennungsprozessen existieren zwei Theorien, die in Übersichtsartikeln gegenübergestellt wurden ^[29-31]: Die *de novo*-Bildung ^[32] und die Precursor-Theorie ^[33]. *De novo* steht für die Neubildung von Dioxinen aus elementarem Kohlenstoff, der als Ruß (particulate carbon) in Flugaschestäuben z.B. im Abgasstrom von Müllverbrennungsanlagen ubiquitär ist. Die Bildung findet bevorzugt in einem Temperaturfenster von 250-650 °C statt, was der Betriebstemperatur früherer Elektrofilter von

Verbrennungsanlagen entspricht. Die Entstehung basiert auf der gestörten aromatischen Graphitstruktur des Rußes, aus der sich in Gegenwart von Katalysatoren wie Kupfer Dioxine bilden [29]. So konnte auch eine Abhängigkeit der PCDD-Konzentration von der Kohlenstoffkonzentration in Flugaschen festgestellt werden [34]. Die Precursor-Theorie hingegen geht bei der Dioxin-Bildung von Vorläufermolekülen aus. So konnten z.B. Chlorbenzole als Leitparameter für die Dioxinbildung identifiziert werden [35]. *Ab initio* Studien des Mechanismus haben ergeben, daß eine direkte Kondensation von Trichlorphenol (Ullmann-Kupplung) der radikalischen Bildung energetisch bevorzugt ist [36]. Die Precursor-Theorie kann jedoch bis auf Ethanderivate als Vorläufermoleküle ausgedehnt werden, da diese wiederum bei ihrer Verbrennung Chloraromaten und Dioxine bilden können [37-39]. Darüber hinaus kann auch Kohlenstoff die Bildung von Dioxinen aus Vorläufermolekülen katalysieren [33]. Insgesamt verläuft zwar die direkte Bildung von Dioxinen aus Precursor-Molekülen um den Faktor 10^2 - 10^5 schneller als die *de novo*-Bildung [29,31], doch im Hinblick auf die Vernetzung beider Mechanismen erscheint eine Unterscheidung zur Gewichtung beider Bildungswege bedeutungslos [31].

Neben der Bildung von Dioxinen in Müllverbrennungsanlagen stellen diese jedoch auch Dioxin-Senken dar, da die z.B. im Hausmüll enthaltenen Dioxine (50-100 ng TEQ*/kg) im Brennraum zunächst quantitativ zersetzt werden [30].

PCDDs werden auch biogen gebildet, z.B. bei biologischen Abbauprozessen im Klärschlamm kommunaler Kläranlagen [40,41]. Selbst in Klärschlamm-Proben von 1933, also von vor Beginn der großtechnischen Produktion chloraromatischer Verbindungen, konnten Dioxine nachgewiesen werden [42]. Es ist allerdings auch die biogene Bildung aus Precursor-Molekülen wie z.B. Chlorphenolen bekannt [43]. Dioxine können sich darüber hinaus auch photochemisch aus Precursor-Molekülen

* Siehe Kapitel 1.8.1

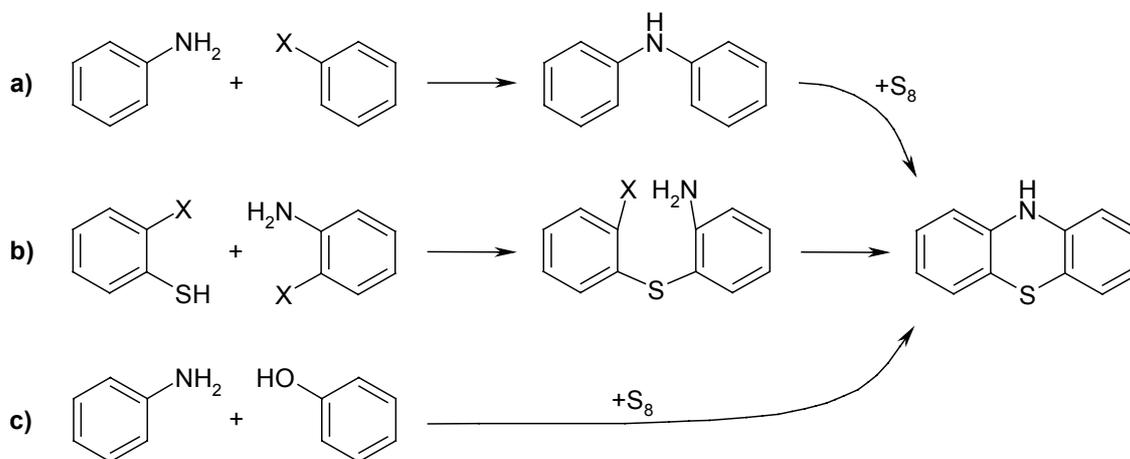
sowie durch Dechlorierung höherchlorierter Kongenere bilden [44]. Diverse weitere natürliche Bildungswege werden angenommen [45].

1.4.2 Synthese von Phenothiazinen

Phenothiazine werden heute fast ausschließlich synthetisch hergestellt. Zum Aufbau des Trizyklus existieren grundsätzlich drei Wege (Schema 1-2):

- Zyklisierende Dehydrierung des Diarylamins bei Einbau von Schwefel,
- Bildung des Thioethers mit anschließender Aminkupplung oder
- „gleichzeitige“ doppelte Bindungsbildung zwischen zwei Arylen.

Bezüglich individueller Reaktionsbedingungen sei an dieser Stelle auf begleitende Ausführungen in Kapitel 4 verwiesen. Die Einbringung der in der traditionellen medizinischen Verwendung obligatorischen Stickstoff-Substituenten erfolgt über klassische Amins substitution und soll im Hinblick auf die vorliegende Themenstellung hier nicht weiter vertieft werden.



Schema 1-2:

Synthesewege zum Phenothiazingerüst. a) Über das Diarylamin, b) über den Diarylthioether, c) einstufig mit doppelter Bindungsbildung.

1.5 EIGENSCHAFTEN

1.5.1 Dioxine

1.5.1.1 *Physiko-chemische Eigenschaften und Strukturparameter*

Die molare Masse von TCDD beträgt 321,97 g/mol, der Schmelzpunkt von TCDD liegt bei 305-307 °C. Es ist schlecht wasserlöslich (7,9 ng/l), jedoch gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln wie Chloroform (370 mg/l) und Benzol (570 mg/l). So verfügt TCDD auch über einen hohen Verteilungskoeffizient K_{ow} von $6,2 \cdot 10^6$. TCDD ist inert gegen Säuren und Basen [17]. Es hat bei 25 °C den niedrigen Dampfdruck von $9,9 \pm 0,5 \cdot 10^{-8}$ Pa [46]. PCDD/Fs thermolysieren ab 850 °C in wenigen Minuten fast quantitativ [30].

Das unsubstituierte Dioxin wurde im Kristall als planar [47] bzw. nur gering von der Planarität abweichend [48] bestimmt. Mit seinen vier Chlorsubstituenten ist auch TCDD fast vollkommen planar [49]. Kein Kohlenstoff- oder Sauerstoffatom weicht mehr als 0,018 Ångström (Å) von der Ebene des Trizyklus ab.

1.5.1.2 *Vorkommen*

Dioxine entstanden schon vor anthropogener Einflußnahme u.a. durch biogene Bildung* und Verbrennung organischen Materials in Gegenwart ubiquitärer Chlordonoren. Nach neuesten Untersuchungsergebnissen werden z.B. bei Waldbränden durchschnittlich 20 ng TEQ[†]/kg Biomasse freigesetzt [50].

Nicht-anthropogenen Ursprungs sind auch PCDDs, die vor der australischen Küste detektiert wurden. Entlang der gesamten, vorwiegend ländlich geprägten Küstenlinie von Queensland (ca. 2000 km) wurde ein erhöhter PCDD-Gehalt im

* Siehe Kapitel 1.4.1

† Siehe Kapitel 1.8.1

Sedimenten festgestellt ^[51]. Die Konzentrationen von OCDD ^[52] lagen hierbei sogar noch über Konzentrationen, die 1993 in Elbe-Sediment gefunden worden waren ^[53]. Untersuchungen ergaben identische Kongenerenmuster aller Proben vor Queensland, welche bis auf das 17. Jahrhundert zurückdatierten und keinem bekannten anthropogenen Prozeß zugeordnet werden konnten ^[54]. Das Kongenerenprofil mit hohem OCDD-Anteil bei Abwesenheit von PCDFs entsprach jedoch dem in prähistorischen (40-45 Mio. Jahre) Tonsedimenten aus den USA (Mississippi) ^[55] und Deutschland ^[56]. Das selbe Muster wurde auch in 1-10 Mio. Jahre altem Sediment vor den Küsten Chinas ^[57] und in über 8000 Jahre altem Sediment vor der japanischen Küste ^[58] gefunden. Es wird ein geogener Ursprung vermutet.

Wie aus Sedimenten von Schwarzwald-Seen ^[59] sowie den Großen Seen (USA) erkennbar, setzten starke Dioxin-Emissionen jedoch erst in den 1920er bzw. 1940er Jahren ein, was zeitlich mit dem dortigen Beginn der organischen Chlorchemie und somit der Herstellung, Verwendung und Beseitigung chlorierter Produkte zusammenfiel. Die gefundenen Kongenerenmuster entsprachen den Profilen aus Verbrennungsprozessen und Metallindustrie, wodurch diese als Primärquellen identifiziert wurden ^[59, 60]. Historische Bodenproben aus dem schon früher industrialisierten England zeigten dort einen Anstieg der PCDD/Fs schon um 1890 an, was auf Verbrennungsprozesse aus zunehmender Industrie mit hohem Energiebedarf (Metallindustrie) zurückgeführt wird ^[61].

Die Dioxin-Emissionen erreichten in den 1960/70er Jahren in Europa und den USA ein Maximum und fallen seit den späten 1970er ^[62] bzw. 1980er ^[59] Jahren stetig ab. Das Absinken während der letzten 20 Jahre liegt vor allem in nachhaltiger Prozeßregulation begründet, z.B. bei der thermischen Abfallverwertung. In Deutschland verringerten sich die Emissionen aus Hausmüllverbrennungsanlagen von jährlich 400 g TEQ* in 1988/89 auf 4 g TEQ in 1997 ^[63]. Insgesamt wurden 1990 in Deutschland 1.200 g TEQ freigesetzt, 1995 waren es noch 334 g TEQ ^[64]. Aktuellsten

* Siehe Kapitel 1.8.1

Schätzungen zur Folge ^[65] kam es im Jahr 2000 zu einer gesamtdeutschen Emission von <<70 g TEQ, wovon metallproduzierende und -verarbeitende Betriebe über die Hälfte ausmachten.

Zur Erstellung sog. Dioxin- und Furan-Inventare haben die Vereinten Nationen im Rahmen des United Nations Environment Programme (UNEP) im Jahr 2003 eine umfassende Berechnungsgrundlage geschaffen ^[66], die den einzelnen Ländern die Erstellung eines standardisierten Emissionsinventars ermöglicht.

Neben bekannten und abschätzbaren Emissionsquellen kommt es auch immer wieder zu unerwarteten Dioxinfreisetzen: Im Jahre 2001 verdoppelten sich die Dioxinmissionen Großbritanniens im Zuge der Bekämpfung von Maul- und Klauenseuche, da die Kapazität der Abdeckereien erschöpft und Tierkörper in Großfeuern verbrannt wurden. Hierbei wird die 100-fache Menge an Dioxinen freigesetzt ^[66].

Zusammenfassend stellen Verbrennungs- und Hochtemperaturprozesse (Mineralindustrie, Metallgewinnung) sowie Chlor (-chemikalien) verwendende Industrie die maßgeblichen Quellen für Dioxine dar.

1.5.1.3 Umweltverhalten

Die Halbwertszeit von TCDD im Boden wurde nach dem Seveso-Unfall auf 9-12 Monate bestimmt ^[18]. In unterschiedlichen Forschungsarealen wurde eine Abhängigkeit der Persistenz vom Klima gefunden: Im heiß-feuchten Florida liegt die Halbwertszeit bei 6,3 Monaten, im trocken-kühleren Utah hingegen bei 11 Monaten ^[67]. Der anaerobe bakterielle Abbau via sog. Dehalorespiration wird als Dekontaminationsmethode für belastete Gebiete untersucht ^[68]. Bei Exposition mit Tageslicht verkürzt sich die Halbwertszeit aufgrund von Photolyse durch direkte oder indirekte Effekte von UV-Strahlung ($\lambda=290$ nm) stark. So liegt die theoretische atmosphärische Halbwertszeit unter photolytischen Bedingungen bei 1 h und unter Reaktion mit \cdot OH-Radikalen bei etwa 8,3 Tagen ^[46]. Die aquatische Persistenz von

TCDD ist abhängig vom Extinktionskoeffizient des Gewässers und unterliegt zudem saisonalen Schwankungen. Sie beträgt zwischen 21 h im Sommer und 118 h im Winter [69].

Aufgrund ihrer metabolischen Persistenz sowie Lipophilie kommt es zur Akkumulation von PCDDs in Lebewesen (v.a. Fettgewebe) und als Folge zur Biomagnifikation.

1.5.2 Phenothiazine

Phenothiazine sind Feststoffe. Unsubstituiertes Phenothiazin hat einen Schmelzpunkt von 185 °C, Chlorpromazin von 175 °C. Chlorpromazin ist gut löslich in Dichlormethan und Hexan. Grundsätzlich wird das physiko-chemische Verhalten der Phenothiazine maßgeblich durch Substituenteneffekte bestimmt. Phenothiazine sind photoinstabil [4] und relativ lipophil.

Schon früh wurde entdeckt, daß Phenothiazine einen gewinkelten Zentralring aufweisen, durch den das Molekül entlang einer beide Heteroatome verbindenden Linie schmetterlingsähnlich gefaltet ist. Erste Schätzungen ergaben schon 1940 eine Abweichung von 10-20 ° [70]. Spätere Untersuchungen an unsubstituiertem Phenothiazin zeigten 21,5 ° bzw. 26,7 ° Abweichung von der Planarität, abhängig von der Kristallform [71]. Auch der Faltungswinkel wird von Substituenten maßgeblich beeinflusst, so weist Chlorpromazin eine Abweichung von der Planarität in Höhe von 40,6 ° auf [72]. Die äquatoriale (intra) Position der N-R Gruppe ist generell bevorzugt [73] (zit. in [74]), [75].

1.6 METABOLISIERUNG

1.6.1 Dioxine

TCDD wird nur langsam metabolisiert. Bei Säugetieren spielt Ringhydroxylierung die größte Rolle [76], die dann die Ausscheidung als Glucuronide ermöglicht. Für den enzymatischen Zugang sind hierfür zwei vicinale,

unsubstituierte Positionen am Arylring erforderlich. Da diese bei 2,3,7,8- und höher chlorierten Dioxinen nicht vorliegen, verfügen vor allem solche Kongenere über große Persistenz in der Biosphäre. In weitaus geringerem Maße finden Cl-Shift und Etherspaltung statt [77].

1.6.2 Phenothiazine

Phenothiazine weisen anhand ihres breiten strukturellen Spektrums an Derivaten unzählige Metabolisierungswege auf. Aufgrund des dieser Arbeit zu Grunde liegenden Analogiegedankens zu PCDDs werden N-Substituenten hier nicht behandelt und diesbezüglich auf weiterführende Literatur verwiesen [78]. Phenothiazine werden leicht und schnell metabolisiert. An den Arylringen findet, wie auch bei den Dioxinen, Ringhydroxylierung statt. Darüber hinaus kann im Vergleich zu den relativ inerten Sauerstoffbrücken des Dioxins das Amin hydroxyliert werden und sich am Thioether das Sulfoxid bzw. Sulfon bilden. Entsprechend oxidativ metabolisierte Produkte der Phase I werden leicht konjugiert und ausgeschieden. Auch wurde bei Chlorpromazin eine Dehalogenierung beobachtet [78].

1.7 PHARMAKO-/ TOXIKOKINETIK

1.7.1 Dioxine

TCDD wird im Menschen nach peroraler Aufnahme zu über 86 % absorbiert [79]. Aufgrund geringer Metabolisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Elimination die Exkretion der Muttersubstanz durch Desquamation im Gastrointestinaltrakt. Die Halbwertszeit von TCDD im Menschen beträgt im Durchschnitt 7,78 Jahre [80]. In Tiermodellen ist die Eliminationshalbwertszeit jedoch wesentlich kürzer, so liegt sie z.B. im Meerschweinchen bei $30,2 \pm 5,8$ Tagen [81]. In Ratten beträgt die Eliminationshalbwertszeit von TCDD in Serum 11,1 Tage [82], die Eliminationshalbwertszeit der von markiertem TCDD stammenden ^{14}C -Aktivität liegt bei 17,4-31 Tagen [83, 84]. Nach intravenöser Dosierung

folgt die Verteilung anfänglich der Perfusionsrate und relativen Organgröße [82], nach etwa 24 h findet in Ratten eine Umverteilung in Leber und Fettgewebe statt [82]. Eine Akkumulierung in Leber und Fett ist auch nach peroraler Dosierung zu beobachten [83].

1.7.2 Phenothiazine

Auch die kinetischen Eigenschaften der Phenothiazine sind abhängig von ihren Substituenten, daher sei an dieser Stelle das prototypische Chlorpromazin vorgestellt:

Die Resorption von Chlorpromazin beträgt im Menschen nach oraler Gabe zwischen 10,5-24,7 % [85] und 32 ± 19 % [86]. Höchste Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe werden nach 1-4 h erreicht. Chlorpromazin liegt stark plasmagebunden vor (95-98 %) und hat eine Eliminationshalbwertszeit von 30 ± 7 h im Menschen [86] und 9,1 h in Ratten [87]. Die klinisch verabreichten Chlorpromazin-Dosen rangieren zwischen 30-2000 mg/d [28]. Chlorpromazin und zahlreiche andere Phenothiazin-Psychopharmaka reichern sich im Gehirn an [87, 88].

1.8 TOXIZITÄT

1.8.1 Toxizitäts-Äquivalenz-Konzept

Die einzelnen Dioxin-Kongenere weisen unterschiedlich starke Toxizität auf, wobei die 2,3,7,8- und höher chlorierten Isomere über die größte Potenz verfügen. Für die relativen Toxizitäten der potentesten Vertreter wurden von WHO und NATO Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren (TEF) bestimmt, bei denen TCDD *per definitionem* gleich eins gesetzt wurde (siehe Tabelle 1-1). Die Verwendung von TEF-Werten erlaubt auch eine Gesamtschätzung der Toxizität von Gemischen. Hierfür werden die TEF-Werte der einzelnen Substanzen gemäß ihres Anteils zum TEQ-Wert (toxic equivalent) summiert.

Tabelle 1-1:
Toxizitäts-Äquivalent Faktoren für PCDDs und PCDFs nach NATO [89] und WHO [90].

Kongener	NATO/CCMS 1988	WHO 1998		
		Mensch/Säuger	Fische	Vögel
2,3,7,8-TCDD	1	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	1	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,5	0,5
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	0,01	0,01
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,01	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01	0,001	<0,001
OCDD	0,001	0,0001	-	-
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1	0,05	1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,01	0,05	0,05	0,1
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5	0,5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	0,01	0,01
OCDF	0,001	0,0001	0,0001	0,0001

1.8.2 Dioxine

1.8.2.1 Symptome von TCDD-Exposition

Sandermann bewahrte das frisch hergestellte TCDD in einer offenen Kristallisierschale auf seinem Schreibtisch auf. Im Laufe der Zeit beobachtete er „Kribbeln und Hautrötungen am Kinn und an den Backen Komedonen und Pusteln“ [11], die durch Schulz^[14] und Kimmig^[12, 13] ausführlich beschrieben wurden. Bekannt war Chlorakne bereits seit 1899^[91], z.T. unter der Bezeichnung Pernakrankheit (auch hervorgerufen durch *perchlorierte Naphthaline*)^[21]. Sie tritt beim Menschen als erstes Symptom von TCDD-Toxizität etwa 2 Wochen nach Exposition in Form von

Follikelschwellung auf. Ab der 3.-5. Woche treten Komedone auf^[18]. Bei dem entsprechenden *in vivo*-Test am Kaninchenohr entsteht nach 2-4 Wochen zuerst eine Entzündung, einige Tage später gefolgt von folliculären Schwellungen und Zystenbildung. Von gemeiner Akne am Menschen ist Chlorakne durch die Schwerpunkte der Beschwerden in und hinter den Ohren, um die Augen, unter den Achseln sowie auf Schultern, Rücken und an Genitalien zu unterscheiden. Zusätzlich treten Hypertrichose und Hyperpigmentation, Braunfärbung der Nägel und Conjunctivitiden auf. Auch litt Sandermann unter „*Mattigkeit, Schlaflosigkeit und deutlichem Gedächtnisschwund*“^[11].

Die höchsten jemals in einem Menschen gemessenen TCDD-Blutwerte (144.000 pg/g Blutfett) stammten von einer Sekretärin, die 1998 in der Universitätsklinik Wien untersucht wurde^[92]. Die Umstände ihrer Exposition mit TCDD sind ungeklärt. Sie wies neben stärkster Chlorakne auch gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen und Appetitlosigkeit auf.

Im weiteren Verlauf der toxischen Wirkung von TCDD zeigen sich systemische Schäden (Leberschädigung, Störung des Fett- und Kohlenhydrat-Stoffwechsels, kardiovaskuläre Effekte, gastrointestinale, urinale und respiratorische Störungen), neurologische Schäden (Neuropathien, beeinträchtigte sensorische Wahrnehmung, Libidoverlust) sowie psychiatrische Effekte (Depressionen)^[18, 93]. Viele dieser Beschwerden treten jedoch auch altersbedingt auf und sind somit nicht immer eindeutig zu identifizieren bzw. zweifelsfrei TCDD zuzurechnen.

1.8.2.2 Letalität

Der Tod nach letalen Dosen von TCDD basiert bei Ratten an progressiv verlaufender Hypoglykämie aufgrund einer Hemmung der Gluconeogenese. Dies äußert sich an einer Gewichtsreduktion („wasting syndrome“) bis zum Tod^[94], der oft erst einige Wochen nach einer letalen Einzeldosis eintritt^[95]. Bei dem Unfall in Seveso wurden tote Vögel schon nach drei Tagen beobachtet,^[18] wobei zu beachten

ist, daß TCDD nicht die einzige freigesetzte Chemikalie war. Herbivore Kleintiere erwiesen sich bei Seveso als empfindlicher als Großtiere. Die für Dioxin-Toxizität empfindlichste Spezies sind Meerschweinchen. Die LD₅₀ von TCDD liegt hier für Männchen bei *p.o.* 2,1 µg/kg [95]. Hamster zeigen die höchste Resistenz mit einer LD₅₀ von TCDD von bis zu 5051 µg/kg [96]. In Ratten beträgt die LD₅₀ von TCDD *p.o.* 22 µg/kg in männlichen und *p.o.* 45 mg/kg in weiblichen Tieren [95], doch weisen sie auch eine starke rassebedingte Empfindlichkeitsbreite auf. Eine Extrapolation der Korrelation von Körperfettanteil und akuter Toxizität verschiedener Spezies läßt auf eine LD₅₀ von 6230 µg/kg im erwachsenen Menschen schließen [97].

1.8.2.3 *Reproduktive Effekte*

In der Literatur sind weitreichende Beispiele reproduktiver Toxizität von TCDD beschrieben [98]. So wurden in Ratten bei einer Dosierung mit 1 µg/kg/d für 13 Wochen morphologische Veränderungen der Ovarien und des Uterus gefunden [99]. TCDD ist in Ratten embryotoxisch [100]; es wurde neben erhöhten Fehl- und Totgeburtenraten auch reduzierte Fruchtbarkeit festgestellt [101]. Auch in weiblichen Affen wurde nach mindertoxischen TCDD-Dosen sowohl von Nicht-Empfängnis als auch Totgeburten berichtet [102-105].

Die schon früh erkannten durch TCDD verursachten Nierenschäden und Gaumenspalten in der Nachkommenschaft exponierter Muttertiere [106] zählen zu den deutlichsten embryotoxischen und teratogenen Effekten [107]. Das NOEL (no observable effect level) liegt für Ratten bei *p.o.* 0,03 µg/kg/d [95]. Bei der Untersuchung polychlorierter aromatischer Kohlenwasserstoffe in einer Zusammensetzung, wie sie in Lebensmitteln gefunden wird, konnte in Ratten ab einer Dosis von 0,8 µg TEQ/kg auch eine signifikante Verzögerung der Pubertät nachgewiesen werden [108].

Jüngere Studien an regulär ovulierenden Ratten legten eine Störung des weiblichen Zyklus in Form von verlängerter Diöstrus-Phase bzw. reduzierter

Ovulationsrate und Ovazahl bei subletalen TCDD-Dosen offen ^[109]. Folgestudien am Modell noch nicht geschlechtsreifer Ratten, bei dem Ovulation durch Injektion von Gonadatropin initiiert wird, zeigten eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen TCDD-Exposition und Zahl der Ova sowie Anzahl der ovulierenden Tiere in der Studie; die gefundene ED₅₀ lag bei 3-10 µg/kg TCDD. Es wird ein Effekt von TCDD an der Hypothalamus-Hypophysenachse sowie direkt an den Eierstöcken vermutet ^[110].

Nach dem Unglück bei Seveso wurden beim Menschen keine über dem europäischen Durchschnitt liegenden Fehlgeburten oder Mißbildungen beobachtet ^[18]. Epidemiologische Untersuchungen bei Seveso zeigten jedoch ein verändertes Geschlechterverhältnis hin zu mehr weiblichen Nachkommen ^[111], wobei die Ursache in einer TCDD-Exposition der väterlichen Seite vermutet wurde ^[112]. Trotz vermeintlich gegenläufiger Ergebnisse bei Operation Ranch Hand ^[113] scheint diese Theorie weiterhin am wahrscheinlichsten ^[114].

1.8.2.4 *Mechanismus*

Der Mechanismus akuter Dioxintoxizität konnte bisher nicht umfassend geklärt werden. Die bekannteste Hypothese basiert auf der Interaktion von PCDDs mit dem Ah-Rezeptor, der über eine Signalkette biologische Effekte (v.a. CYP 1A1-Aktivität) induziert. Ein Zusammenhang mit durch TCDD bedingter Letalität ist jedoch umstritten und weist wesentliche Schwächen auf ^[115]. So wird Letalität in Tieren erst bei Dosen beobachtet, die 100-fach über dem Sättigungsniveau des Ah-Rezeptors liegen ^[116]. Folglich ist die maximale Induktion schon bei subletalen Dosen erreicht. Daher kann zwar die Interaktion von TCDD mit dem Ah-Rezeptor als biologischer Effekt betrachtet werden, jedoch ist dies unabhängig vom Mechanismus akuter Toxizität ^[116]. Hingegen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Körpergewicht, welcher letztlich zum Tode führt, und der

Hemmung Glucocorticoid-regulierter Enzymaktivitäten (Phosphoenylpyruvat-Carboxykinase, Tryptophan-2,3-dioxygenase) gefunden werden [117-120].

1.8.3 Phenothiazine

1.8.3.1 Allgemein

Antipsychotische Medikamente verfügen meist über einen hohen therapeutischen Index. Entsprechend weisen auch Phenothiazine eine sehr flache Dosis-Wirkungs-Kurve auf, so daß sie über ein breites Dosisspektrum sicher verwendet werden können. Erwachsene haben schon Dosen von 10 g Chlorpromazin überlebt. Toxische Effekte sind auf verstärkte pharmakologische Wirkungen zurück zu führen, wobei sich die drei Gruppen der Phenothiazine unterscheiden. Am gefährlichsten sind kardiovaskuläre Effekte, die in Verbindung mit suizidalen Todesfällen gebracht werden [121]. Daneben treten auch Reaktionen des zentralen und autonomen Nervensystems auf. Aufgrund ihrer Photosensibilität rufen zahlreiche Phenothiazinpräparate okuläre Schäden hervor, da sie bei Durchlaufen retinaler Blutbahnen direktem Licht ausgesetzt sind und unter Bildung schädigender Radikale photolysieren. Nebenwirkungen klinischer Dosen betreffen auch die antagonistische Wirkung von Phenothiazinen an Cholinrezeptoren, was zu trockener Nase und Mund sowie Verstopfung und unterbleibendem Harndrang führt. Auch kommt es bei Patienten mitunter zu hypersensitiven Reaktionen, die sich bei Chlorpromazin z.B. in Gelbsucht zwischen der 2.-4. Einnahmewoche äußert. Etwa 5 % der Patienten, die Chlorpromazin erhalten, klagen über Hautentzündungen u.ä. [28].

1.8.3.2 Reproduktive Effekte

Einige Phenothiazinderivate zeigen in Tierstudien reproduktive Effekte wie Gaumenspalten, fehlende oder verbundene Rückenwirbel, kurze Rippen, Fehlpositionierung der Hoden oder gehemmttes pränatales Wachstum in der

Nachkommenschaft dosierter Muttertiere. Hier erwiesen sich Mäuse im Vergleich zu Ratten und Kaninchen als empfindlichere Spezies [122]. In Ratten tritt bei Exposition während der frühen Organogenese Embryoletalität auf. Erst bei Dosen, die toxisch für das Muttertier selbst sind, geht dies während der späten Organogenese in Teratogenität über. Hierbei wird ein positiver Zusammenhang zwischen der Länge der N-Alkyl-Seitenkette (v.a. Piperazinyl-Seitenkette) und teratogenen Effekten in Ratten vermutet. Obwohl Chlorpromazin in Ratten bei Exposition des Muttertieres Lippen- und Gaumenspalten hervorruft [123] sowie die peri- [124] und postnatale Letalität erhöht, hat sich gezeigt, daß es im Gegensatz dazu bei diätetischen Mängeln im Muttertier (z.B. Nikotinamid-, Nikotinsäure-, Tryptophanmangel) ein Absterben der Embryos verhindert [125].

Untersuchungen an 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin und dessen Sulfoxid zeigten Störungen des weiblichen Zyklus in Ratten sowie eine reduzierte Ovulationsrate und Gelbkörperanzahl. Das Sulfoxid inhibierte die Ovulation bei einer Dosisrate von 2 mg/kg/d vollständig [126].

In der Humanmedizin wurden Phenothiazine aufgrund ihrer antiemetischen und sedativen Eigenschaften oft während der Schwangerschaft verschrieben. Obwohl zahlreiche epidemiologische Untersuchungen keine grundsätzlich erhöhte Mortalitäts- oder Morbiditätsrate im Nachwuchs feststellen konnten [127-129], wurde empfohlen, die Gabe von Chlorpromazin in Dosen über 500 mg/d [127] vor allem im ersten Trimester zu vermeiden [130].

1.9 INDUKTION VON ENZYMAKTIVITÄT

1.9.1 Dioxine

Die *in vivo*- und *in vitro*-Induktion von Enzymen ist einer der empfindlichsten Parameter von TCDD-Exposition [131]. Obwohl die Metabolisierungsrate von TCDD *in vitro* durch vorherige Exposition der Hepatozyten mit TCDD 3,2-fach erhöht wird [132], scheint keine Autoinduktion des TCDD-Metabolismus *in vivo*

stattzufinden ^[133]. PCDDs induzieren an Phase I-Enzymen neben Zytochrom P450-Aktivität auch NAD(P)H-Quinon Oxidoreduktase. Das Zytochrom P450-System stellt die größte Substratbreite und Vielseitigkeit der Phase I-Metabolisierung dar ^[134] und ist somit wesentlich an der oxidativen Biotransformation von Xenobiotika beteiligt. Die höchsten Konzentrationen der Enzyme dieser Klasse werden im endoplasmatischen Retikulum (Mikrosomen) der Leber gefunden. Durch TCDD kann die CYP1A1- und CYP1A2-Aktivität um das 50 bis 100-fache induziert werden ^[135].

PCDDs induzieren auch Phase II-Enzyme, doch sind hierzu weitaus weniger Untersuchungen unternommen worden ^[133]. Es wurden eine 25-fache Induktion von Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT) ^[136] und eine 1,4-fache Induktion von Glutathion-S-Transferase (GST) in Ratten gefunden ^[137]. Die Aktivität von Sulfotransferase und N-Acetyltransferase bleiben unbeeinflusst ^[137].

1.9.2 Phenothiazine

Neben PCDDs induzieren auch andere polyhalogenierte bzw. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie verschiedene Medikamente, u.a. Phenothiazine, eine erhöhte Aktivität des Zytochrom P450-Systems ^[134]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit erzeugt vor allem chronische Gabe die Induktion mikrosomal-hepatischer Enzyme, was sich v.a. in reduzierter oraler Bioverfügbarkeit äußert. So zeigten Patienten, die regelmäßig Chlorpromazin erhielten, signifikant höhere Blutwerte, wenn die Dosierung für zwei Wochen unterbrochen und danach wieder aufgenommen wurde ^[138]. In der Dosierungspause klang die Enzyminduktion ab, so daß danach eine höhere Bioverfügbarkeit durch geringeren Metabolismus gegeben war. Auch bewirkt die Enzyminduktion durch Chlorpromazin eine verringerte orale Bioverfügbarkeit anderer Medikamente ^[139].

1.10 HORMETISCHE EFFEKTE DER DIOXINE

Hormese wurde bereits 1956 von Luckey definiert als

„*stimulatory action of sub-inhibitory amounts of toxin*“ [140].

Dies bedeutet, daß die Exposition mit niedrigen Dosen einer toxischen Substanz positive Effekte bewirken kann.

1.10.1 Immunsystem

In einer Vielzahl von Spezies wurde eine immunsuppressive Wirkung von TCDD festgestellt [141], die im toxischen Wirkungsbereich auftritt [142]. So führen Dosen von 1 µg/kg/Woche TCDD in Mäusen zu verstärkter Anfälligkeit gegenüber Salmonellen [143]. Untersuchungen exponierter Personen bei Seveso gaben jedoch keinen Hinweis auf eine veränderte Immunantwort [18].

Während höhere Dosen gegenteilige Effekte bewirken, führen Dosen von 0,01-0,1 µg/kg/Woche TCDD in Mäusen und Kaninchen zu einer erhöhten Konzentration von Serum-Immunglobulinen sowie zu einer verstärkten *in vitro*-Aktivität von Lymphozyten [142]. Auch in Ratten wurde eine U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehung für TCDD gefunden: Niedrige Dosen stärken das Immunsystem sogar durch bis zu 163-fach erhöhte Zellabwehr, wohingegen höhere Dosen diese schwächen [144].

1.10.2 Kanzerogenität

TCDD wurde in zahlreichen Untersuchungen als Karzinogen im Tier identifiziert [145]. In Ratten sind bei chronischer Exposition vor allem Lunge und Leber betroffen [146, 147]. Dahingegen führt lebenslange Dosierung mit *p.o.* 0,1 µg/kg/d TCDD zu signifikant vermindertem Auftreten altersbedingter Tumore in Hypophyse, Uterus, Bauchspeicheldrüse, Nebenniere und vor allem Brustdrüse. Nur 49 % der weiblichen Ratten wiesen gutartige und keines der Tiere bösartige

Tumore ^[147] der Brust auf, verglichen mit 85 % bzw. 9 % Häufigkeit in Kontrolltieren. Hier hatte TCDD somit Zielorgan-spezifische präventative Eigenschaften.

Epidemiologische Studien kommen auf kein eindeutiges Ergebnis im Menschen. Kohorten tausender exponierter Arbeiter zeigten insgesamt keinen Anstieg der Todesrate über den Landesdurchschnitt hinaus ^[148, 149]. Bei eingehender Betrachtung hoch- ^[149] und Langzeit-exponierter ^[148] Subkohorten wurde zwar insgesamt eine signifikant höhere Krebsrate ≥ 20 Jahre nach der Exposition entdeckt, doch war v.a. im Hinblick auf die Gesamtkohorte keine eindeutige Schlußfolgerung möglich. Die Untersuchung eines Betriebs zur Herstellung von Insektiziden (auf Hexachlorhexan-Basis) und Herbiziden (auf T-Säurebasis) zeigte eine erhöhte Sterblichkeit aufgrund bösartiger Tumore ^[150]. So konnte Krebs in Lungen ^[148] sowie Verdauungsorganen exponierter Arbeitern gefunden werden, jedoch waren externe Faktoren wie Tabakkonsum gegeben ^[151]. Ebenfalls gegen einen Zusammenhang sprach, daß kein linearer Zusammenhang zwischen Expositionsdauer und Todesrate gefunden werden konnte ^[148].

Es gibt Hinweise, daß TCDD kein Initiator ist, sondern vielmehr Promotoreigenschaften besitzt ^[115, 146]. Die Gründe für kanzerogene Effekte von TCDD in nicht-initiierten Tieren werden in der Promotion spontan-initiiertes Zellen vermutet ^[152]

Darüber hinaus wurde in der größten Kohorte von über 5100 Arbeitern eine signifikant niedrigere Sterberate durch Schlaganfälle und Erkrankungen des Verdauungssystems beobachtet ^[148].

2 AUFGABENSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die erstmalige Synthese sowie die chemische und toxikologische *in vitro*- und *in vivo*-Erstabschätzung der Eigenschaften von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin (TCPT) als Dioxin-Analogen.

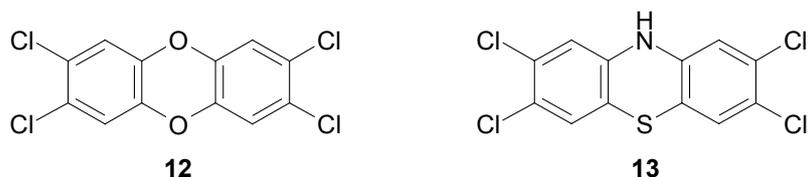


Abbildung 2-1:
Strukturformeln von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (12) und 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin (13).

Diese Arbeit ist der Grundstein eines Projektes, dessen Ziel es ist, sich die hormetischen Eigenschaften des TCDD unter Reduktion seines Risikopotentials und seiner ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zu Nutzen zu machen.

Die Wahl einer Verbindung, die zu 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) strukturell analog sein sollte, fiel aus der Vielzahl an möglichen Trizyklen (z.B. Phenazin, Phenoxazin) aufgrund ihrer pharmakologischen Bedeutung auf die Klasse der Phenothiazine. Ein Zusammenhang zwischen den klinischen Eigenschaften der Phenothiazine und der hohen Potenz von Dioxinen ist nicht zuletzt in der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Verbindungsklassen zu suchen (siehe Abbildung 2-1). Sowohl TCDD als auch TCPT bestehen aus einem Trizyklus mit zwei Heteroatomen im zentralen Ring und äußeren, in den Lateralpositionen chlorierten Arylringen. Im Gegensatz zu medizinisch verwendeten Phenothiazinderivaten, deren Wirkung auch maßgeblich von dem jeweiligen N-Substituenten bestimmt wird, sollte hier aufgrund struktureller Analogie zu Dioxinen das N-unsubstituierte Phenothiazin untersucht werden. Die ähnliche Struktur samt Chlorierungsmuster ließ analoge biologische Eigenschaften vermuten.

Die vorliegende Forschungsarbeit gliederte sich in drei Stufen:

- Primärziel war die erstmalige Synthese und chemische sowie strukturelle Charakterisierung der bisher nicht beschriebenen Verbindung TCPT. Der Syntheseweg sollte dann auf einen größeren Maßstab übertragen werden, um Ausgangsmaterial für Folgestudien bereitzustellen.
- Basierend auf synthetisiertem TCPT war eine erste Einschätzung des toxikologischen Potentials dieser Verbindung beabsichtigt. Hierfür sollten drei grundlegende Endpunkte näher untersucht werden:
 - Niedriger Dosisbereich: Enzyminduktion *in vitro*
 - Mittlerer Dosisbereich: Effekt auf Ovulation
 - Hoher Dosisbereich: Akute Letalität *in vivo*
- Für erste Untersuchungen der Kinetik der Verbindung im Tier war die Bestimmung der Halbwertszeit von TCPT vorgesehen. Hierzu sollten die entsprechenden *in vivo*-Studien durchgeführt sowie eine geeignete Analytik entwickelt werden.

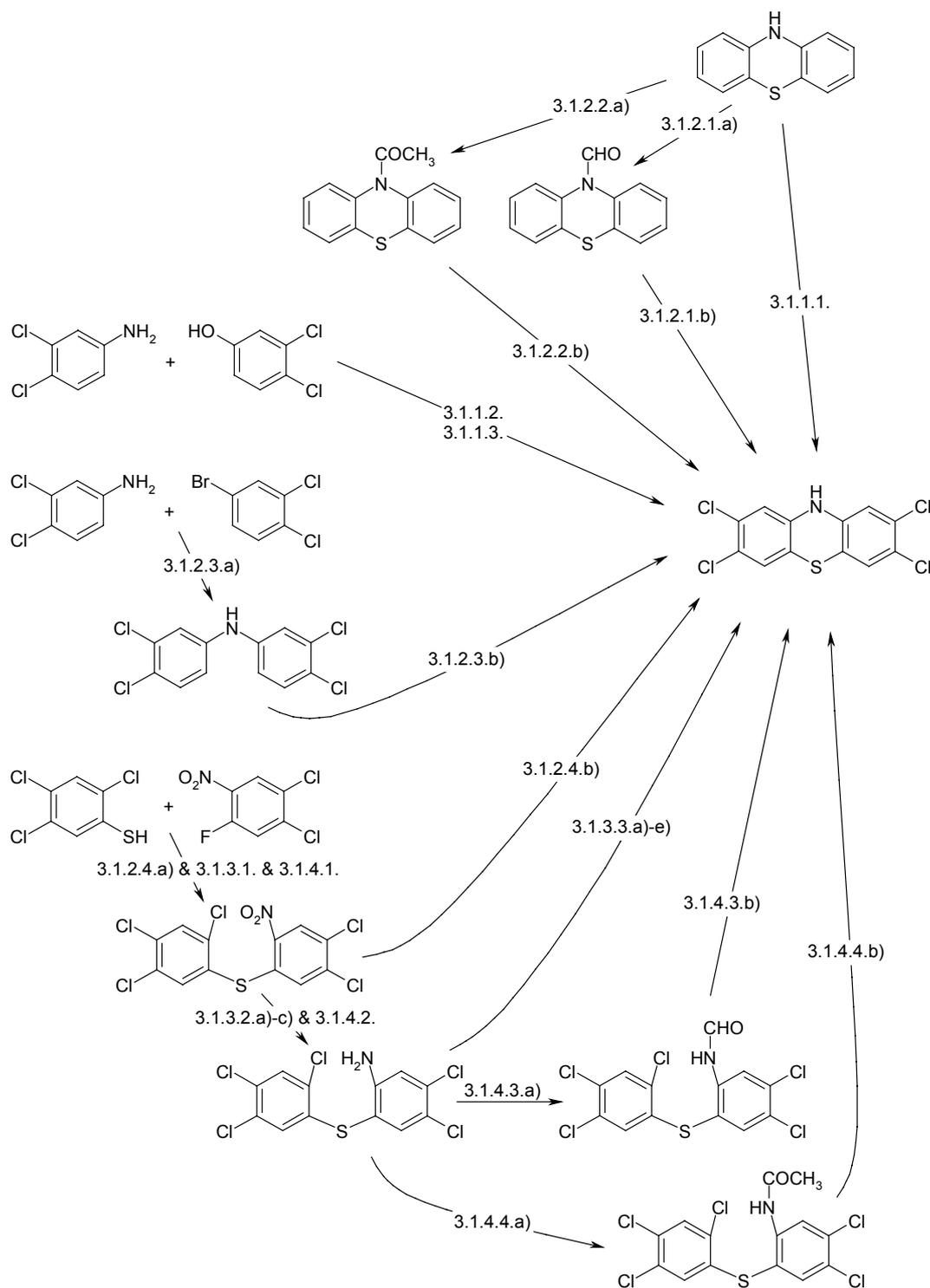
Bisher war 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin zweimal, in den Jahren 1988 ^[153] und 1997 ^[154], in der Literatur erwähnt worden; doch die in jenen Arbeiten hergestellte und verwendete Substanz war in Vorarbeiten zu diesem Projekt eindeutig als 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin identifiziert worden ^[155].

3.1 SYNTHESE - EXPERIMENTALANSÄTZE

Folgende Standardverfahren wurden angewandt:

- Reaktionen unter Inertgas (N₂, Ar) wurden in ausgeheizten und unter Inertgas abgekühlten Apparaturen durchgeführt. Gefäßöffnungen wurden mit Septa verschlossen, durchstochen von 18 G Nadeln, die Schutzgas zuführten. Überdruck wurde über ein Dreiwegesystem abgeführt. Befüllen mit Reagenzien fand stets unter Gasgegenstrom statt.
- Alle Reaktionsgefäße wurden mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Sämtliche erhaltenen Produkte wurden bei Raumtemperatur dunkel aufbewahrt.
- Die organischen Phasen wurden mit gesättigter Kochsalzlösung (26 % w/w bei Raumtemperatur) extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend eingengt.
- Die (Roh-) Produkte wurden im Ölpumpenvakuum bis zur Gewichtskonstanz von Lösungsmittelresten und Wasser befreit.

Verschiedene ein- bis mehrstufige synthetische Zugänge zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurden untersucht (siehe Schema 3-1). Die entwickelten Methoden berücksichtigten alle vicinal chlorierten Arylverbindungen, die kommerziell erhältlich waren (Quelle: SciFinder Scholar, Chemical Abstracts Service, Columbus, Ohio, USA) und für Fusionsreaktionen in Frage kommende Substituenten besaßen.



Schema 3-1:

Untersuchte Strategien zur erstmaligen Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin. (Die Zahlenangaben sind Kapitelnummern der Syntheseversuche).

3.1.1 Untersuchungen an einstufigen Synthesen

3.1.1.1 Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
Phenothiazin	2,50 mmol	99 %	①=Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey, USA
Eisen(III)chlorid	0,93 mmol	98 %, reagent, anhyd, powder	①
Perchlorsäure	5,20 mmol	0,0999 N solution in glacial acetic acid, volumetric standard	②=Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA
Chlorgas	im Überschuß		Matheson Gas Products Inc., Irving, Texas, USA
Argon	Schutzgas		③=Airgas Inc., Radnor, Pennsylvania, USA

Die Reaktionsapparatur umfaßte einen Dreiwegehahn, der die wechselseitige Zugabe von Argon und Chlorgas erlaubte. Nach Vorlage von Perchlorsäure in einen 250 ml-Dreihalskolben wurde diese für 30 min mit Argon gesättigt und danach Phenothiazin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Eiswasserbad knapp über den Festpunkt abgekühlt, Eisen(III)chlorid zugegeben und anschließend 30 min Chlorgas durch die Reaktionslösung geleitet. Nach dieser Zeit war zunehmend nicht-umgesetztes Chlorgas erkennbar, und das Reaktionsgemisch hatte sich von hellbeige zu schwarz verfärbt. Es wurde, nachdem die Reaktionsapparatur für zwei Stunden mit Argon durchspült worden war, mit 150 ml Eiswasser hydrolysiert und der Niederschlag wurde abfiltriert. Das schwarze Präzipitat wurde mit Wasser bis zu neutralem pH-Wert gewaschen und getrocknet (Rohprodukt: 711,0 mg). Danach

folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (0,4 g Silicagel/mg Rohprodukt) mit Hexan. Es wurden 177,7 mg 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin und kein Zielprodukt erhalten.

3.1.1.2 Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
3,4-Dichloranilin	3 mmol	98 %	②
3,4-Dichlorphenol	Variante 1: 3 mmol Variante 2: 6 mmol	99 %	②
Schwefel	4,5 mmol (1,5 eq) + 0,5 mmol (0,5 eq) + 18 mmol (6 eq)	laboratory grade, sublimed	④=Fisher Scientific Company Inc., Fair Lawn, New Jersey, USA
Stickstoff	Schutzgas		③

Die Edukte 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol wurden zusammen mit 1,5 Äquivalenten (eq) Schwefel in einem 50 ml Rundkolben unter Stickstoffatmosphäre mittels Ölbad über 20 min auf ca. 108 °C erhitzt. Die Schmelze war dunkelbraun und dünnflüssig. Nach 30 min wurden zusätzliche 0,5 eq Schwefel zugegeben. Es wurde weiter erhitzt, bis nach 50 min 140 °C erreicht waren und keine visuelle Veränderung des Reaktionsgemisches mehr stattfand. Dieses kühlte dann im Ölbad auf Raumtemperatur ab. Eine kleine Probe des erhaltenen schwarzen Feststoffs wurde ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht.

Nach nochmaliger Zugabe von 6 eq Schwefel wurde die unreaktierte Reaktionsmischung erneut für 14 h bei 132 °C erhitzt. Die Masse des Rohproduktes wurde aufgrund des Schwefelüberschusses nicht bestimmt. Das Zielprodukt wurde nicht gebildet.

3.1.1.3 *Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
3,4-Dichloranilin	3 mmol	98 %	②
3,4-Dichlorphenol	3 mmol	99 %	②
Schwefel	6 mmol	laboratory grade, sublimed	④
Iod	0,2 mmol	certified ACS, resublimed	④
Argon	Schutzgas		③

Die Reagenzien wurden in ein verschraubbares Reagenzgefäß überführt, das durch mehrmaliges Evakuieren und anschließendes Fluten mit Argon befüllt und mit Teflonband versiegelt wurde. Es wurde in einem auf 170 °C vorgeheizten Ölbad für 13,5 h gerührt und anschließend im abkühlenden Ölbad auf Zimmertemperatur gebracht. Das Zielprodukt wurde nicht gebildet.

3.1.2 Untersuchungen an zweistufigen Synthesen

3.1.2.1 *N-Formylierung von Phenothiazin und anschließende Chlorierung*

3.1.2.1.a) *N-Formylierung von Phenothiazin durch Ameisensäure*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
Phenothiazin	3,0 mmol	99 %	①
Ameisensäure	3,5 ml	96 %, ACS reagent	②

Phenothiazin wurde zu einem Pulver verrieben und dann in einen 100 ml-Rundkolben zur Ameisensäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20,5 h

unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde die braune Suspension auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Wasser verdünnt und mit wäßriger Pottaschelösung* neutralisiert. Die Suspension wurde mit Diethylether extrahiert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand getrocknet. Er wurde in kochendem Hexan gelöst und der unlösliche Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde in einen Gefrierschrank überführt, und die dort gebildeten Kristalle abfiltriert und getrocknet. Die Masse des Rohproduktes betrug 657,3 mg und vor und 317,1 mg nach der Umkristallisation. Das Zielprodukt wurde nicht gebildet.

3.1.2.1.b) *Direkte Chlorierung von N-Formylphenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure*

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hergestellt werden können (aus 3.1.2.1.a)).

3.1.2.2 *N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid und anschließende Chlorierung*

3.1.2.2.a) *N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
Phenothiazin	3,0 mmol	99 %	①
Acetylchlorid	3 mmol	98 %	⑤=Lancaster Inc., Pelham, New Hampshire, USA
Benzol	28 ml	Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Phenothiazin wurde in 25 ml Benzol gelöst und zu in 3 ml Benzol vorgelegtem Acetylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei Raumtemperatur

* Pottasche = K_2CO_3

gerührt. Dann wurde 1 N Salzsäure zugegeben, die organische Phase separiert, evaporiert und getrocknet (Rohprodukt: 562,2 mg). Das Zielprodukt wurde nicht gebildet.

3.1.2.2.b) *Direkte Chlorierung von N-Formylphenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure*

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hergestellt werden können (aus 3.1.2.2.a)).

3.1.2.3 *Bildung des Diarylamins und anschließende intramolekulare Reaktion*

3.1.2.3.a) *Bildung des Diarylamins aus 3,4-Dichloranilin und 1-Brom-3,4-dichlorbenzol durch basische Schmelze mit Katalysator*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
3,4-Dichloranilin	1 mmol	98 %	②
1-Brom-3,4-dichlorbenzol	16,5 mmol	98 %	②
Natriumcarbonat	1 mmol	anhyd, certified ACS	④
Kupfer(I)iodid	1 mmol	98 %	①
Stickstoff	Schutzgas		③

Die Reagenzien wurden in einen 10 ml Rundkolben mit Vigreuxkolonne überführt und erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC), Fließmittel Hexan/Essigsäureethylester ⁹/₁ (v/v), verfolgt (Retentionsfaktor (R_f) Dichloranilin=0,14; sechs Produkte). Nach 23 h Erhitzen unter Rückfluß bei einer Ölbadtemperatur von 190 °C wurde die Reaktion beendet. Das Reaktionsgemisch wurde hierzu in Essigsäureethylester aufgenommen und die organische Phase im Scheidetrichter mit je 5 ml Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingengt. Die

resultierende schwarze Flüssigkeit wurde im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Es konnten 43,4 mg des Zielproduktes 3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin gewonnen werden.

3.1.2.3.b) *Zyklisierende Dehydrierung von 3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin	0,135 mmol	>97 %	eigene Synthese
Schwefel	0,270 mmol	laboratory grade, sublimed	④
Iod	0,03 mmol	certified ACS, resublimed	④
Argon	Schutzgas		③

Die Reagenzien wurden in einen 10 ml Rundkolben überführt und unter Argon erhitzt. Nach 30 min bei 155 °C wurde das Reaktionsgefäß aus dem Ölbad genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Die resultierende schwarze Flüssigkeit wurde in 3 ml Diethylether aufgenommen, was in einer grünlichen Lösung resultierte. Nach Filtration durch Celite wurde das Lösungsmittel evaporiert und das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet (Masse: 49,4 mg). Die Zielverbindung wurde nicht gebildet.

3.1.2.4 Bildung des Diarylsulfids und anschließende intramolekulare Reaktion

3.1.2.4.a) Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension

(Vgl. Kapitel 3.3.1)

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,4,5-Trichlor-thiophenol	Siehe Reaktionsbeschreibungen	97 %	⑤
1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol	Siehe Reaktionsbeschreibungen	95 %	②
Kaliumcarbonat	5 mmol		①
Calciumcarbonat	7,5 mmol		④
Molekularsieb 3 Å	2 Gewichtsäquivalente	aktiviert	②
a) <i>N,N</i> -Dimethylformamid	45 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
b) Aceton	50 ml	HPLC grade, UV cutoff 330 nm	④
c) Tetrahydrofuran	50 ml	certified	④
d) Dichlormethan	50 ml	HPLC grade	④
Argon	Schutzgas		③

Aktivierung des Molekularsiebs:

Das Molekularsieb wurde vor Gebrauch im Mörser verrieben und im Ölpumpenvakuum mit der Bunsenbrennerflamme auf ca. 800 °C erhitzt, um die Wasseraufnahmekapazität zu maximieren. Die anschließende Aufbewahrung erfolgte unter Argon.

Reaktion:

Die einzelnen Reaktionen wurden jeweils in einem 250 ml-Rundkolben mit Liebigkühler durchgeführt. Der Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf den Syntheseverlauf wurde mittels DC-Kontrolle untersucht (Fließmittel Toluol; R_f 2,4,5-Trichlor-thiophenol=0,47; R_f 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitro-benzol=0,88; R_f Zielprodukt=0,95).

- a) Durchführung in N,N-Dimethylformamid (DMF): 1,12 mmol 2,4,5-Trichlor-thiophenol, 1,24 mmol 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol. Das Reaktionsgemisch wurde auf 50 °C erhitzt und nach beendeter Umsetzung (DC-Kontrolle, 6 h) aufgearbeitet. Hierzu wurde die heiße Suspension durch eine Glasfritte filtriert und der Rückstand anschließend mit 40 ml DMF gespült. Das Filtrat wurde nacheinander mit 100 ml Diethylether, 50 ml Wasser und zuletzt mit 8 ml gesättigter Kochsalzlösung im Scheidetrichter extrahiert. Nach Entfärben der wäßrigen Phase wurden alle organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel evaporiert. Das Rohprodukt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet (Masse: 461,4 mg). Der so erhaltene Rückstand wurde dann in 35 ml kochendem Ethanol suspendiert und heiß filtriert. Das Filtrat wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur in einen Gefrierschrank überführt. Die dort entstandenen Kristalle wurden abfiltriert, mit eiskaltem Ethanol gespült und getrocknet. Das Zielprodukt 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid war in 267,8 mg gereinigten Rohprodukts enthalten.
- b) Durchführung in Aceton: 1,50 mmol 2,4,5-Trichlor-thiophenol, 1,48 mmol 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol. Die Reaktion lief für 20 h bei 54 °C. Das heiße Gemisch wurde durch eine Glasfritte filtriert und das Filtrat durch Evaporation vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 533,4 mg Rohprodukt gebildet, die das Zielprodukt 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid erhielten.
- c) Durchführung in Tetrahydrofuran (THF): 1,28 mmol 2,4,5-Trichlor-thiophenol, 1,26 mmol 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol. Durchführung: Siehe Aceton. Das

Rohprodukt (517,7 mg) enthielt die Zielverbindung 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid.

- d) Durchführung in Dichlormethan: 1,12 mmol 2,4,5-Trichlor-thiophenol, 1,24 mmol 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h unter Rückfluß erhitzt. Aufarbeitung: Siehe Aceton. Es wurden 387,5 mg der reinen Zielverbindung 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid erhalten.

3.1.2.4.b) *Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Triethylphosphit*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid	1 mmol	>97 %	eigene Synthese
Triethylphosphit	4 mmol	99 %, Sure/Seal™	②
Cumol	7,5 ml	frisch aufgereinigt	
Argon	Schutzgas		③

Aufreinigung des Cumols*:

Cumol wurde mit konzentrierter Schwefelsäure im Scheidetrichter gewaschen, bis diese farblos blieb. Dann wurde die organische Phase mit Wasser und 10 % Soda[†]-Lösung gespült und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde fraktioniert destilliert (69 °C, 5466 Pa). Das Destillat wurde durch eine Silicagel-Säule geleitet und anschließend über elementarem Natrium getrocknet.

Reaktion:

Das Reaktionsgemisch wurde in einem 25 ml Rundkolben mit Liebigkühler auf 167 °C erhitzt. Mit Überschreiten einer Temperatur von 130 °C wurde die gelbe Lösung braun. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt (Fließmittel Hexan;

* Cumol = Isopropylbenzol

† Soda = Na₂CO₃

R_f Edukt=0,21; sieben Produkte). Nach 41:15 h war keine Ausgangssubstanz mehr erkennbar und die Reaktionsmischung wurde aufgearbeitet.

Hierzu wurde das Cumol im Vakuum abdestilliert und der ölige Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohprodukt: 598,1 mg). Er wurde dann mit wenig Dichlormethan auf Silicagel aufgebracht und säulenchromatographisch mit Hexan getrennt (0,1 g Silicagel/mg Rohprodukt). Die Zielverbindung wurde nicht gebildet.

3.1.3 Untersuchungen an dreistufigen Synthesen

3.1.3.1 *Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension*

Siehe Kapitel 3.1.2.4.a)

3.1.3.2 *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin*

3.1.3.2.a) *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Zinn(II)chlorid*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid	0,75 mmol	>97 %	eigene Synthese
Zinn(II)chlorid Dihydrat	2,25 mmol	reagent plus	②
Ethanol	20 ml	USP absolute 200 proof	©=AAPER Alcohol and Chemical Company, Shelbyville, Kentucky, USA

Die Reagenzien wurden in einem 250 ml Kolben knapp unterhalb des Siedepunktes von Ethanol (Sdp 78 °C) bei 74 °C gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde

per DC (Fließmittel Hexan/Essigsäureethylester $9/1$ (v/v)) verfolgt (R_f Edukt=0,68; R_f Produkt=0,31). Nach 2 h wurde die gelbe Suspension in 100 ml Eiswasser überführt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die wässrige Phase wurde dazu basisch eingestellt. Die organische Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und durch Silicagel filtriert. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurde das orangebraune Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet (Masse: 283,7 mg). Es schloß sich eine säulenchromatographische Trennung mit dem Lösungsmittelgemisch Hexan/Essigsäureethylester $9/1$ (v/v) an (0,26 g Silicagel/mg Rohprodukt). 50,6 mg der Zielverbindung 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid wurden gewonnen.

3.1.3.2.b) *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch elementaren Wasserstoff*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid	0,75 mmol	>97 %	eigene Synthese
Palladium auf Aktivkohle	0,04 mmol	10 Gew. % Pd	②
Benzol	6 ml	Sure/Seal™	②
Wasserstoff	4070 hPa		③
Stickstoff	Schutzgas		③

Die Reaktion fand bei Raumtemperatur (RT) statt; sie wurde bei 4070 hPa Wasserstoffdruck begonnen und nach 20 h bei 1310 hPa beendet. Das Gemisch wurde über eine Glasfritte mit Celite filtriert und mit Benzol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohprodukt: 289,0 mg). Es schloß sich eine säulenchromatographische Trennung (0,24 g Silicagel/mg Rohprodukt) mit Lösungsmittelgradient Hexan/Essigsäure-

ethylester $^{24}/_1 - ^3/_1$ (v/v) an. Es wurden 32,2 mg Zielverbindung 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid gewonnen.

3.1.3.2.c) *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch in situ generierten Wasserstoff*

(Vgl. Kapitel 3.3.2)

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid	0,75 mmol	>97 %	eigene Synthese
Eisenspäne	im Überschuß (> 10 mmol)	type IX0240, frisch aktiviert	⑦=MCB Manuf. Chem. Incorporated, Cincinnati, Ohio, USA
Essigsäure	2,8 ml	concd, certified ACS plus	④
Aceton	11,3 ml	HPLC grade, UV cutoff 330 nm	④
Demineralisiertes Wasser	2,8 ml		⑧=Aufbereitungs- anlage der University of Kansas, USA

Aktivierung des Eisens:

Die Späne wurden mit Wasser von Rostpulver befreit. Dann wurden sie zur Entfernung des Oberflächenbelags mit konzentrierter Salzsäure behandelt und mit Wasser abgewaschen. Dies wurde wiederholt, bis die Oberflächen belagsfrei schimmerten. Anschließend wurden sie mit Ethanol und danach mit Diethylether gewaschen, im Ölpumpenvakuum getrocknet und luftdicht aufbewahrt.

Reaktion:

Die Versuchsanordnung bestand aus einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Liebigkühler. 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid wurde in 11,3 ml heißem Aceton gelöst. Dann wurde die Menge von $\frac{1}{4}$ des Acetonvolumens an konzentrierter Essigsäure und ein weiteres $\frac{1}{4}$ des Volumens an Wasser zugegeben. Die Suspension wurde unter Rückfluß erhitzt (96 °C). Eisen wurde in Intervallen so lange zugegeben (etwa 2 h), bis per DC (Fließmittel Hexan/Essigsäureethylester 9/1 (v/v); R_f Edukt 0,68; R_f Produkt=0,31) keine Ausgangssubstanz mehr erkennbar war. Die Reaktionsmischung wurde heiß durch Celite filtriert, mit Soda auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde mit Soda- oder Pottaschelösung gewaschen, evaporiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohprodukt: 253,6 mg). Zur Aufreinigung wurde das Rohmaterial bei Raumtemperatur in 18 ml Hexan pro Gramm Rohprodukt suspendiert, gerührt und nach 1,5 h abfiltriert. Der Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Reaktion ergab 241,5 mg des Zielproduktes 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid.

3.1.3.3 *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin*

3.1.3.3.a) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermische Elimination von Chlorwasserstoff*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	0,29 mmol	>97 %	eigene Synthese
1,2-Dichlorbenzol	60 ml		
Stickstoff	Schutzgas		③

Das Reaktionsgemisch wurde 19 h unter Rückfluß erhitzt (194 °C), anschließend das Lösungsmittel mittels Vakuumdestillation entfernt und der braune Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohprodukt: 120,7 mg). Die Zielverbindung wurde nur im Spurenbereich gebildet.

3.1.3.3.b) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermochemische Elimination von Chlorwasserstoff*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	0,23 mmol	>97 %	eigene Synthese
Natriumhydroxid	1,6 mmol		
Natriumchlorid	3,6 mmol	reagent ACS	④

Die Reagenzien wurden miteinander im Mörser verrieben und in einen Porzellantiegel überführt. Dieser wurde über der Bunsenbrennerflamme bei ca. 800 °C einige Minuten erhitzt. Die Masse der gewonnenen Schmelze wurde aufgrund des Kochsalz- und Natriumhydroxid-Überschusses nicht bestimmt. Sie wurde im Mörser zerkleinert, mit einem Essigsäureethylester/Wasser 1/1 (v/v) Gemisch verrieben, mit 1 N Salzsäure auf neutralen pH-Wert gebracht und mit Essigsäureethylester extrahiert. Es konnte kein Zielprodukt gefunden werden.

3.1.3.3.c) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Heck-Reaktion*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	0,21 mmol	>97 %	eigene Synthese
Palladium(II)acetat	0,096 mmol	min. 98 %	Strem Chemicals Inc., Newburyport, Massachusetts, USA

Triethylamin	2,1 mmol	frisch destilliert	
Acetonitril	2 ml	Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Als Reaktionsgefäß diente ein verschraubbares Glasgefäß, das für die Reaktion zusätzlich mit Teflonband abgedichtet wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 23,5 h bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel evaporiert und das Rohprodukt im Ölpumpenvakuum getrocknet. Danach wurde der Feststoff in Essigsäureethylester suspendiert und über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der erhaltene Feststoff getrocknet. In den erhaltenen 80,0 mg Rohprodukt wurde kein Zielprodukt gefunden.

3.1.3.3.d) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Iod*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	1,25 mmol	>97 %	eigene Synthese
Kaliumcarbonat	1,88 mmol	reagent ACS, anhyd	④
Kupfer	0,34 mmol	99 %, -45 micron powder	①
Iod	ein kleiner Kristall	certified ACS resublimed	④
N,N-Dimethylformamid	12,5 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
Stickstoff	Schutzgas		③

Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluß bei 174 °C für 2:20 h in einem 10 ml Rundkolben gerührt und der Reaktionsverlauf mittels DC (Fließmittel Hexan/Essigsäureethylester ²⁴/₁ (v/v)) verfolgt (R_f Edukt=0,12; drei Produkte).

Anschließend wurde vom Niederschlag abfiltriert und mit DMF nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 ml aufgefüllt, wobei das Rohprodukt präzipitierte. Da der Niederschlag über Nacht nicht koagulierte, wurde die wässrige Phase mittels Pottaschelösung basisch eingestellt, mit Kochsalz gesättigt und mit THF extrahiert. Die organische Phase wurde evaporiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet (Rohprodukt: 421,3 mg). Es schloß sich eine säulen-chromatographische Aufreinigung an Silicagel (0,15 g Silicagel/mg Rohprodukt) mit Hexan an, doch war die Zielverbindung nicht gebildet worden.

3.1.3.3.e) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid*

(Vgl. Kapitel 3.2 und 3.3.3)

Herstellung frischen Kupfers:

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	1 mmol	98 %, ACS reagent	②
Zink	1 mmol	dust, -325 mesh	②
Demineralisiertes Wasser	10 ml		⑧
Salzsäure		verdünnt von: concd, certified ACS plus	④

Kupfer wurde anhand einer über einhundert Jahre alten Vorschrift ^[156] frisch hergestellt. Die jeweils zu verwendenden Mengen wurden entsprechend dem Reaktionsansatz, für den das Kupfer benötigt wurde, stöchiometrisch angepaßt. Das Kupfersulfat wurde in Wasser gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde Zinkstaub zugegeben. Nach vollständiger Ausfällung, erkennbar an der Entfärbung der Lösung, wurde vom Überstand dekantiert und das Präzipitat mit 1 N Salzsäure bei 0 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr stattfand. Danach wurde

der Feststoff bis zur pH-Neutralität mit Wasser und anschließend mit Ethanol gewaschen. Das frisch gefällte Kupfer wurde bis unmittelbar vor Reaktionseinsatz eisgekühlt in Ethanol aufbewahrt. Dann wurde es mit Sure/Seal™ DMF gewaschen und direkt in das Reaktionsgefäß gespült.

Aufreinigung des Kupfer(I)iodids:

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
Kupfer(I)iodid	13 g	98 %	①
Kaliumiodid	130 g	certified ACS, free flowing granular	④
Demineralisiertes Wasser	100 ml + 400 ml		⑧
Aktivkohle		carbon decolorizing, alkaline, Norit A	④
Celite		filter agent, 545	②

Das Kaliumiodid wurde in 100 ml Wasser in Lösung gebracht. Dann wurde Kupfer(I)iodid zugegeben und die Lösung für 5 min gerührt. Wenn die Lösung gefärbt war, wurde Aktivkohle bis zur vollständigen Entfärbung beigegeben. Anschließend wurde durch Celite gefiltert. Das Filtrat wurde in 400 ml Wasser gegossen und der entstandene Niederschlag durch Filtration gewonnen. Er wurde nacheinander mit Wasser, mit Ethanol und abschließend mit Diethylether gewaschen. Das Kupfer(I)iodid wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und unter Argon unter Lichtausschluß aufbewahrt. So erhaltenes und gelagertes Kupfer(I)iodid ist einige Monate stabil ^[157].

Ullmann-Kupplung:

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	4,01 mmol	>97 %	eigene Synthese
Natriumcarbonat	4,33 mmol		④
Kupfer	2,4 mmol + 2,7 mmol	frisch hergestellt	
Kupfer(I)iodid	2,4 mmol + 2,7 mmol	aufgereinigt und konserviert	
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	40 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Die Reaktion wurde bei 185 °C für 21 h unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde eine Probe entnommen und die zweite Hälfte der Katalysatoren zugegeben. Nach 38,5 h wurde das Ölbad entfernt. Sobald die Reaktionsmischung auf Handwärme abgekühlt war, wurde sie unter starkem Rühren in 700 ml Wasser gegossen. Nach Koagulation des Niederschlags wurde dieser abfiltriert, mit Wasser gewaschen und feucht mit 850 ml Diethylether extrahiert. Das Rohprodukt (968,8 mg) wurde durch Evaporation des Lösungsmittels gewonnen.

Aufreinigungsversuche erfolgten mit präparativer Dünnschichtchromatographie (30 mg Rohprodukt/Platte, dreifache Entwicklung mit dem Fließmittel Hexan/*tert.*-Butyl-methylether (TBME) ^{94/6}) sowie Säulenchromatographie an Silicagel (0,06 g Silicagel/mg Rohprodukt; Eluentgemisch Hexan/Essigsäureethylester ^{1/0-4/1} (v/v)). Im so teilaufgereinigten Produkt (327,9 mg) konnte die Zielverbindung 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin gefunden werden.

3.1.4 Untersuchungen an vierstufigen Synthesen

3.1.4.1 *Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol durch basische Suspension*

Siehe Kapitel 3.1.2.4.a)

3.1.4.2 *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin*

Siehe Kapitel 3.1.3.2.c)

3.1.4.3 *Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung*

3.1.4.3.a) *Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ameisensäure*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	2 mmol	>97 %	eigene Synthese
Ameisensäure	7 ml	96 %, ACS reagent	②

Die gelbe Suspension wurde 10 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen wurde sie mit wenig Wasser versetzt und mit gesättigter, wäßriger Pottaschelösung neutralisiert. Im Scheidetrichter wurde das Produktgemisch mit Diethylether extrahiert. Der Feststoff wurde abfiltriert, getrocknet, zerkleinert und erneut mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden jeweils evaporiert, getrocknet und vereinigt. Das Zielprodukt 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid wurde in einer Ausbeute von 756,0 mg gewonnen.

3.1.4.3.b) *Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid	1,75 mmol	97 %	eigene Synthese
Natriumcarbonat	1,75 mmol		④
Kupfer	1,05 mmol	frisch hergestellt	
Kupfer(I)iodid	1,05 mmol	aufgereinigt und konserviert	
N,N-Dimethylformamid	20 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Zur Durchführung der Reaktion: Siehe Kapitel 3.1.3.3.e).

Nach 22,5 h Reaktionsdauer wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Dazu wurde es mit einer Pipette in 500 ml Eiswasser überführt, der Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Das Zielprodukt wurde nicht gebildet.

3.1.4.4 *Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung*

3.1.4.4.a) *Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Acetylchlorid*

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	2 mmol	>97 %	eigene Synthese
Acetylchlorid	2 mmol	98 %	⑤

Benzol	55 ml	Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Acetylchlorid wurde in 1 ml Benzol aufgenommen und in einem 100 ml-Rundkolben vorgelegt. 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid wurde als Suspension in 55 ml Benzol zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Dann wurde die Reaktion aufgearbeitet, indem 1 N Salzsäure zugetropft wurde. Die organische Phase wurde abgetrennt, evaporiert und getrocknet (Rohprodukt: 740,8 mg). Die Zielverbindung wurde nicht gebildet.

3.1.4.4.b) *Zyklisierung von 6'-Acetamido-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid*

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hergestellt werden können (aus 3.1.4.4.a)).

3.2 SYNTHESE - KINETIKSTUDIEN ZUR BILDUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN

3.2.1 Variation der Katalysatorenzugabe bei der Ullmann-Kupplung

(Vgl. Kapitel 3.1.3.3.e) und 3.3.3)

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	0,5 mmol	>97 %	eigene Synthese
Natriumcarbonat	0,5 mmol		④
Kupfer	0,1 mmol	frisch hergestellt	
Kupfer(I)iodid	0,1 mmol	aufgereinigt und konserviert	
N,N-Dimethylformamid	20 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Es wurden drei Reaktionen im o.g. Maßstab und unter den in Kapitel 3.1.3.3.e) beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Sie wurden jeweils über fünf Tage Reaktionszeit hinweg täglich ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht, wofür Probenahmen per Pasteur-Pipette erfolgten. Die drei Ansätze unterschieden sich wie folgt:

3.2.1.1 *Einmalige Zugabe der Katalysatoren*

Je 0,2 eq Kupfer und Kupfer(I)iodid wurden nur bei Reaktionsstart zugegeben. In Abständen von $24 \pm 0,75$ h wurden Proben von der Reaktion entnommen und das Rohprodukt ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht.

3.2.1.2 *Sukzessive Zugabe der Katalysatoren nach jedem zweiten Tag*

In Abständen von $24 \pm 0,75$ h wurden Proben von den Reaktionen entnommen und das Rohprodukt ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht. Unmittelbar nach jeder zweiten Probenahme wurden je 0,2 eq frisch hergestelltes Kupfer und konserviertes Kupfer(I)iodid der Reaktion zugegeben.

3.2.1.3 *Tägliche Zugabe der Katalysatoren*

In Abständen von $24 \pm 0,75$ h wurden Proben von der Reaktion entnommen und das Rohprodukt ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht. Unmittelbar nach jeder Probenahme wurden 0,2 eq frisch hergestelltes Kupfer und konserviertes Kupfer(I)iodid der Reaktion zugegeben.

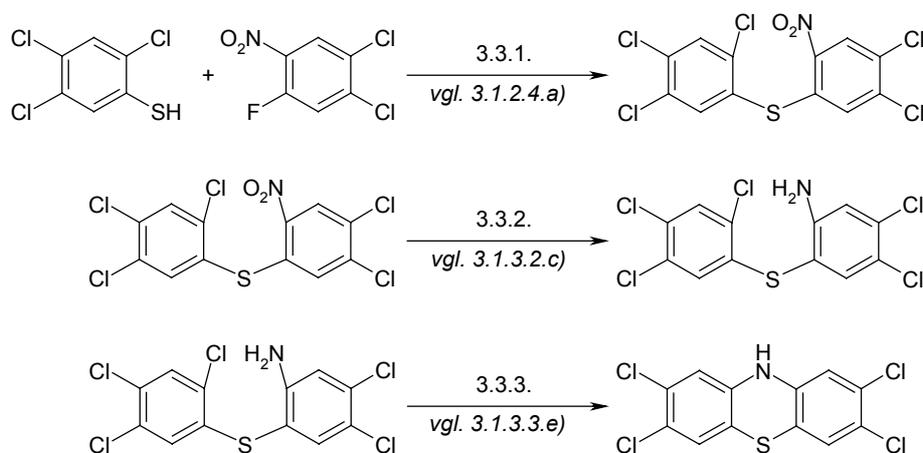
3.2.2 *Zeitlicher Verlauf unter optimierten Reaktionsbedingungen*

Für diese Studie wurden Ansatzgröße und Bedingungen wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben gewählt. Es wurden nur einmal, zu Reaktionsbeginn, Katalysatoren zugegeben. Die Zeitpunkte der Probenahmen lagen bei 5 min, 2:35 h, 6:05 h, 11:55 h,

16:30 h und 26:30 h. Das jeweilige Rohprodukt wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht.

3.3 SYNTHESE - GROßMAßSTAB

Zur Herstellung der für *in vitro*- und *in vivo*-Studien nötigen Mengen an 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurden ausgewählte Reaktionen im Gramm-Maßstab durchgeführt (siehe Schema 3-2).



Schema 3-2:

Für die Herstellung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Gramm-Maßstab ausgewählte, dreistufige Synthese.

(Die Zahlenangaben sind die Kapitelnummern der Synthesen).

3.3.1 Synthese von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol

(Vgl. Kapitel 3.1.2.4.a))

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,4,5-Trichlor-thiophenol	97,0 mmol	97 %	⑤
1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol	106,6 mmol	95 %	②
Kaliumcarbonat	485 mmol		①
Calciumcarbonat	73 mmol		④

Molekularsieb 3 Å	2 Gewichts- äquivalente	aktiviert	②
Dichlormethan	500 ml	HPLC grade	④
Argon	Schutzgas		③

Das Reaktionsgemisch wurde in einem 1 l-Kolben für 21 h bei einer Ölbadtemperatur von 55 °C unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde von den Feststoffbestandteilen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. 39,15 g des Zielprodukts 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid konnten gewonnen werden.

3.3.2 Synthese von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid aus 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid

(Vgl. Kapitel 3.1.3.2.c)

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid	109,5 mmol	>97 %	eigene Synthese
Eisenspäne	im Überschuß (1432 mmol)	type IX0240, frisch aktiviert	⑦
Essigsäure	375 ml	concd, certified ACS, plus	④
Aceton	1500 ml	HPLC grade, UV cutoff 330 nm	④
Demineralisiertes Wasser	375 ml		⑧

Das Reaktionsgemisch wurde in einem 3 l-Rundkolben unter Rückfluß erhitzt. Dabei wurden die zuvor aktivierten Eisenspäne in 20 g-Portionen in 30 min Intervallen zugegeben und der Reaktionsverlauf per DC verfolgt. Nachdem kein Edukt mehr detektierbar war (2:20 h), wurde die Reaktion aufgearbeitet, indem vom überschüssigen Eisen dekantiert und das Reaktionsgemisch dann durch Celite und

Sand gefiltert wurde. Die Lösung wurde mit Natronlauge und Soda neutralisiert, schrittweise mit insgesamt 5 l Diethylether extrahiert, und das Rohprodukt aus der organische Phase mittels Evaporation gewonnen (Rohprodukt: 36,95 g). Es wurde dann mit 20 ml Hexan pro Gramm Rohprodukt für 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend filtriert und das reine Produkt aus dem Filtrat durch Evaporation gewonnen. Es wurden 33,82 g der Zielverbindung 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid gewonnen.

3.3.3 Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid

(Vgl. Kapitel 3.1.3.3.e) und 3.2)

Chemikalie	Ansatzgröße	Spezifikationen	Bezugsquelle
6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid	22,5 mmol	>97 %	eigene Synthese
Natriumcarbonat	23,5 mmol		④
Kupfer	4,5 mmol	frisch hergestellt	
Kupfer(I)iodid	4,5 mmol	aufgereinigt und konserviert	
N,N-Dimethylformamid	1000 ml	99,8 %, anhyd, Sure/Seal™	②
Argon	Schutzgas		③

Vier identische Ansätze wurden gleichzeitig durchgeführt. Das jeweilige Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei 185 °C unter Rückfluß in einem 2 l-Rundkolben erhitzt. Nach Abkühlen unter den Siedepunkt wurde es in 2 l einer nahezu gesättigten Kochsalzlösung/Eiswasser-Mischung überführt. Der Niederschlag koagulierte für 2 h, bevor er abfiltriert wurde. Als einzige praktikable Lösung erwies sich Schwerkraftfiltration durch ein mit einem Großbogen Filterpapier ausgelegtes Küchensieb (Ø 25 cm). Der erhaltene Schlamm wurde vakuumfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wurde über Phosphorpentoxid im Exsikkator

über Nacht angetrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt (39 g, leicht feucht) wurde in 1 l THF suspendiert und mit 200 g Magnesiumsulfat für 1 h gerührt, filtriert und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Die Rohprodukte der vier gleichgroßen Ansätze wurden dann vereinigt (zusammen 28,75 g Rohprodukt).

Aufreinigungsversuche erfolgten mittels Medium-Pressure Liquid Chromatography (MPLC), bei der vorgepackte Säulen (Länge: 15,5 cm, \varnothing 2,5 cm) unter Druckluft verwendet wurden. Als Eluent diente 5,8 % TBME in Hexan.

Das Zielprodukt konnte letztendlich jedoch nur durch konventionelle säulenchromatographische Aufreinigung über Silicagel mit 6 % TBME in Hexan erhalten werden. Bei den ersten Trennungen in kleinen Teilmengen wurde das Rohprodukt auf Silicagel aufgezogen und der breite Substanzbereich um $R_f=0,22$ großzügig gesammelt. Das so vorgereinigte Rohprodukt wurde mehrfach dieser säulenchromatographischen Aufreinigung unterworfen. Als nach mehreren Trennungen kein schwarzer Rückstand mehr im oberen Silicagelbereich zurück blieb, schloß sich die letzte säulenchromatographische Aufreinigung an. Bei dieser wurde das vereinigte Produktgemisch als Pulver oben auf die Silicagel-Säule aufgetragen. Nachdem nur noch geringe Mengen Substanz mit $R_f=0,22$ in höheren Fraktionen per DC erkennbar waren, wurde die Säule mit Aceton gespült. Das Lösungsmittel wurde dann unverzüglich evaporiert und der so erhaltene Feststoff getrocknet. Es wurden so aus vier vereinigten Ansätzen 1,566 g 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin gewonnen.

3.3.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	College B154	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
MPLC	Flash + 25	Biotage Inc., Charlottesville, Virginia, USA

Ölpumpe	1400 DuoSeal	Welch Vacuum, Thomas Industries Inc., Skokie, Illinois, USA
Ölpumpenmotor	MOD 4401007413	Franklin Electric, Bluffton, Indiana, USA
Rotationsverdampfer	Rotavaporator	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Schmelzpunktbestimmung nach Kofler	Thomas Hoover capillary melting point apparatus Unimelt	Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Trockenschrank	Precision Thelco Model 17	Precision Scientific Company, Chicago, Illinois, USA

3.3.5 Feststoffe

Material	Bezeichnung	Hersteller
Celite	filter agent, 545	②
Kaliumcarbonat	reagent ACS, anhyd	④
Magnesiumsulfat		④
Molekularsieb	3 Å	②
Natriumcarbonat	anhyd, certified ACS	④
Natriumchlorid	reagent ACS	④
Platten zur Dünnschichtchromatographie	Uniplate silica gel HLF 250 microns, F ₂₅₄	Analtech, Newark, Delaware, USA
Platten zur präparativen Dünnschichtchromatographie	Uniplate silica gel GF 1000 microns, F ₂₅₄	Analtech, Newark, Delaware, USA
Seesand	washed	④
Silicagel	GR 60 230-400	Fisher Scientific Company, Sommerville, New Jersey, USA

3.3.6 Flüssigkeiten

Name	Bezeichnung	Hersteller
Aceton	HPLC grade, UV cutoff 330 nm	④
<i>tert.</i> -Butyl-methylether	99,8 %, HPLC grade	②
Dichlormethan	HPLC grade	④
Diethylether	anhyd, certified ACS	④
Essigsäureethylester	certified ACS	④
Ethanol	USP absolute 200 proof	⑥
Hexan	HPLC grade	④
Salzsäure	concd, certified ACS plus	④
Tetrahydrofuran	certified	④
Wasser	demineralisiert	⑧

3.4 KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE

Alle Messungen wurden an den Instrumenten der Molecular Structures Group: Nuclear Magnetic Resonance Laboratory, University of Kansas, USA, an einem 400 MHz DRX-400 NMR-Gerät der Firma Bruker, Billerica, Maine, USA, mit Breitband und inversem dreifach-Achsen Gradient-Probenkopf durchgeführt. Zweidimensionale (2-D) Messungen fanden an einem 500 MHz Bruker Avance System mit Hochauflösungs-Probenkopf statt. Deuterierte Lösungsmittel stammten von ②. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit dem Programm Magnetic Resonance Companion MestRe-C 2.a des Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Spanien [158].

3.5 GASCHROMATOGRAPHIE/MASSENSPEKTROMETRIE

Alle Untersuchungen wurden mit einem Gaschromatographen Modell 5890 *Series II* der Firma Hewlett Packard, Rockville, Maryland, USA, durchgeführt. Verwendet wurde eine Säule von J&W Scientific, Folsom, Kalifornien, USA, Ausführung DB-5 ms, 60 m, ID 0,25 mm, ft 0,10 μm . Als Trägergas wurde Helium mit einem Vordruck von 1720 hPa eingesetzt. Die Injektortemperatur betrug 280 °C, das Temperaturprogramm wurde wie folgt gewählt: 90 °C (1 min); 20 °C/min auf 170 °C (4 min); 170 °C (7,5 min); 3 °C/min auf 280 °C (37 min); 280 °C (10 min). Die Transferline zum MS war auf 280 °C temperiert. Das Massenspektrometer von Finnigan Mat, San Jose, Kalifornien, USA, war vom Bautyp *SSQ 7000*. Die Spektren wurden mittels fullscan von Masse 50-500 in Scanintervallen von 0,7 sec ermittelt. Die Ionisierung erfolgte durch Ionenstoß (EI) mit 70 eV bei einer Temperatur der Ionenquelle von 150 °C. Die Proben wurden manuell wie auch per Autosampler *A 200 S* von Finnigan Mat, San Jose, Kalifornien, USA, injiziert.

3.6 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Zur UV-spektroskopischen Untersuchung diente das UV-Visible Spectrometer Cary 1 von Varian, Victoria, Australien. Die Software (Cary 1/3 System) stellte Varian. Die erfaßten Datenpunkte mit Abstand 5 nm wurden mit dem Programm Excel 2000 von Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA, bearbeitet. Die Messung der Proben erfolgte in Methanol in Quarzküvetten mit Schichtdicke 1 cm.

3.7 ELEMENTARANALYSE

Elementaranalysen wurden durch das Auftragslabor Quantitative Technologies Inc. (QTI), Whitehouse, New Jersey, USA durchgeführt. Die eingeschickten Proben waren wie im synthetischen Teil beschrieben aufgereinigt worden.

3.8 EINKRISTALL-RÖNTGENSTRUKTURANALYSE

Kristalle zur Untersuchung wurden durch langsame Verdunstung von THF- d_8 aus einem NMR-Röhrchen mit 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin gewonnen. Der Verdunstungsprozeß erstreckte sich über ca. ein Jahr. Ein rosafarbener, nadelförmiger Kristall der Größe 0,41x0,10x0,08 mm wurde vermessen.

Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Douglas R. Powell der University of Kansas, USA, als Auftragsarbeit durchgeführt.

Intensitätsdaten wurden mit Hilfe eines Bruker APEX CCD (charge coupled device) Flächendetektors gemessen, der auf einem Bruker Diffraktometer (Madison, Wisconsin, USA) mit D8 Goniometer befestigt war. Zur Datenerfassung wurde die Steuer-Software SMART von Bruker-AXS verwendet. Die Mo $K\alpha$ Strahlung wurde mittels Graphit monochromatisiert ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$). Die Probe wurde auf 100 K gekühlt und die Intensität in einer Serie von Bildern gemessen, wobei der ω -Kreis in Schritten von $0,25^\circ$ variiert wurde und der Kristall jeweils für 15 sec bestrahlt wurde. Der Detektor war auf 512x512 Modus gestellt und 5,054 cm von der Probe entfernt. Die Vollständigkeit der Daten betrug 99,9 % bis zu einem Beugungswinkel von $25,99^\circ$ in θ . Zell-Parameter wurden mittels eines Least-Squares-Verfahrens auf der Basis von 5247 Reflexen im Bereich $2,36^\circ < \theta < 26,00^\circ$ verfeinert. Insgesamt wurden 6689 Reflexe zwischen $1,96^\circ < \theta < 25,99^\circ$ vermessen. Absorptionseffekte wurden mit dem Programm SADABS semi-empirisch mit Transmissionsfaktoren von min. 0,6567 und max. 0,9158 korrigiert. Mittelung äquivalenter Reflexe ergaben 2155 unabhängige Datenpunkte mit $R(\text{int})=0,0233$.

Die Raumgruppenbestimmung erfolgt auf der Basis systematischer Auslöschungen und statistischer Untersuchungen und wurde durch die nachfolgende Strukturbestimmung bestätigt. Strukturlösung erfolgte durch direkte Methoden. Die Struktur wurde basierend auf F^2 -Werten mittels eines Least-Squares-Verfahrens verfeinert. Die Positionen der Wasserstoffatome wurden auf ideale Positionen gesetzt, die durch die Geometrie der benachbarten Nicht-Wasserstoffatome gegeben

sind, und durch ein Reitermodell verfeinert. Nicht-Wasserstoffatome wurden durch anisotrope Auslenkungsparameter aufgelöst. Auslenkungsparameter von Wasserstoffatomen wurden auf den 1,2-fachen Wert der gebundenen Atome festgesetzt. Insgesamt wurden 163 Parameter gegen 2155 Datenpunkte mit einem $wR(F^2)$ -Wert von 0,0764 und einem Goodness-of-Fit-Wert S von 1,065 verfeinert. Der Endwert von $R(F)$ betrug 0,0284 für 2122 untersuchte Daten, $[F > 4\sigma(F)]$. Die Restelektronendichte betrug maximal 0,521 und minimal $-0,225 \text{ e}/\text{\AA}^3$. Die Polarität der Achse wurde mit Hilfe des Flack-Parameters ^[159] bestimmt.

3.9 IN VITRO-STUDIEN

3.9.1 Hintergrund *in vitro*

Die Dioxinähnlichkeit von Verbindungen kann *in vitro* anhand ihrer Induktion von Zell-Regulationsmechanismen quantitativ untersucht werden.

Der Ethoxyresorufin-O-deethylase- (EROD-) Bioassay beruht auf einer Induktion der Gentranskription durch TCDD und TCDD-ähnliche Verbindungen. Diese verläuft über die Bindung passender Substanzen an einen zytosolischen Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (aryl hydrocarbon receptor, AhR) unter Dissoziation von an AhR gebundenen Proteinen. Das Heterodimer wandert in den Zellkern und bindet an arnt (AhR nuclear translocator), mit dem es sich als Heterotrimer an spezifische regulatorische Sequenzen der DNA anlagert. Dies führt zur Aktivierung der Transkription mit nachfolgender Translation, was eine in direktem Verhältnis zur Ligandenkonzentration stehende Enzymaktivität (CYP1A1) hervorruft. Diese kann durch Substratspaltung (Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität) photometrisch quantifiziert werden. Über Vergleiche mit TCDD als Standard kann eine direkte Bestimmung der TEQ erfolgen ^[160].

3.9.2 Anwendung EROD-Bioassay

Die Untersuchungen wurden gemäß der am Institut für Ökologische Chemie standardisierten Arbeitsanweisung durchgeführt [161]. Hierzu wurden Rattenhepatomzellen H4IIEC/T3 verwendet [162, 163]. 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurde im Lösungsmittelgemisch DMSO/Isopropanol 4/1 (v/v) gelöst und entsprechend eine Verdünnungsreihe hergestellt, um einen End-Dosisbereich zwischen 0,25 und 256 pg/Loch abzudecken. Jedes Loch enthielt ca. 10.000 Zellen in 100 µl Medium. Nach Kultivierung der Zellen in 96-Loch-Platten wurden sie exponiert und mit TCPT für 24, 48 und 72 h inkubiert. Danach wurde das dosierte Medium entfernt und die Zellen mit Substrat (Ethoxyresorufin) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Substratspaltung photometrisch quantifiziert. Mittels Excel Solver (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) wurde aus den Meßdaten der verschiedenen Verdünnungen ein sigmoider Kurvenangleich berechnet. Da bei den gemessenen Konzentrationen der Dosisbereich der vollständigen Rezeptorsättigung nicht erreicht wurde, birgt der mathematische Angleich eine Restungenauigkeit. Der EROD-Messung schloß sich eine Proteinmessung zur Überprüfung der Zelltoxizität an.

3.10 *IN VIVO*-STUDIEN

Es wurden adulte Ratten der Rasse Spague Dawley (Harlan, Indianapolis, Indiana, USA) und adulte Meerschweinchen der Rasse Dunkin Hartley (Charles River Laboratories, Wilmington, Maine, USA) verwendet. Alle Tiere wurden während des gesamten Verlaufs der Studien täglich um 10 Uhr \pm 1 h untersucht sowie gewogen und die aufgenommene Futtermenge bestimmt.

Bei peroraler Dosierung wurde 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin an einer täglich neu kalibrierten Fisher Scientific XA-200DJ Analysenwaage in Gelatine-Kapseln der Firma Torpac Inc., Fairfield, New Jersey, USA eingewogen. Die Wägenauigkeit betrug \pm 0,02 mg. Für Meerschweinchen wurden Kapseln der Größe 9 und für Ratten der Größe 9 sowie der Größe 9 XL verwendet. Utensilien und Kapseln: Siehe

Abbildung 3-1. Die Kapseln lösen sich im Magen innerhalb von 10 min auf (Angabe der Firma Torpac Inc.). Verwendete Lösungsmittel wurden von Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA, bezogen und entsprachen HPLC-Qualität bzw. höchster Reinheit (Maisöl).



Abbildung 3-1:
Utensilien und Gelatine-Kapseln zur peroralen Dosierung.
Oben: Trichter zum Befüllen der Kapseln Größe 9 XL und 9. Je rechts daneben: Schlundsonde zur Dosierung. Links: Gelatine-Kapseln (oben 9 XL, unten 9). Zum Größenvergleich 5 DM-Münze und US \$ 0,25 Münze.

3.10.1 Akute Letalität

3.10.1.1 Akute perorale Letalität

Zur Erstbestimmung der akuten *p.o.* Toxizität von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Meerschweinchen wurde eine Findungsuntersuchung für den Dosisbereich unternommen. Hierzu wurden zuerst männliche Einzeltiere dosiert. Diese erhielten zur Resorptionsoptimierung vom ersten bis zum letzten Tag der Dosierung 2 % Maisöl im Futter. Zur Findungsuntersuchung der letalen Dosis wurde ein Tier täglich mit 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin dosiert und die für die Folgestudie

verwendete Dosis dem Ergebnis angepaßt. Die erste Dosisrate betrug 100 mg/kg/d. Die Dosierung erfolgte mit einer Schlundsonde. Hierbei wurde eine mit Maisöl benetzte Kapsel im hinteren Rachenbereich ausgeworfen, woraufhin die Tiere diese selbständig schluckten (Abbildung 3-2). Letzteres wurde durch Streicheln des Halses unterstützt. Negativkontrollen wurden mit leeren Gelatine-Kapseln dosiert.



Abbildung 3-2:
Dosierung eines Meerschweinchens mit einer Gelatine-Kapsel. Auswurf der Kapsel im hinteren Rachenbereich, das Tier schluckt dann selbständig. (Bildquelle: Torpac Inc., Fairfield, New Jersey, USA).

3.10.1.2 Akute intravenöse Letalität

Die akute intravenöse Toxizität in Ratten und Meerschweinchens war nicht Gegenstand einer eigenen Studie. Vielmehr wurden die für Kinetikstudien dosierten Tiere* beobachtet.

* Siehe Kapitel 3.10.3.1

3.10.2 Ovulationsstudien

Der Zyklus weiblicher Meerschweinchen dauert im Durchschnitt 16 Tage. Die genaue Dauer variiert von Tier zu Tier, ein Individuum behält jedoch das exakte Zyklusintervall mit größter Genauigkeit über mehrere Zyklen konstant bei [164]. Die Vaginalöffnung der Tiere ist über den Großteil des Zyklus zugewachsen und öffnet sich nur während des Zeitraums um den Eisprung für 3-6 Tage. Durch mikroskopische Untersuchung von Vaginalspülungen während dieser Zeit kann der exakte Tag der Ovulation (Tag 1) bestimmt werden. Im Gegensatz zu Ratten kann bei Meerschweinchen keine Scheinschwangerschaft durch tiefe Vaginalspülung ausgelöst werden [164].

Für die Studien wurden jungfräuliche Meerschweinchen-Weibchen verwendet, die vom ersten Zyklus an untersucht wurden. Dafür traten sie im Alter von 31 Tagen in die Studie ein. Die erste Ovulation trat zwischen dem 38. und 41. Lebenstag ein. Die Vagina wurde täglich untersucht. Bei ausreichender Öffnung wurden täglich Vaginalwaschungen mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/w) NaCl_(aq)) durchgeführt. Die erhaltenen Proben wurden sofort mikroskopisch untersucht und luftgetrocknet. Zu späteren Nachuntersuchungen wurden die getrockneten Proben mit Hema 3®Stain der Firma Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, New Jersey, USA, eingefärbt. Der erste leukozytische Vaginalabstrich indizierte den Tag der Ovulation des betreffenden Zyklus.

Die Tiere wurden für mindestens zwei zusammenhängende, reguläre Zyklen beobachtet, bevor sie dosiert wurden. Fünf Tiere wurden dann von Tag 12 ihres Zyklus an für 9 Tage täglich peroral dosiert. Aufbauend auf die Studien akuter Letalität wurden Dosismengen von 2,5, 5, 10 mg/kg/d TCPT und bei zwei Tieren 20 mg/kg/d TCPT ausgewählt. Nach der Dosierungsperiode wurden die Tiere wieder für mindestens zwei zusammenhängende Zyklen beobachtet. Zusätzlich zu einem mit leeren Kapseln dosierten Kontrolltier wurde ein zweites Kontrolltier

eingesetzt, welches (neben leeren Kapseln) nur so viel Futter erhielt, wie eines der mit 20 mg/kg/d TCPT dosierten Tiere freiwillig aufnahm („pair-fed“).

3.10.3 Kinetik von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Serum

Die Kinetik von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurde in Ratten und Meerschweinchen bestimmt. Die Tiere wurden mit Kanüle in der *Vena jugularis* direkt vom Vertreiber bezogen. Nach Lieferung wurden sie für mindestens einen Tag gepflegt, um sich nach dem Transport zu rehydrieren. Ratten hatten ein Körpergewicht von 227,5-263,6 g, Meerschweinchen von 444,9-460,9 g.

Bei diesen Studien wurden ausschließlich sterilisierte Instrumente verwendet. Die Sterilisation wurde am University of Kansas Medical Center durch den Sterilisationsdienst des Krankenhauses durchgeführt. Es wurde Silastic® Schlauch (ID 0,020 inches, OD 0,037 inches, Dow Corning Corporation Medical Products, Midland, Michigan, USA) und gestumpfte 23 G Spritzenadeln verwendet. Während der Untersuchung konnten sich die Tiere frei im Käfig bewegen, mit *ad libidum* Zugang zu Futter und Wasser.

3.10.3.1 Intravenöse Dosierung

Intravenöse Dosierung erfolgte über die kanülierte Drosselvene. Nach Dosierung wurde die Kanüle mit 20 international units (iu) Heparinlösung in isotoni-scher Kochsalzlösung gespült, gefüllt und verschlossen. Ratten wurden *i.v.* mit 1 mg/kg (ein Tier), 3 mg/kg (ein Tier), 5 mg/kg (fünf Tiere), 10 mg/kg (ein Tier) und 30 mg/kg TCPT mg/kg (zwei Tiere) dosiert. Meerschweinchen erhielten *i.v.* 10 mg/kg TCPT (zwei Tiere).

Aufgrund starker Löslichkeitsprobleme von TCPT in anderen Lösungsmitteln wurde Aceton verwendet. Hier wurde eine maximale Löslichkeit von 30 mg/ml ermittelt.

Die Dosierungslösungen für Ratten korrelierten jeweils mit der Dosis, z.B. hatte die Lösung zur Dosierung mit *i.v.* 5 mg/kg TCPT eine Konzentration von 5 mg/ml TCPT in Aceton, so daß alle Tiere in der Studie die gleiche Dosis Aceton (1 ml/kg) erhielten. Die Dosierungslösung für Meerschweinchen hatte eine Konzentration 20 mg/ml TCPT, so daß jedes Tier 0,5 ml/kg Aceton erhielt.

Die betreffenden Lösungen wurden unmittelbar (<30 min) vor jeder Dosierung frisch hergestellt und in einem verschraubbaren Glasgefäß abgedunkelt aufbewahrt.

3.10.3.2 Perorale Dosierung

Kinetik nach peroraler Dosierung wurde nur bei Ratten untersucht (Dosis *p.o.* 30 mg/kg TCPT). Die Dosierung erfolgte mittels Schlundsonde unter temporärer (15 sec) Narkose. Hierbei wurden die Tiere in einem abgeschlossenen Gefäß Methofane®* (Mallinckrodt Veterinary Incorporated, Mundelein, Illinois, USA) exponiert und bei Eintreten der Bewußtlosigkeit sofort entnommen und dosiert. Die gefüllten Kapseln wurden vor Verwendung mit Maisöl benetzt, um den Dosierungsvorgang zu erleichtern. Sie wurden direkt am Mageneingang ausgeworfen (siehe Abbildung 3-3).



Abbildung 3-3:
Dosierung einer Ratte mit Gelatine-Kapsel.
Auswurf der Kapsel am Mageneingang. Das Tier muß hierzu narkotisiert sein. (Bildquelle: Torpac Inc., Fairfield, New Jersey, USA).

* Methofane = 2,2-Dichlor-1,1-difluorethylmethylether

3.10.3.3 Probenahme und -aufarbeitung

Der Dosierung folgend fand eine Probenahme nach $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 8, 16, 24 bzw. 32 h statt. Hierbei wurden jeweils die ersten entnommenen Mikroliter Blut verworfen und dann 500 μ l als Probe entnommen. Diese wurde bis zur Aufarbeitung auf Eis gelagert. Das entnommene Volumen wurde durch isotonische Kochsalzlösung ersetzt, die Kanüle mit Heparinlösung gespült, gefüllt und verschlossen. Hierbei wurde für Zeiträume <2 h 20 iu, für <4 h 50 iu Heparin in isotonischer Kochsalzlösung und bei längeren Intervallen 50 iu Heparin in Glycerin verwendet.

Die Proben geronnenen Blutes wurden bei 4 °C für 16 min mit 9000 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde dann abpipettiert und bei -85 °C gelagert. Es erfolgte ein Versand auf Trockeneis (-78,5 °C), welcher nicht länger als vier Tage dauerte. Danach wurden die Proben wieder bei -85 °C aufbewahrt.

3.11 HPLC-ANALYTIK

3.11.1 Hintergrund Alkyl-Diol-Silica Technologie

Alkyl-Diol-Silica (ADS) ist ein Restricted Access Material (RAM), von Boos *et al.* zur HPLC-integrierten online-Probenaufarbeitung biologischer Matrices entwickelt [165-169]. Die sphärischen 25 μ m Silica-Partikel verfügen über Adsorptionszentren, die nur für den Analyten erreichbar sind. Es handelt sich um Poren ($\varnothing=60$ Å), die für Substanzen mit Molekulargewichten >15.000 Dalton unzugänglich sind, und deren innere Oberfläche mit RP-18, RP-8 oder RP-4 besetzt ist. Proteine werden durch sterische und elektronische Barrieren von der direkten Interaktion mit der Festphase abgehalten: Die äußeren Oberflächen der ADS sind durch Diolgruppen elektroneutral und hydrophil und verfügen somit über für Proteine non-adsorptive und nicht-denaturierende Eigenschaften (Abbildung 3-4).

Bei dieser etablierten Methode (Vertrieb durch Merck KGaA, Darmstadt) besteht der einzige Schritt der offline Probenbearbeitung in der Zentrifugation des

biologischen Rohmaterials. Marixabhängig erfolgt davor eine Homogenisierung. Der erhaltene Überstand wird direkt in das HPLC-System injiziert. Dieses besteht im wesentlichen aus zwei unabhängigen Pumpen und einem Sechs-Wege-Schaltventil, mit welchem die ADS-Kartusche und die analytische Säule ge- und entkoppelt werden können (Schaltplan siehe Abbildung 3-5). Es bestehen zwei getrennte Eluenten-Systeme: Ein System zum Betrieb der ADS-Kartusche, und eines für die analytische Säule.

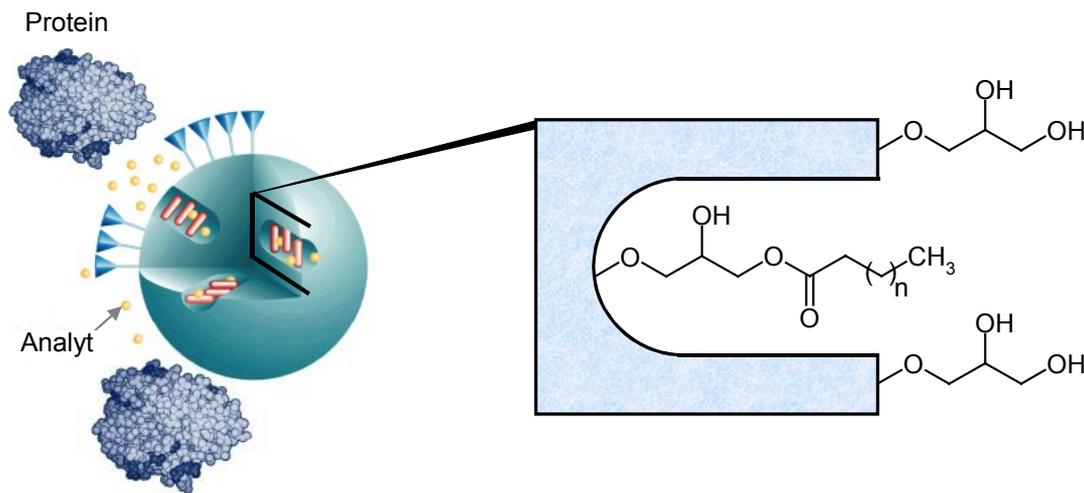


Abbildung 3-4:
Struktur und Aufbau von Alkyl-Diol-Silica.
 (Bildmaterial in Abwandlung von: ISIS Technologies, Lawrence, Kansas, USA)

Zuerst wird die ADS-Kartusche konditioniert. Hierzu durchfließt der polare Eluent diese und wird danach verworfen. Nach der Injektion durchfließt die Bioprobe die ADS-Kartusche. Hierbei werden die Analyten bzw. der Analyt zurückgehalten, während die Matrix abfließt. Wichtiger Aspekt ist die Verwendung einer mobilen Phase mit 2-15 % Methanolanteil in Wasser. Schon 1-2 % Methanol bewirken die Dissoziation Protein-gebundener Analyten vom Eiweiß^[170], was einen wesentlichen Teilschritt der online-Probenaufarbeitung darstellt. Oberhalb von 15 % Methanol besteht die Gefahr der Protein-Ausfällung, welche die ADS-Kartusche dauerhaft schädigen können.

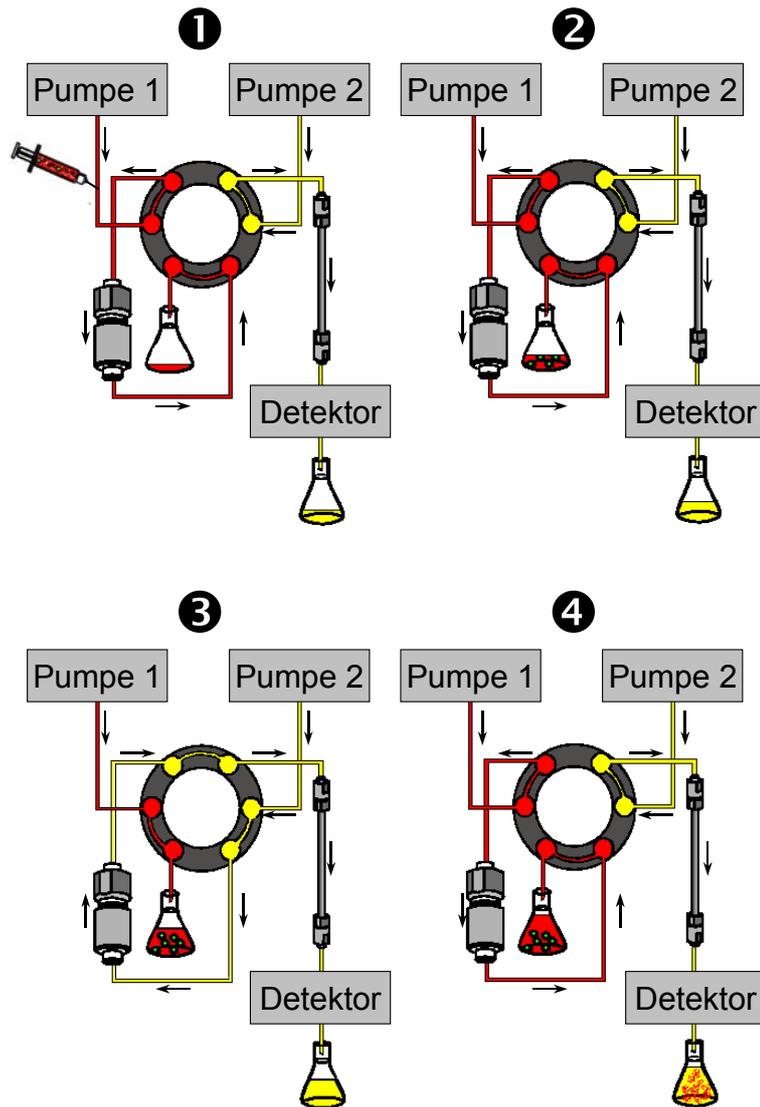
Abbildung 3-5:
Schaltplan der HPLC-Anlage
zur Anwendung der ADS-
Technologie.

❶ System bereit zur Injektion. Die Bioprobe wird mit polarem Eluent durch die ADS-Kartusche geleitet. Die analytische Säule wird währenddessen konditioniert.

❷ Die Matrix wird von der ADS-Kartusche eluiert, Analyten werden zurückgehalten.

❸ Nach vollständiger Eluierung der Matrix wird das Sechs-Wege-Ventil umgeschaltet und der Analyt mit einem unpolaren Eluent im Rückflußverfahren von der ADS-Kartusche eluiert und auf die analytische Säule gebracht.

❹ Nach beendetem Transfer des Analyten wird das Sechs-Wege-Ventil umgeschaltet, um die ADS-Kartusche noch während der Messung neu zu konditionieren.



Beim Fluß der Probe durch die ADS-Kartusche findet eine Fraktionierung statt: Der unpolare Analyt hat eine größere Affinität zum ADS als Proteine und eluiert folglich als letztes. Nach vollständiger Eluierung der polaren Matrixelemente schaltet das Sechs-Wege-Ventil den Fließmittelstrom um, so daß die zweite Pumpe, welche bisher die analytische Säule konditionierte, nun unpolares Lösungsmittel im Rückflußverfahren durch die ADS-Kartusche leitet. Hierdurch desorbiert der Analyt und wird in einem extrem verkürzten Zeitfenster aufkonzentriert auf die analytische Säule transferiert. Währenddessen kommt der ersten Pumpe keine Aufgabe zu, ihre Flußrate kann reduziert werden. Nach vollständigem Transfer schaltet das Sechs-Wege-Ventil die Fließmittelläufe wieder zurück, damit die ADS-Kartusche (mit

normaler Flußrate) schon für die nächste Injektion neu konditioniert werden kann. Derweil findet eine Separation auf der analytischen Säule statt, und der Analyt kann beim Austreten detektiert/quantifiziert werden.

3.11.2 Anwendung Alkyl-Diol-Silica-Technologie

Eine über die Probengewinnung* hinausgehende Probenbearbeitung fand nicht statt. Es wurde eine LiChroCART® 25-4 LiChrospher® RP-4 ADS verwendet, die freundlicherweise von Herrn Prof. Boos des Instituts für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt wurde. Das Kartuschengehäuse wurde von Merck KGaA, Darmstadt, über IRIS Technologies, L.L.C., Lawrence, Kansas, USA, bezogen. Dem Injektor war eine Fritte (Inline-Filter ADS, Merck KGaA, Darmstadt) nachgeschaltet, um das System vor Mikropartikeln zu schützen. Eine der analytischen Säule vorgeschaltete Filtereinheit (Security Guard™ C18 ODS (Octadecyl-Silica) 4 mm Länge x 3.0 mm ID, Phenomenex, Aschaffenburg) verhinderte die Verunreinigung der Säule mit unpolaren Matrixbestandteilen wie Fetten. Als analytische Säule diente eine Nukleosil C18 5 µ 250x4,0 mm (VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin; Vertrieb: Altmann Analysentechnik, Holzkirchen). Die verwendeten Eluenten (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien) waren Wasser (Reservoir A, HPLC gradient grade) und Methanol (Reservoir B, HPLC grade).

Um die Schaltzeiten des Sechs-Wege-Ventils entsprechend programmieren zu können, mußten zuvor die Eluierung der Matrix von der ADS-Kartusche, der Durchbruch des Analyten durch die ADS-Kartusche und die Dauer des Analytentransfers auf die analytische Säule in Vorversuchen bestimmt werden. Hierbei wurde Serum unbehandelte Tiere verwendet, welches mit 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin versetzt worden war†.

* Siehe Kapitel 3.10.3.3

† Siehe Kapitel 3.11.3

Im ersten Vorversuch wurde die ADS-Kartusche direkt mit dem Detektor verbunden, um den Zeitpunkt der kompletten Proteineluierung (t_M , gemessen bei $\lambda=280$ nm), sowie der anschließende Durchbruch des Analyten (t_A , gemessen bei $\lambda=264$ nm, siehe Kapitel 4.4.3) zu bestimmen.

Merck KGaA legt den Zeitpunkt der ersten Schaltung (t_{V1}) des Ventils wie folgt fest ^[170]:

$$\begin{array}{lll} \text{Für } t_A & <10 \text{ min:} & t_{V1} = \frac{1}{2}(t_M+t_A) \\ & >10 \text{ min:} & t_{V1} \geq t_M+5 \text{ min} \end{array}$$

Der nächste Schritt war ein zweiter Vorversuch, bei dem die komplette Rückfluß-Eluierung des Analyten von der ADS Kartusche bestimmt wurde. Dazu wurde das Schaltventil eingebaut, doch die analytische Säule ausgelassen und statt dessen direkt der Detektor geschaltet. Die mit Substanz versetzte Bioprobe wurde injiziert und das Ventil nach t_{V1} umgeschaltet. Sobald der Transfer von der ADS-Kartusche erfolgt war (t_T), kann das Schaltventil die ADS Kartusche aus dem Analytiksystem zur Rekonditionierung ausnehmen. Für den Zeitpunkt dieser zweiten Schaltung (t_{V2}) gilt: $t_{V2} \geq t_T+1$ min.

Auf einen Autosampler wurde generell verzichtet, um Degradationseffekte auf ein methodisch und instrumentell bedingtes, absolutes Minimum zu reduzieren. Daher wurden die Proben einzeln zur Injektion von -84°C mittels Handwärme aufgetaut und nach Durchmischung manuell injiziert.

Folgende Geräte und Programmierungen wurden verwendet:

- Pumpe 1 (zu ADS Kartusche): 655A-11 Liquid Chromatograph (Merck-Hitachi, Darmstadt) in Verbindung mit L-5000 LC Controller (Merck-Hitachi, Darmstadt).
- Programmierung (incl. Einsparung von Fließmittel während der Analyse sowie Spülung und Konditionierung der ADS nach jedem Lauf).

max 245 bar

time (min)	%A	%B	flow (ml/min)
0.0	95	5	1.0
15.5	95	5	1.0
16.0	95	5	0.1
20.5	95	5	0.1
21.0	0	100	1.0
26.0	0	100	1.0
26.5	95	5	1.0
40.0	95	5	1.0

- Pumpe 2 (zur analytischen Säule): L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt).
 - Programmierung (incl. Spülung der analytischen Säule nach und Konditionieren vor jedem Lauf):

max 300 bar

time (min)	%A	%B	flow (ml/min)	event
0.0	8	92	1.0	
0.1	8	92	1.0	52
15.0	8	92	1.0	12, 52
20.0	8	92	1.0	22
35.0	8	92	1.0	
36.0	0	100	1.0	
40.0	0	100	1.0	

- Event-Codierung:

12 = Schaltventil auf LOAD Position

22 = Schaltventil auf INJECT Position

52 = AUTO ZERO Detektor

- Detektor: L-3000 Photo Diode Array Detector (Merck-Hitachi, Darmstadt). Die Funktion des Detektors bzw. der UV-Lampe wurde durch Messung einzelner Standards zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Gesamtanalysenzeitraums überprüft und durch konstante Messungen bestätigt.
- Säulen Thermostatofen (Beckmann, Krefeld): 25 °C.
- Computer-Schnittstelle: D-6000 Interface (Merck-Hitachi, Darmstadt).

Die Datenauswertung erfolgte an einem PC mit dem Programm D-6000 HPLC Manager Version 2 (E. Merck, Darmstadt; Hitachi Instruments Inc., San Jose, Kalifornien, USA). Außer zu Messungsbeginn (elektronische Übermittlung der Injektorposition) wurde die komplette Steuerung nicht vom Computer, sondern mit Hilfe der Intelligent Pump vorgenommen. Daher sind nur folgende Konfigurationen von Bedeutung:

- Data Processing Ch1 Set-up

- Data Acquisition:

Stop Time (min)	60.00
Data Sampling Mode	AUTO
Start Period (msec)	100
Doubling Time (min)	10.00

- Integration Time Table

Step	Time	Function	Value/Status
1	0.00	Noise-Value	10
2	0.00	Sensitivity	25
3	0.00	N-Method	0
4	0.00	Integr-Inhib	ON
5	15.00	Integr-Inhib	OFF
6	35.00	Integr-Inhib	ON

Anmerkung: Der Noise Value wurde während der Untersuchungen mehrfach neu bestimmt und erwies sich als konstant.

○ System Configuration:

Gradient Controller:	NONE
Detector (Channel 1):	OTHER
Sample Type:	MANUAL

3.11.3 Herstellung der Standards

TCPT wurde auf einer stets neu kalibrierten Analysenwaage (R200D, Sartorius AG, Göttingen) abgewogen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von TCPT wurde es zuerst in Aceton (picograde, Promochem, Wesel) aufgenommen und eine Lösung der Konzentration 400 µg/ml hergestellt. Von dieser wurden 50 µl entnommen und zu 1 ml Serum unbehandelte Tiere gegeben. Hierbei kam es zu keiner Präzipitation. Nach mehrfachem Schütteln und Verflüchtigen des Acetons wurden Verdünnungsreihen unter Verwendung von 50 µl und 100 µl-Hamiltonspritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) hergestellt. In der Größenordnung erwarteter Realprobenkonzentrationen wurden Standardlösungen von TCPT in Höhe von 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15 und 20 mg/ml in Rattenserum und 0,1, 1, 5, 10 und 20 µg/ml in Meerschweinchenserum hergestellt und jeweils doppelt gemessen. Lineare Regression der jeweiligen arithmetischen Mittel ergab gute Standardgeraden ($R^2_{(\text{Ratten})}=0,9921$ (n=9), $R^2_{(\text{Meerschweinchen})}=0,9941$ (n=5)).

Das Detektionslimit (LOD) lag bei 0,01 µg/ml, das sichere Quantifizierungslimit (LOQ) wurde bei 0,05 µg/ml festgelegt.

Die Flächenmessungen der Standardlösungen wurden in Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) übertragen und linearer Regression unterworfen. Die resultierende Geradengleichung wurde zur Auswertung der Realproben verwendet.

3.11.4 Messung

Alle Proben wurden mittels 100 µl-Hamilton Spritze manuell in eine 100 µl-Schleife am Injektor injiziert. Das Umschalten des Injektors startete die Datenaufnahme per PC. Mit einer Verzögerung von $\leq 0,5$ sec wurden beide Pumpen manuell gestartet. Die verwendete Hamilton Spritze wurde je sechsmal mit Wasser (HPLC gradient grade) und Aceton (picograde) gespült und die Nadel nach jeder dritten Spülung abgewischt, um Kontamination der folgenden Proben zu verhindern. Ebenso wurden die Proben vom spätesten zum frühesten Zeitpunkt eines Tieres gemessen und nach der höchstkonzentriertesten Probe das gesamte System mit einprozentiger BSA-Lösung (Albumin, Bovine, Fraktion V, min 98 % (electrophoresis), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinfeld) in Wasser (HPLC gradient grade) gereinigt. Der Injektor wurde zu diesen Zeitpunkten mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser gespült. Die Sauberkeit des Systems wurde stets mittels Leermessungen überprüft, bevor Messungen am nächsten Tier durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde das System täglich vor Beginn der Messungen mindestens 1,5 Stunden gespült, um Kontaminationen zu verhindern und konstante Meßbedingungen auch durch Aufwärmen des Detektors zu gewährleisten.

3.11.5 Auswertung

Die TCPT-Konzentrationen in Realproben wurden anhand von Flächenmessungen mittels Standardgerade quantifiziert. Die automatische Integration der Spektren wurde bei allen Messungen überprüft und, falls notwendig, die Integrationsgrenzen manuell dem Signalverlauf angepaßt. Dies wurde jeweils Tage nach der Messung und vor dem Datenvergleich und der Datenübertragung in Excel durchgeführt, so daß eine doppelt blinde Flächenbestimmung jederzeit gewährleistet war.

Eine Kurvenanpassung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Als Regressionsparameter wurde, basierend auf

den Grundlagen der Pharmakokinetik, exponentieller Abbau a) einfach, 2 Parameter, $y=ae^{-bx}$ (Ein-Kompartiment-Modell), b) doppelt, 4 Parameter, $y=ae^{-bx}+ce^{-dx}$ (Zwei-Kompartiment-Modell), c) dreifach, 6 Parameter, $y=ae^{-bx}+ce^{-dx}+ge^{-hx}$ (Drei-Kompartiment-Modell) gewählt. Aus der Gleichung, die die betreffende Kurve am besten beschrieb, wurde die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) aus dem Exponenten ($E=b, d, h$) der einzelnen Summanden als Quotient aus $\ln(2)$ bestimmt: $t_{1/2}=\ln(2)/E$. Der erste Summand der Kurvengleichung beschreibt die Verteilungsphase (falls vorhanden), der letzte die Eliminationsphase.

Parallel dazu erfolgte eine Verrechnung der Kurven auf konventionelle Methode („feathering“, „curve-stripping“): Von den auf einer semi-logarithmischen Graphik linearen Bereichen der Konzentrationskurve wurden die Konzentrationswerte logarithmiert und mit den betreffenden Zeitpunkten einer linearen Regression unterworfen. Bei mehr als einer log-Geraden (Mehr-Kompartiment-Modell) wurde die zeitlich letzte jeweils von der/den zeitlich vorherigen subtrahiert, um die wahre Verteilungsphase zu erhalten. Aus der Steigung der log-Geraden wurde die jeweilige Halbwertszeit (Resorptionshalbwertszeit $t_{1/2(\text{Resorp})}$; Verteilungshalbwertszeit $t_{1/2(\text{Vert})}$; Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2(\text{Elim})}$) berechnet (s.o.).

3.12 SICHERHEITSHINWEISE

Da das toxische Potential von TCPT unbekannt war, wurden die für TCDD gültigen Sicherheitsbestimmungen (persönliche Schutzbekleidung, Handhabung, etc.) unverändert auf die Arbeiten mit TCPT übertragen und bei den unternommenen Untersuchungen, beginnend bei den Syntheseversuchen, konsequent angewandt.

4.1 SYNTHESE - EXPERIMENTALANSÄTZE

Die verschiedenen Syntheseveruche resultierten in meist komplexen Produktgemischen. Wenn vom $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des (vorgereinigten) Rohproduktes her sinnvoll, wurde eine weitere Aufreinigung durchgeführt. Da die Zielsetzung aufgrund davon abhängiger Folgeuntersuchungen streng auf die erstmalige Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin fokussiert war, galt die Identifizierung und Quantifizierung anderer Reaktionsprodukte aus zeitlichen Gründen nur dann als anstrebenswert, wenn dadurch ein Beitrag zur Optimierung der Syntheseplanung für 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin geleistet werden konnte.

4.1.1 Untersuchungen an einstufigen Synthesen

4.1.1.1 Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure

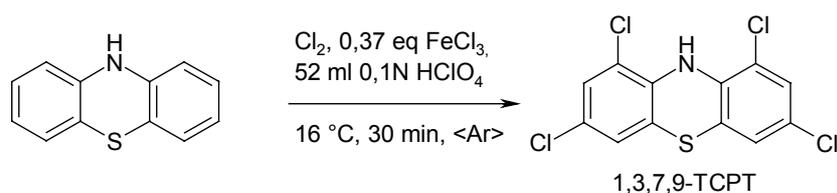
Hintergrund

Nach vorhergehenden Syntheserfahrungen^[155] wurde auf erlangten Erkenntnissen aufgebaut und die direkte Chlorierung von Phenothiazin unter stärker protischen Bedingungen versucht^[171, 172]. Es war davon auszugehen, durch N-Protonierung dirigierende Effekte zu erhalten, die die Substitution an den erwünschten Positionen favorisierte. Hierzu wurde Perchlorsäure im Eisessigmedium eingesetzt.

Reaktion

Gleichung 4-1:

Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure.



Trotz Einsatzes der stark protonierenden Perchlorsäure wurde das selbe Produkt erhalten wie bei der Durchführung der Reaktion in reinem Eisessig ^[153-155], namentlich 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin. Die Reaktion ist regioselektiv. Die Identität des Produktes wurde mittels NMR-Spektroskopie, GC/MS und Schmelzpunktvergleich (231 °C) bestimmt. Der Schmelzpunkt lag innerhalb von 4 °C an der Literaturangabe von 1956 ^[5] (Smp 235 °C). Auch eine größere oxidative Störung der Reaktion fand, trotz des hohen Oxidationspotentials der Perchlorsäure ($\epsilon_0=+1,38$ V), nicht statt, zumal Perchlorsäure in verdünntem Zustand aufgrund kinetischer (sterischer) Bedingungen ein weit geringeres Oxidationsvermögen als in konzentriertem Zustand aufweist ^[173]. Phenothiazin ist eine schwache Base; sowohl in Eisessig als auch in der Perchlorsäure-Lösung liegt ein Gleichgewicht vor. Die freie Base reagiert wesentlich schneller als die protonierte Form.

¹H-NMR (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in CDCl₃):

$\delta(\text{ppm})=6,89$ (d, $^4J=1,5$ Hz, 2H, C2/C8), 7,06 (s, 1H, NH), 7,14 (d, $^4J=1,7$ Hz, 2H, C4/C6)

¹H-NMR (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in THF-d₈):

$\delta(\text{ppm})=7,05$ (dd, $^4J=2,2$ Hz, $^5J=0,5$ Hz, 2H, C2/C8), 7,14 (s, 1H, NH), 7,27 (d, $^4J=1,8$ Hz, 2H, C4/C6)

¹H-NMR (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in DMSO-d₆):

$\delta(\text{ppm})=7,21$ (s, 1H, NH), 7,26 (d, $^4J=2,2$ Hz, 2H, C2/C8), 7,46 (d, $^4J=2,2$ Hz, 2H, C4/C6)

¹³C-NMR (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in THF-d₈):

$\delta(\text{ppm})=121,09$ (C-Cl), 121,89 (C-Cl), 125,92 (C-H), 128,46 (C-H), 128,67 (C-N), 136,87 (C-S)

HMBC (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in THF-d₈):

Über 3 Bindungen: $\delta(\text{ppm}) = 125,92/7,27$ (C2-H4, C8-H6), $128,67/7,27$ (C11-H4, C14-H6), $128,46/7,05$ (C4-H2, C6-H8), $128,67/7,05$ (C11-H2, C14-H8)

Über 4 Bindungen: $\delta(\text{ppm}) = 121,09/7,27$ (C1-H4, C9-H6), $136,87/7,05$ (C12-H2, C13-H8)

HMQC (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in THF-d₈):

Über 1 Bindung: $\delta(\text{ppm}) = 125,92/7,05$ (C2-H2, C8-H8), $128,46/7,27$ (C4-H4, C6-H6)

GC/MS (1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin): Retentionszeit (t_R)=38:05 min

335 (77 % (C₁₂H₅Cl₄NS⁺)), 300 (41 % (C₁₂H₅Cl₃NS⁺)), 264 (19 % (C₁₂H₄Cl₂NS⁺)), 230 (13 % (C₁₂H₅CINS⁺)), 194 (10 % (C₁₂H₄NS⁺))

Fazit

Die direkte Chlorierung von Phenothiazin kann zweifelsfrei als synthetischer Zugang zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin ausgeschlossen werden. Es entstand 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin in einer Ausbeute von 21,1 %. Dies lag weit unter der historischen Ausbeute von 80 %, bei der ein analoger Syntheseweg in Nitrobenzol beschritten wurde [5].

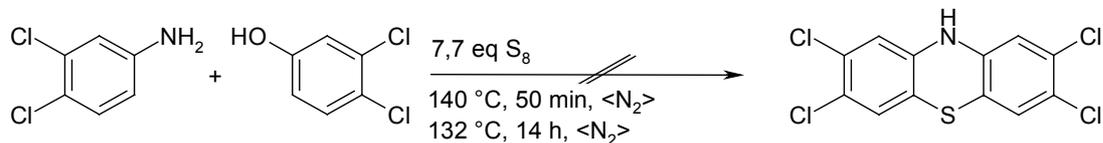
4.1.1.2 Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel**Hintergrund**

Die Reaktion wurde in Analogie zu einem schweizer Patent aus dem Jahre 1939 durchgeführt [174], das zur einstufigen Herstellung von 3-Hydroxyphenothiazin diente.

Reaktion

Gleichung 4-2:

Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel.



Nach dem ersten Reaktionsabschnitt konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie lediglich Startmaterial nachgewiesen werden.

Nach der 14-stündigen Nachreaktion war ein penetranter, stechender Geruch nach Katzenurin entstanden. Das Reaktionsgemisch war ein schwarzbraunes Öl. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes war ein Verschwinden der $-\text{OH}$ und $-\text{NH}_2$ -Protonen, jedoch kein Auftreten eines Ar_2NH Protons, wie von der Zielverbindung zu erwarten gewesen, zu sehen. Es blieben alle drei Arylprotonen beider Verbindungen im gleichen Mengenverhältnis innerhalb der Verbindungen erhalten. Doch stellte sich ein Mengenverhältnis zwischen den Signalen beider Verbindungen von Dichlorphenol/Dichloranilin= $3/2$ heraus. Des weiteren waren unzählige kleinere Multipletts entstanden ($^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ppm})=1-2,5$), die nicht auf die gewünschte Zielverbindung hinwiesen. Die folgenden $^1\text{H-NMR}$ -Daten beschreiben die dominanten Signale. Aufgrund fehlender Hinweise auf 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin erfolgte keine Auftrennung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten des Rohproduktes.

$^1\text{H-NMR}$ (Reaktionsgemisch in CDCl_3):

$\delta(\text{ppm})=1,54$ (s, 3H), 2,21 (s, 8H), 6,51 (dd, $^4J=2,6$ Hz, $^3J=8,8$ Hz, 4H, C6 ehem. Dichloranilin), 6,69 (dd, $^4J=2,6$ Hz, $^3J=8,8$ Hz, 6H, C6 ehem. Dichlorphenol), 6,76 (d, $^4J=2,6$ Hz, 4H, C2 ehem. Dichloranilin), 6,94 (d, $^4J=2,6$ Hz, 6H, C2 ehem. Dichlorphenol), 7,17 (d, $^3J=8,8$ Hz, 4H, C5 ehem. Dichloranilin), 7,24 (d, $^3J=8,8$ Hz, 6H, C5 ehem. Dichlorphenol)

Fazit

Es fand zwar eine Reaktion der Heteroatome statt, doch kam es weder zur Bildung einer Ar₂NH Brücke, noch zu einer Reaktion an den Ringprotonen. Aufgrund des Fehlens eines NH₍₂₎- oder OH-Signals wird von der Bildung einer Sauerstoffbrücke unter Freisetzen ammoniakalischer/aminischer Gase (Geruch!) ausgegangen. Ein weiteres Verfolgen dieses Syntheseweges als einstufigen Zugang zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin war somit unzuweckmäßig.

4.1.1.3 Zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators

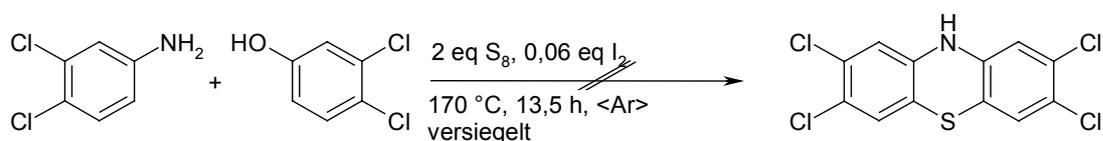
Hintergrund

Im Jahr 1956 stellte Massie ^[175], die Synthese von 1-Methylphenothiazin aus 2-Methyldiphenylamin und Schwefel unter Iodkatalyse vor. In Abwandlung und Kombination mit o.g. schweizer Patent ^[174] wurde ein einstufiger Syntheszugang zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin versucht.

Reaktion

Gleichung 4-3:

Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.



Beim Öffnen des Reaktionsgefäßes bei Raumtemperatur nach Reaktionsende stand dieses unter Druck und ein weißes Gas mit stechendem Geruch entwich. Iod war als violette Kristalle am Gefäßdeckel erkennbar, am oberen Rand des Gefäßes waren rotbraune, nadelförmige Kristalle, die mittels ¹H-NMR-Spektroskopie als Edukt Dichlorphenol identifiziert werden konnten. Es war nach Abkühlung der Reaktionsmischung sublimiert. Unterhalb eines Schwefelspiegels lag das Reaktions-

produkt als erstarrter, schwarzer Schaum vor. Eine $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse zeigte trotz Sättigung der Analysenlösung (CDCl_3) keine Signale im quantifizierbaren Bereich.

Fazit

Dichlorphenol mit dem niedrigeren Siedepunkt ($145\text{ }^\circ\text{C}$) war z.T. in der Gasphase und sublimierte beim Abkühlen, während Dichloranilin (Sdp $272\text{ }^\circ\text{C}$) im Reaktionsgemisch verblieb und wahrscheinlich thermolysierte; die Zielverbindung 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurde nicht gebildet.

4.1.2 Untersuchungen an zweistufigen Synthesen

4.1.2.1 *N*-Formylierung von Phenothiazin und anschließende Chlorierung

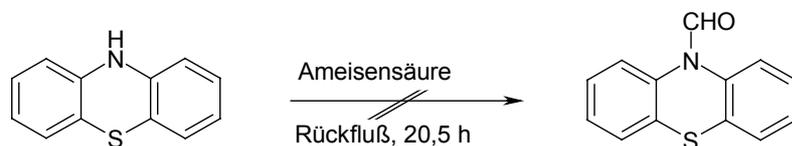
4.1.2.1.a) *N*-Formylierung von Phenothiazin durch Ameisensäure

Hintergrund

Phenothiazin sollte durch Bildung des Formamids für eine wie in Kapitel 4.1.1.1 beschriebene Chlorierung aktiviert werden, um das Substitutionsmuster wie gewünscht zu steuern.

Reaktion

Gleichung 4-4:
Untersuchte *N*-Formylierung von Phenothiazin durch Ameisensäure.



Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum des reinen Produktes wies dreizehn Signale auf. Bei einer Substitution am Stickstoff wären, aufgrund der Symmetrie, jedoch lediglich sieben Signale aufgetreten. Dies ist ein eindeutiges Argument gegen eine *N*-Formylierung. Es ist somit von einer Ringsubstitution auszugehen, da im

GC/MS-Spektrum eine Verbindung der Masse eines formylierten Phenothiazins (2- oder 3-Formylphenothiazin) den Hauptbestandteil (97,6 % Flächenanteil) des Produktes darstellte.

¹H-NMR (2- oder 3-Formylphenothiazin in CDCl₃):

δ(ppm)=7,31 (m, 7H), 7,74 (d, ³J=7,89 Hz, 1H, C2 bei 3-subst./C4 bei 2-subst.), 8,66 (s, 1H, CHO)

¹³C-NMR (2- oder 3-Formylphenothiazin in CDCl₃):

δ(ppm)=121,83, 125,57, 127,01, 127,10, 127,46, 127,65, 127,71, 129,38 (C-Heteroatom), 130,87 (C-Heteroatom), 135,11 (C-Heteroatom), 137,31 (C-Heteroatom), 161,03, 200,34 (CHO)

(Anm.: Die Zuordnung der nicht benannten Signale ist aufgrund der geringen Verschiebungsdifferenzen mittels Inkrementrechnung nicht eindeutig möglich)

GC/MS (2- oder 3-Formylphenothiazin): *t_R*=25,53 min

227 (72 % (C₁₃H₉NOS⁺)), 198 (100 % (C₁₂H₈NS⁺)), 166 (20 % (C₁₂H₈N⁺))

Fazit

Mit 657,3 mg Ausbeute und hoher Reinheit ergab die Reaktion ein Arylformyliertes Phenothiazin, das jedoch nicht der Zielverbindung entsprach.

4.1.2.1.b) *Direkte Chlorierung von N-Formylphenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure*

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hergestellt werden können (aus 4.1.2.1.a)).

4.1.2.2 N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid und anschließende Chlorierung

4.1.2.2.a) N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid

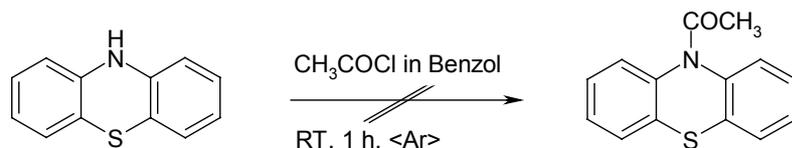
Hintergrund

Als Alternative zur Formylierung sollte die Acetylierung ^[176] vor einer wie in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen direkten Chlorierung durchgeführt werden, um das Substitutionsmuster wie gewünscht zu steuern.

Reaktion

Gleichung 4-5:

Untersuchte N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid.



Das ¹H-NMR-Spektrum gab keine offensichtlichen Hinweise auf gebildetes Zielprodukt im Rohprodukt, so daß die Reaktion nicht weiter (per ¹³C-NMR-Spektroskopie) untersucht wurde. Erst ein späteres GC/MS-Spektrum wies auf die Bildung eines Acetylphenothiazins hin. Das Substitutionsmuster war daraus nicht erkennbar.

¹H-NMR (Rohprodukt in CDCl₃):

$\delta(\text{ppm})=2,21(\text{s}, 3\text{H}, \text{CH}_3)$, $5,83(\text{s}, 0,4\text{H}, \text{NH})$, $6,56(\text{d}, J=7,9\text{ Hz}, 1\text{H})$, $6,82(\text{m}, 1\text{H})$, $6,99(\text{m}, 2\text{H})$, $7,23(\text{m}, 2\text{H})$, $7,33(\text{m}, 2,5\text{H})$, $7,44(\text{m}, 2\text{H})$, $7,51(\text{d}, J=7,6\text{ Hz}, 2\text{H})$

GC/MS (Acetylphenothiazin): $t_{\text{R}}=25:53\text{ min}$

241 (27 % ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NOS}^+$)), 198 (68 % ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{NS}^+$)), 166 (8 % ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}^+$))

Fazit

Die Reaktion kann aufgrund späterer Nachforschungen nicht völlig zweifelsfrei als negativ bezeichnet werden; es kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit von einer der Formylierung analogen Substitution am Arylring ausgegangen werden.

4.1.2.2.b) Direkte Chlorierung von N-Acetylphenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hat hergestellt werden können (aus 4.1.2.2.a)).

4.1.2.3 Bildung des Diarylamins und anschließende intramolekulare Reaktion

4.1.2.3.a) Bildung des Diarylamins aus 3,4-Dichloranilin und 1-Brom-3,4-dichlorbenzol durch basische Schmelze mit Katalysator

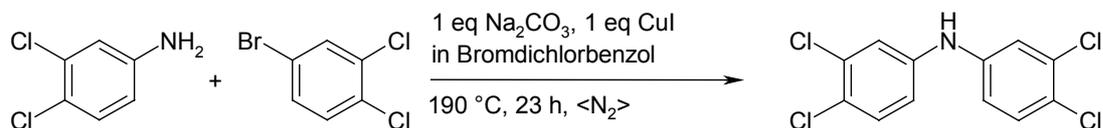
Hintergrund

Basierend auf dem Ringschluß bei der Synthese von 2-Azaphenothiazin^[177], einem heteroaromatischen Verwandten des Phenothiazins, wurde die Bildung des Diarylamins verfolgt.

Reaktion

Gleichung 4-6:

Bildung des Diarylamins aus 3,4-Dichloranilin und 1-Brom-3,4-dichlorbenzol durch basische Schmelze mit Katalysator.



Der Überschuß an eingesetztem 1-Brom-3,4-dichlorbenzol lag in dem niedrigen Siedepunkt dieser Chemikalie begründet (124 °C, verglichen mit 3,4-Dichloranilin: 272 °C). Es mußte dem in der Vigreuxkolonne kondensierenden

Anteil des 1-Brom-3,4-dichlorbenzols Rechnung getragen werden. Das Rohprodukt war ein Gemisch aus fünf Verbindungen, aus denen die Zielverbindung rein gewonnen werden konnte.

¹H-NMR (3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin in CDCl₃):

δ(ppm)=5,70 (s, 1H, NH), 6,89 (dd, ³J=8,6 Hz, ⁴J=2,6 Hz, 2H, C6/C6'), 7,14 (d, ⁴J=2,6 Hz, 2H, C2/C2'), 7,34 (d, ³J=8,7 Hz, 2H, C5/C5')

¹³C-NMR (3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin in CDCl₃)

δ(ppm)=117,55 (C6/C6'), 119,59 (C2/C2'), 124,84 (C4/C4'), 131,04 (C5/C5'), 133,26 (C3/C3'), 141,932 (C1/C1')

GC/MS (3,3',4,4'-Tetrachlordiphenylamin): *t*_R=32:36 min

241 (54 % (C₁₂H₇Cl₄N⁺)), 269 (8 % (C₁₂H₆Cl₃N⁺)), 235 (100 % (C₁₂H₇Cl₂N⁺)), 200 (16 % (C₁₂H₇ClN⁺))

Fazit

Der erste Schritt der angestrebten zweistufigen Synthese war erfolgreich. 3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin konnte in höchster Reinheit als orangefarbene Kristalle mit einer Ausbeute von 14,1 % hergestellt werden.

4.1.2.3.b) *Zyklisierende Dehydrierung von 3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators*

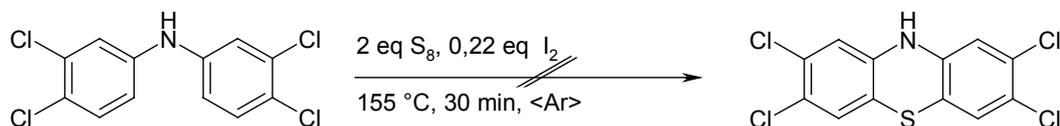
Hintergrund

Gilman hat bereits 1944 von der erfolgreichen Synthese von Phenothiazinen über Zyklisierung des Diarylamins berichtet [8]. In Anlehnung an seine Arbeiten wurden weitere erfolgreiche, historisch bedeutsame Phenothiazinsynthesen aus Diarylaminen beschrieben [178, 179].

Reaktion

Gleichung 4-7:

Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,3',4,4'-Tetrachlor-diphenylamin bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.



Nachdem in der Originalliteratur von Gilman [8] eine Reaktionsdauer von nur 20 min ausreichte, wurde in der vorliegenden Reaktion nach 30 min abgebrochen und der Reaktionsfortschritt per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Es ergab reinstes Ausgangsmaterial. Da selbst geringe Produktmengen NMR-spektroskopisch nachweisbar gewesen wären, kann davon ausgegangen werden, daß die Reaktion unter den gegebenen Bedingungen nicht stattfindet.

Fazit

Dieser historisch bedeutsame Phenothiazin-Syntheseweg ist mit 3,3',4,4'-tetrachloriertem Diphenylamin nicht gangbar.

4.1.2.4 Bildung des Diarylsulfids und anschließende intramolekulare Reaktion

4.1.2.4.a) *Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension*

(Vgl. Kapitel 4.3.1)

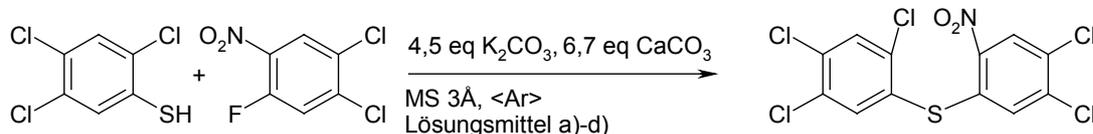
Hintergrund

Die Synthese von einfachen oder gemischten Thioethern ist in Lehrbüchern beschrieben [180]. Trotz ihres historischen Ursprungs finden die hier verwendeten Reaktionsbedingungen auch in modernsten, komplexen Naturstoffsynthesen, z.B. der Synthese des Antibiotikums Vancomycin [181], Anwendung.

Reaktion

Gleichung 4-8:

Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension.



Die Durchführung der Synthese in verschiedenen Lösungsmitteln zeigte Unterschiede in den Ausbeuten: DMF 31,9 %, Aceton 35,2 %, THF 65,6 %, Dichlormethan >97 %.

¹H-NMR (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=6,79$ (s, 1H, C3), $7,75$ (s, 1H, C2'), $7,83$ (s, 1H, C6), $8,41$ (s, 1H, C5')

¹³C-NMR (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=127,77$ (C5'), 128,63 (C-H), 129,09 (C1'), 130,53, 131,30, 132,55 (C-H), 132,89, 135,94, 136,82 (C5), 138,61 (C3'), 138,80 (C-H), 139,75 (C6')

(Anm.: Die Zuordnung der nicht benannten Signale ist aufgrund der geringen Verschiebungsdifferenzen mittels Inkrementrechnung nicht eindeutig möglich)

GC/MS (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid): $t_R=43:08$ min

401 (10 % (C₁₂H₄Cl₅NO₂S⁺)), 354 (2 % (C₁₂H₃Cl₅S⁺)), 337 (3 % (C₁₂H₄Cl₅NO₂S⁺-64)), 320 (8 % (C₁₂H₄Cl₄S⁺)), 302 (75 % (C₁₂H₄Cl₄NO₂S⁺-64)), 276 (3 % (C₁₂H₃Cl₃NO₂S⁺-64)), 250 (13 % (C₁₂H₄Cl₂S⁺)), 176 (12 % (C₁₂S⁺))

Fazit

In Dichlormethan wurde die Zielverbindung 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid in >97 % Ausbeute quasi nebenproduktfrei erhalten.

4.1.2.4.b) *Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Triethylphosphit*

Hintergrund

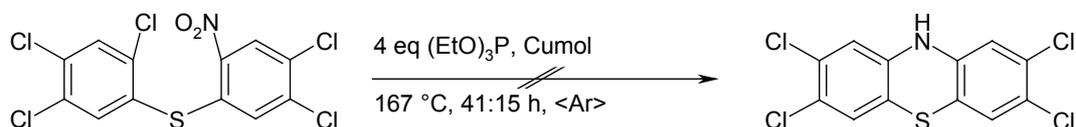
Cadogan hat Anfang der 1970er Jahre zahlreiche Publikationen über die Substituentenverteilungen bei Phenothiazinsynthesen via Diarylsulfide veröffentlicht [179, 182]. Bei den beschriebenen Reaktionen kam es unter bestimmten Bedingungen auch zur Diarylaminbildung zwischen Nitro- und Chlorsubstituent.

Aufreinigung des Cumols:

Durch Ausschütteln des Cumols mit konzentrierter Schwefelsäure wurden organische Verunreinigungen oxidiert. Entstandene Oxidationsprodukte sowie Peroxide wurden bei der Filtration durch Silicagel auf diesem zurückgehalten.

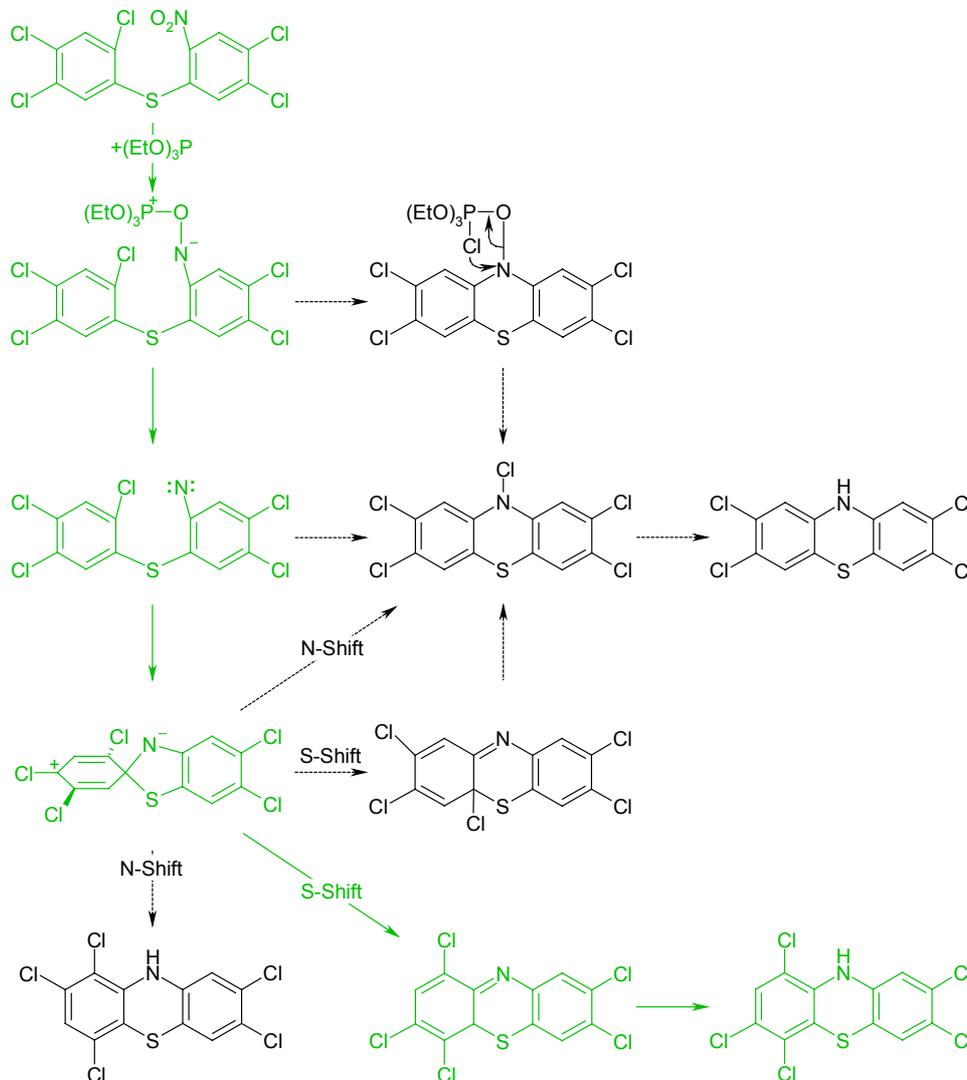
Reaktion

Gleichung 4-9:
Untersuchte Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Triethylphosphit.



Keines der über acht Reaktionsprodukte war die Zielverbindung. Ein Nebenprodukt (ca. 5,8 %) war Pentachlorphenothiazin als Produkt einer Smiles-Umlagerung. Solche Umlagerungen wurden schon bei Phenoxazinsynthesen [183] und Diazaphenothiazinsynthesen [184] beobachtet und danach auch in der Phenothiazinchemie entdeckt und beschrieben [178, 179, 182, 185, 186]. Die Smiles-Umlagerungen traten unter bestimmten Reaktionsbedingungen auf, wie z.B. der Verwendung von Triethylphosphin oder N-substituierten Arylaminen. Bei der Reaktion wird ein Spiro-Intermediat gebildet, das sich über eine 1,2-sigmatrope Umlagerung zu einem hydroaromatischen Intermediat und via Prototropie schließlich zum Phenothiazin umlagert. Theoretisch ist dabei sowohl die

Umlagerung zum Zielprodukt wie auch zum beobachteten Nebenprodukt möglich. So wurden in verschiedenen Publikationen sowohl umgelagerte als auch nicht-umgelagerte Produkte beschrieben [185, 187].



Schema 4-1:

Smiles-Umlagerung bei der Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Triethylphosphit.

Erfolgte Reaktionen in grün. Gestrichelte Pfeile: Theoretisch mögliche, jedoch praktisch nicht stattfindende Reaktionswege (nach [182]).

Bei der vorliegenden Synthese konnte jedoch nur umgelagertes Nebenprodukt identifiziert werden. Die Literatur ist insofern zweideutig, als daß einerseits am Beispiel von Methoxysubstituenten festgestellt wurde, daß, wenn nur eine ortho-Stellung neben $-\text{NO}_2$ blockiert war, eine sigmatrope Umlagerung auf die freie

Position stattfand^[182]. Jedoch ist zu bemerken, daß via Methoxygruppe keine Zyklisierung stattfinden kann. Anders mit einem vicinalen Chlorsubstituenten. Die untersuchte Reaktion hatte den in Schema 4-1 dargestellten Verlauf.

¹H-NMR (Pentachlorphenothiazin in CDCl₃):

$\delta(\text{ppm})=6,28$ (s, 1H, NH), 6,72 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 7,20 (s, 1H)

Ausbeute anhand von Protonenprozent im ¹H-NMR-Spektrum: 5,8 %.

GC/MS (Pentachlorphenothiazin): $t_R=48,24$ min

369 (50 % (C₁₂H₄Cl₅NS⁺)), 334 (28 % (C₁₂H₄Cl₄NS⁺)), 299 (16 % (C₁₂H₄Cl₃NS⁺)), 264 (8 % (C₁₂H₄Cl₂NS⁺)), 228 (5 % (C₁₂H₃CINS⁺))

¹H-NMR (Produkt II in CDCl₃):

$\delta(\text{ppm})=6,90$ (s, 1H, NH), 7,28 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,54 (s, 1H)

Ausbeute anhand von Protonenprozent im ¹H-NMR-Spektrum: 11,8 %.

¹³C-NMR (Produkt II in CDCl₃):

$\delta(\text{ppm})=118,19, 118,58, 122,76, 124,98, 125,08, 125,32, 131,12, 131,96, 132,83, 135,20, 138,25, 141,35$

Fazit

Während der Reaktion kam es zur Smiles-Umlagerung^[188] (Bildung von Pentachlorphenothiazin), überwiegend jedoch wahrscheinlich zur Thermolyse des Thioethers. Siehe dazu auch Kapitel 5.

4.1.3 Untersuchungen an dreistufigen Synthesen

4.1.3.1 *Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension*

siehe Kapitel 4.1.2.4.a)

4.1.3.2 Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin

4.1.3.2.a) Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Zinn(II)chlorid

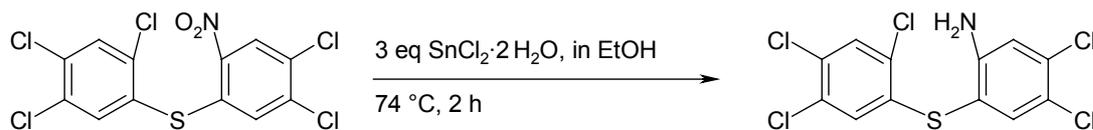
Hintergrund

Die Reduktion von Nitrogruppen zu Aminen mittels Zinn(II)chlorid ist alt, doch aufgrund ihrer Simplizität und Zuverlässigkeit nach wie vor beliebt. Selbst bei modernen Naturstoffsynthesen, z.B. von 8'-Aminochrysin in der AIDS Forschung, findet sie als Methode der Wahl Anwendung [189].

Reaktion

Gleichung 4-10:

Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Zinn(II)chlorid.



Beim Extrahieren des Produktes mittels Essigsäureethylester wurde die wäßrige Phase auf einen basischen pH-Wert eingestellt, um die Protonierung desamins zu verhindern, und somit die Separation beider Phasen zu ermöglichen. Die Filtration über Silicagel diente der Entfernung von Zinnverbindungen aus der Lösung.

Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde reines 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid mit Schmelzpunkt bei 191 °C erhalten.

¹H-NMR (6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid in CDCl₃)

δ(ppm)=4,36 (s, 2H, NH₂), 6,68 (s, 1H, C5'), 6,96 (s, 1H, C2'), 7,48 (s, 1H, C3), 7,53 (s, 1H, C6)

¹³C-NMR (6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid in CDCl₃)

δ(ppm)=111,42 (C1'), 116,83 (C5'), 121,56 (C3'), 127,34 (C-H), 130,04 (C-Cl), 130,36 (C-Cl), 131,01 (C-H), 132,24 (C-Cl), 135,27 (C6), 136,53 (C-Cl), 138,35 (C-H), 148,43 (C6')

(Anm.: Die Zuordnung der nicht benannten Signale ist aufgrund der geringen Verschiebungsdifferenzen mittels Inkrementrechnung nicht eindeutig möglich)

GC/MS (6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid): t_R=44:13 min

371 (57 % (C₁₂H₆Cl₅NS⁺)), 335 (34 % (C₁₂H₆Cl₄NS⁺)), 335 (44 % (C₁₂H₅Cl₄NS⁺)), 301 (60 % (C₁₂H₆Cl₃NS⁺)), 266 (10 % (C₁₂H₆Cl₂NS⁺)), 230 (4 % (C₁₂H₅Cl₁NS⁺)), 192 (17 % (C₁₂H₂NS⁺))

Fazit

Die Reduktion der Nitrogruppe mit Zinn(II)chlorid war erfolgreich, doch war die Gewinnung der Zielverbindung aus dem Rohprodukt aufwendig. Da keine vollständige Umsetzung erfolgte, war die Ausbeute mit 18,1 % gering.

4.1.3.2.b) *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch elementaren Wasserstoff*

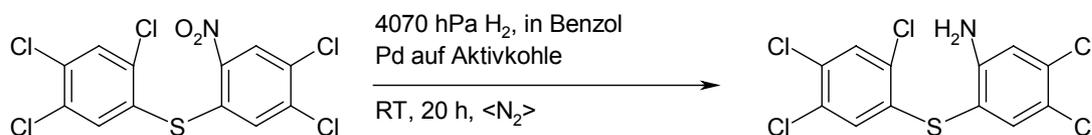
Hintergrund

Nebengruppenmetallkatalysatoren werden primär zur Addition von Wasserstoff an Mehrfachbindungen zwischen Kohlenstoffatomen verwendet, die für konventionellere Reaktionsbedingungen, wie z.B. mittels Metall und Säure *in situ* generierten Wasserstoff, inert sind. Grotta^[190] verwendete für einige seiner Phenothiazinsynthesen einen Adams-Katalysator, den er, unüblicher Weise, schon vor der Reaktion reduzierte. Normalerweise werden diese Platin- oder Palladiumkatalysatoren nicht nur als Oxide aufbewahrt, sondern auch eingesetzt und erst im Reaktionsgefäß durch Wasserstoff zum aktiven Katalysator reduziert. Dadurch wiesen sie für damalige Verhältnisse eine weit größere Oberfläche und bessere Verteilung auf.

Reaktion

Gleichung 4-11:

Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch elementaren Wasserstoff.



Zur Optimierung von Oberfläche und Verteilung wurde ein neuzeitlicher Trägerkatalysator verwendet ^[191], auf dem ein Schwarzkatalysator niedergeschlagen worden war. Die säulenchromatographische Aufreinigung erbrachte das reine Zielprodukt.

(Identifizierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid: Siehe Kapitel 4.1.3.2.a.)

Fazit

Aufgrund des großen Anwendungsbereiches von Palladiumkatalysatoren auch bei schwergängigeren Reduktionsreaktionen war eine höhere Ausbeute erwartet worden. Die niedrige Ausbeute von 11,5 % liegt neben unvollständiger Umsetzung auch in Nebenreaktionen wie möglicherweise der Hydrierung des Thioethers begründet.

4.1.3.2.c) *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch in situ generierten Wasserstoff*

(Vgl. Kapitel 4.3.2)

Hintergrund

Die Reduktion von Nitroverbindungen mit unedlen Metallen in saurem Medium ist bekanntes Lehrbuchwissen ^[180]. Die Reduktion mit Eisen und Salzsäure wurde bereits vor 150 Jahren erfolgreich von Béchamp ^[192, 193] durchgeführt und entwickelte sich in der chemischen Industrie zu einer technisch und historisch bedeutsamen Reaktion: Sie ist leicht durchführbar mit billigem Metall, geringem

Säureverbrauch und anschließender Verwendung des Eisenoxids als Farbpigment.

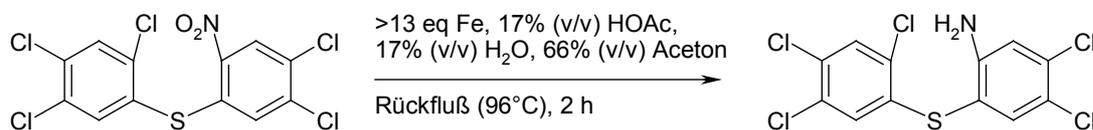
Aktivierung des Eisens:

Die *in situ* Herstellung von Wasserstoff basiert auf der Reaktion von Metall mit Säure. Bei Vorhandensein von Metalloxidschichten reagieren diese zuerst. Somit sind oxidfreie Metalloberflächen die Voraussetzung für eine sofortige und effiziente Wasserstoffherstellung.

Reaktion:

Gleichung 4-12:

Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch *in situ* generierten Wasserstoff.



Die Filtration über Celite diente der Entfernung von Eisenbestandteilen aus dem Produktgemisch. Bei der Aufreinigung des Produktes stellte sich simple Trennung nach Löslichkeiten als überlegen gegenüber säulenchromatographischer Aufreinigung heraus. Der zeitliche und technische Aufwand war geringer bei niedrigeren Ausbeuteverlusten.

(Identifizierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid: Siehe Kapitel 4.1.3.2.a.)

Fazit

Die Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zu 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid mittels Eisen und Essigsäure stellt den einfachsten, preiswertesten und produktivsten Syntheseweg unter den drei beschrittenen dar. Das Produkt wird nach einfachster Aufarbeitung in höchster Reinheit und guter Ausbeute (86,0 %) erhalten.

4.1.3.3 Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin

4.1.3.3.a) Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermische Elimination von Chlorwasserstoff

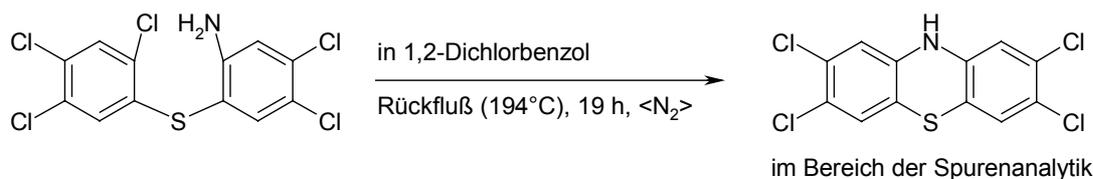
Hintergrund

Als einfachste und direkteste Reaktion, die den Ringschluß bewirken sollte, galt das Erhitzen von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid in einem hochsiedenden Lösungsmittel [194]. Die Basis für diese Reaktion war das Prinzip von Le Chatelier: Unter der Voraussetzung, daß die Reaktion unter thermodynamischer Kontrolle verläuft, würde entstehender Chlorwasserstoff unter diesen thermischen Bedingungen sofort ausgasen und aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden. Fände die Reaktion auch nur in geringem Maße statt, so verschöbe sie sich zu den Produkten hin.

Reaktion

Gleichung 4-13:

Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermische Elimination von Chlorwasserstoff.



Durch hohe Verdünnung sollte einer eventuellen Polymerisation vorgebeugt werden. Eine Beobachtung des Reaktionsverlaufs mit DC war aufgrund des hochsiedenden, UV-aktiven Lösungsmittels unpraktikabel. Die ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung des Rohproduktes ergab reinstes Ausgangsmaterial. Per GC/MS konnte das Zielprodukt nur im Spurenbereich nachgewiesen werden.

GC/MS (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin): $t_R=49:29$ min

335 (83 % ($C_{12}H_5Cl_4NS^+$)), 300 (52 % ($C_{12}H_5Cl_3NS^+$)), 264 (16 % ($C_{12}H_4Cl_2NS^+$)), 230 (16 % ($C_{12}H_5ClNS^+$))

Fazit

Thermische Energie reicht zur Elimination von Chlorwasserstoff aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid nur im Spurenbereich aus und stellt somit keinen synthetisch verwertbaren Zugang zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin dar.

4.1.3.3.b) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermochemische Elimination von Chlorwasserstoff*

Hintergrund

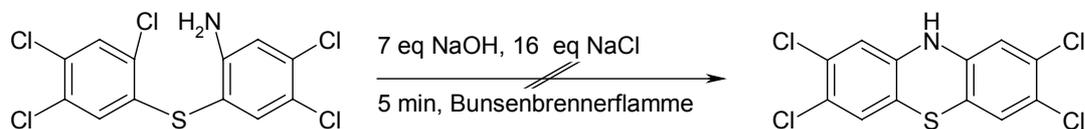
Die Idee des vorigen Versuches wurde weiterverfolgt, indem neben thermischer auch chemische Einflußnahme erfolgen sollte [195].

Hintergrund der Zugabe von Kochsalz zur Schmelze war das Raoult'sche Gesetz: Das chemische Potential des Lösungsmittels (hier: Natriumhydroxid, Smp 323 °C) wird in Gegenwart einer gelösten Substanz (Kochsalz) erniedrigt, was in einer Reduktion des Schmelzpunktes resultiert.

Reaktion

Gleichung 4-14:

Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermochemische Elimination von Chlorwasserstoff.



Unter der Hitzeeinwirkung des Bunsenbrenners entstand starke Rauchentwicklung. Ein Schmelzen der Substanzen war nicht erkennbar, die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Extraktionsproduktes zeigte keine UV-aktiven Substanzen.

Fazit

6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid war nicht thermostabil genug, um unter den angewandten Bedingungen reagieren zu können. Die Arylringe wurden thermolysiert. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Eliminierung von HCl unter Arinbildung sowie Folgereaktionen.

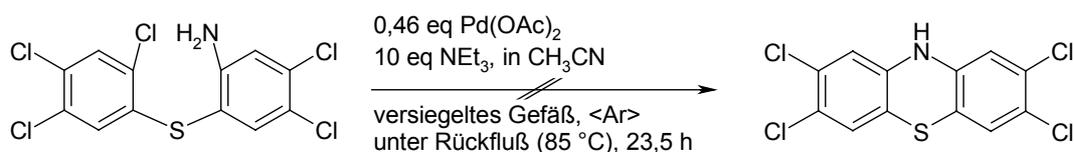
4.1.3.3.c) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Heck-Reaktion*

Hintergrund

Die erfolgreichsten C-N-Bindungsbildungen in der organisch-chemischen Synthese erfolgen mittels Palladium- oder Nickelkatalysatoren [196]. Organopalladium-katalysierte Kupplungsreaktionen sind, dank Richard F. Heck, in der synthetischen organischen Chemie bekannt und geschätzt. Sie erlauben klassischerweise unter der Beibehaltung der Doppelbindungen die sehr schonende Kupplung von Alken und Halogenaryl [197, 198] oder -alkenyl [199-201]. Die Reaktion ist jedoch nicht auf diese Verbindungsklassen beschränkt, sondern wird auch für einfache Alkene, arylsubstituierte Alkene sowie elektrophile Alkene wie z.B. N-Vinylamide angewandt [202-204]. Mit stetem Fortschritt ermöglichen Palladium-Katalysatoren in der synthetischen organischen Chemie immer neue Zugänge zu C-N-Bindungen [205, 206]. Als Modell für die vorliegende Reaktion dienten etablierte Reaktionsbedingungen [207-209]. Allerdings wurde in der Literatur überwiegend die gute Abgangsgruppe Brom und nicht Chlorsubstituenten beschrieben.

Reaktion

Gleichung 4-15:
Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Heck-Reaktion.



Da Acetonitril Palladium und seine Salze löst, mußte es evaporiert werden, bevor das Reaktionsgemisch mit Essigsäureethylester extrahiert werden konnte. Die folgende Filtration über Celite entfernte Palladium vollständig. Ein DC des Edukts und Endmaterials zeigte keine Veränderung. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte ausschließlich Ausgangsmaterial.

Fazit

Da nach fast einem Tag Reaktionsdauer per NMR-Spektroskopie keine Zielverbindung detektierbar war, ist davon auszugehen, daß das vorliegende System zu deaktiviert für die zur quantitativen Heck-Reaktion notwendigen Bildung eines Organopalladium-Intermediates ist.

4.1.3.3.d) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Iod*

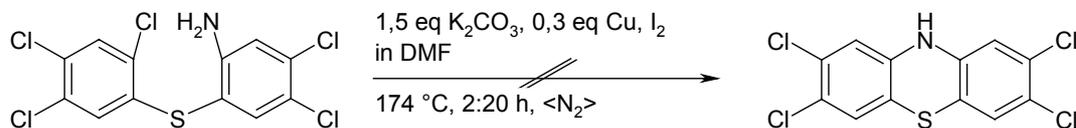
Die Ullmann-Reaktion dient klassischerweise auch der Kupplung von Arylhaliden mit Arylaminen [210-214]. Weitere Anwendungen an Heteroatomen stellen Synthesen von Diarylethern aus Phenolen und Arylhaliden [215, 216], sowie Synthesen von Triarylaminen durch die Kupplung von Diarylaminen mit Arylhaliden [217, 218] dar. Darüber hinaus wird die Ullmann-Kupplung zur Dimerisierung zweier Arylhalogenide [219-222] sowie zur Bildung unsymmetrischer Biaryle [223, 224] eingesetzt. Selbst die Synthese konjugierter Diene ist mit dieser Reaktion möglich [225]. Die Ullmann-Kupplung mit ihrem historischem Hintergrund findet auch in moderner Naturstoffsynthese antibiotischer Glucopeptide Anwendung [226].

Die Reaktionsbedingungen wurden in Anlehnung an Grottas Anwendung der Ullmann-Kupplung bei der Phenothiazinsynthese [190] gewählt.

Reaktion

Gleichung 4-16:

Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Iod.



Es entstanden zwei nicht weiter identifizierte Hauptprodukte, die laut DC beide polarer als die Ausgangsverbindung waren:

1H -NMR (Produkt I in $CDCl_3$)

δ (ppm)=6,07 (s, 2H), 7,07 (s, 2H), 7,61 (s, 1H), 7,86 (s, 1H)

1H -NMR (Produkt II in $CDCl_3$)

δ (ppm)=2,29 (s, 3H), 5,03 (s, 1H), 7,00 (s, 2H)

Fazit

Unter den gewählten Bedingungen zur Ullmann-Kupplung fand zwar eine Umsetzung des Edukts statt, doch wurde die Zielverbindung nicht gebildet.

4.1.3.3.e) *Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid*

(Vgl. Kapitel 4.2 und 4.3.3)

Hintergrund

In der Phenothiazinliteratur sind viele Variationen der Ullmann-Kupplung zu finden. Saggiomo [177] setzte zum Beispiel zum Ringschluß von 2'-Bromphenyl-3-amino-4-pyridylsulfid zu 2-Azaphenothiazin Kupfer(I)iodid und Soda ohne Lösungsmittel ein; so auch Michels bei der Synthese von 2,8-Dinitrophenothiazin [227]. Sugahara kuppelte nach Ullmann mit Kupfer(I)iodid in DMF [228]. Dahingegen verwendete Saggiomo zur Synthese von 8-Chlor-2-azaphenothiazin aus 3-Amino-2'-brom-4'-chlorphenyl-4-pyridylsulfid Kupfer und Pottasche in DMF.

Nodiff ^[178] verwendete ebenfalls nur Kupfer, wohingegen Craig ^[229] sowie Lin ^[230] beides, Kupfer und Kupfer(I)iodid, zur Synthese von Phenothiazinen aus substituierten Diphenylsulfiden verwendeten. Craig führte so einen Ringschluß zwischen Brom und Amin mit Ausbeuten von 65 % durch; Lin zyklisierte ein Methylamin mit Chlor und erreichte 38-96 % Ausbeute, abhängig von den weiteren Substituenten. Vorliegende Reaktionsbedingungen wurden in Anlehnung an Craig und Lin entwickelt.

Herstellung frischen Kupfers:

Seiner Stellung als Halbedelmetall in der elektrochemischen Spannungsreihe entsprechend wird Kupfer aus seinen Salzlösungen durch unedlere Metalle abgeschieden. Das so entstandene sog. Zementkupfer (Ullmann-Bronze) ist, da es Spuren von Cu_2O_2 enthält, katalytisch besonders wirksam. Es ist strukturell instabil und wurde daher vor jeder Reaktion frisch hergestellt.

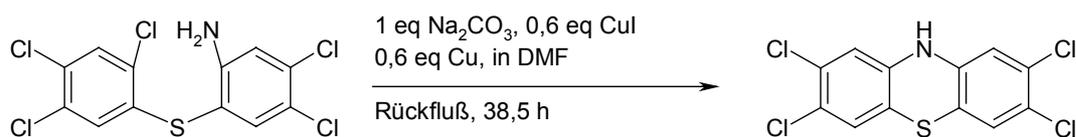
Aufreinigung des Kupfer(I)iodids:

Das in Wasser schwerlösliche Kupfer(I)iodid wurde in einem extrem polaren Lösungsmittel (Kaliumiodid in Wasser) in Lösung gebracht und anschließend durch Verdünnung mit demineralisiertem Wasser wieder ausgefällt. Da die katalytische Aktivität des Kupfer(I)iodids abhängig von der Reinheit seiner Oberflächen ist, und diese unter Schutzatmosphäre unverändert bleiben, mußte es nicht stets frisch hergestellt werden.

Reaktion

Gleichung 4-17:

Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid.



Die Untersuchung des Rohproduktes zeigte kleine Mengen Zielproduktes in einer komplexen Produktgemisch-Matrix. Die Schwierigkeit bei dieser Reaktion

war somit die geringe Ausbeute an 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Rohprodukt und die daraus resultierende aufwendige Separation aus Nebenprodukten.

2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin hatte in allen untersuchten Eluentmischungen einen Retentionsfaktor, der identisch mit dem eines Nebenproduktes war, so daß weder eine konventionelle säulenchromatographische Trennung noch eine präparative Dünnschichtchromatographie (Dickschichtchromatographie) zu einer vollständigen Aufreinigung führten. Das aufgereinigte Rohprodukt war ein hellgrau-violetter Feststoff. Mittels $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Protonenrelationen (Flächenanteil der Produktsignale an den Gesamtsignalen) wurde eine Ausbeute von 3,5 % berechnet.

$^1\text{H-NMR}$ (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in CDCl_3)

$\delta(\text{ppm})=5,83$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9)

GC/MS (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin): $t_{\text{R}}=49:34$ min

335 (73 % ($\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_4\text{NS}^+$)), 300 (62 % ($\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_3\text{NS}^+$)), 264 (11 % ($\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NS}^+$)), 230 (9 % ($\text{C}_{12}\text{H}_5\text{ClNS}^+$)), 194 (4 % ($\text{C}_{12}\text{H}_4\text{NS}^+$)), 168 (12 % ($[\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_4\text{NS}]^{2+}$)), 132 (14 % ($\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NS}^{2+}$)).

Fazit

Die erstmalige Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin war erfolgreich, auch wenn das Zielprodukt (noch) nicht aufgereinigt werden konnte. Nur unter speziellen Bedingungen einer bestimmten Ullmann-Kupplungsreaktion konnte der zentrale Heterozyklus in synthetisch verwertbarem Anteil geschlossen werden. Dies sowie die extrem niedrige Ausbeute von 3,5 % (berechnet aus teilaufgereinigtem Rohprodukt) sind Anzeichen für eine starke Deaktivierung der Ringsysteme durch ihre Chlorsubstituenten sowie für die unter diesem Umständen unvorteilhafte Kupplung über einen Chlorsubstituenten.

4.1.4 Untersuchungen an vierstufigen Synthesen

Die geringe Reaktionswilligkeit des Diarylsulfids im letzten Syntheseschritt der dreistufigen Synthese war Anlaß zu Aktivierungsversuchen des Diarylsulfids, um mit einem zusätzlichen Reaktionsschritt einen ökonomischeren Zugang zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin zu finden.

4.1.4.1 *Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol durch basische Suspension*

Siehe Kapitel 4.1.2.4.a).

4.1.4.2 *Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid zum Amin*

Siehe Kapitel 4.1.3.2.c).

4.1.4.3 *Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung*

4.1.4.3.a) *Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ameisensäure*

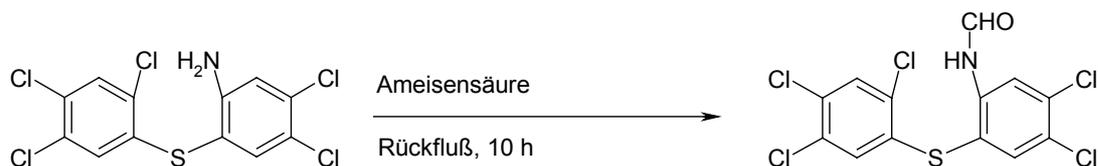
Hintergrund

Die Methode der Formylierung des Diarylamins vor dem Ringschluß zum Phenothiazin wurde mitunter bei konventionellen Phenothiazinsynthesen als Aktivierungsschritt eingefügt, wenn die Ullmann-Kondensation der Diarylsulfide Schwierigkeiten bereitete [231]. Dieser Syntheseweg war jedoch auch nicht immer erfolgreich [231]. Die Ausbeuten bei der Formylierung verschiedener Aminodiarylsulfide variiert stark (2,5 % [182], 18 % [190], 60-72 % [178]) und erwies sich als besonders abhängig von Substituenten und Abgangsgruppen.

Reaktion

Gleichung 4-18:

Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ameisensäure.



Das hier erhaltene Rohprodukt war von guter Reinheit und wurde in einer Ausbeute von 94,1 % gewonnen. Im gleichen Schritt konnte, wenn auch nur mittels GC/MS im Spurenbereich, 2,3,7,8-Tetrachlor-N-formylphenothiazin detektiert werden.

¹H-NMR (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=6,68$ (s, 1H, C3), $7,52$ (s, 1H, C6), $7,67$ (s, 1H, C2'), $8,08$ (s, 1H, NH), $8,42$ (s, 1H, C5'), $8,82$ (s, 1H, CHO)

¹³C-NMR (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=116,78$, $122,92$ (C-H), $125,13$, $128,13$ (C-H), $128,50$, $130,48$, $131,12$ (C-H), $132,53$, $133,92$, $136,70$, $137,48$ (C-H), $138,43$, $158,76$ (CHO)

(Anm.: Die Zuordnung der nicht benannten Signale ist aufgrund der geringen Verschiebungsdifferenzen mittels Inkrementrechnung nicht eindeutig möglich)

GC/MS (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamidodiphenylsulfid): $t_R=47:17$

399 (16 % (C₁₃H₆Cl₅NOS⁺)), 335 (62 % (C₁₂H₅Cl₄NS⁺)), 300 (10 % (C₁₂H₅Cl₃NS⁺)), 265 (6 % (C₁₂H₅Cl₂NS⁺)), 230 (3 % (C₁₂H₅ClNS⁺)), 188 (100 % (C₇H₄Cl₂NO⁺))

GC/MS (2,3,7,8-Tetrachlor-N-formylphenothiazin): $t_R=46:24$

363 (45 % (C₁₃H₅Cl₄NOS⁺)), 334 (66 % (C₁₂H₄Cl₄NS⁺)), 299 (10 % ((C₁₂H₄Cl₃NS⁺)), 264 (26 % (C₁₂H₄Cl₂NS⁺))

Fazit

Die Formylierung des Diarylsulfids zu 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid war erfolgreich, einfach und verlief fast quantitativ (94,1 %). Im Spurenbereich kam es zur Bildung von 2,3,7,8-Tetrachlor-N-formylphenothiazin.

4.1.4.3.b) *Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung*

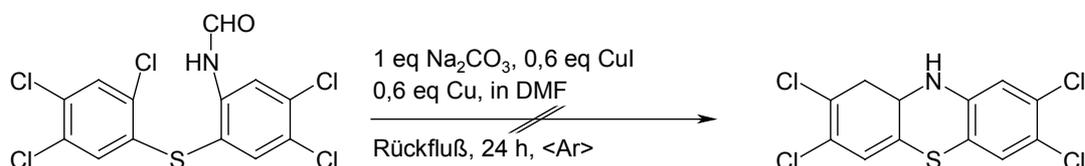
Hintergrund

In der Literatur waren ausschließlich Zyklisierungen von 2-Formamido-2'-bromdiphenylsulfiden beschrieben [178, 182, 190]. Veröffentlichungen dieser Reaktionen konnten für die ungünstigere Abgangsgruppe der Chlorsubstituenten nicht gefunden werden.

Reaktion

Gleichung 4-19:

Untersuchte Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung.



Bei dieser Reaktion wurde ein Produkt gebildet, dessen Identität ungeklärt blieb. Es war in der Literatur vom Auftreten einer Smiles-Umlagerung unter ähnlichen Reaktionsbedingungen berichtet worden [178], doch konnte hier weder Zielprodukt noch das Smiles-Umlagerungsprodukt gefunden werden. Ein Verbleiben der guten Abgangsgruppe Formyl am Molekül kann ausgeschlossen werden, da in diesem ppm-Bereich kein Signal mehr auftrat. Jedoch war auch kein NH-Signal zu detektieren. Das Rohprodukt hatte eine mittels ¹H-NMR-Spektrum geschätzte Reinheit von 80 %.

¹H-NMR (Produkt in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=6,07$ (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 7,02 (s, 2H), 8,03 (s, 2H)

Fazit

Zur Reaktion wurden zwar die Bedingungen der in Kapitel 4.1.3.3.e) erfolgreichen Ullmann-Kupplung verwendet, doch kam es hier nicht zur Bildung des Zielproduktes.

4.1.4.4 Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid und anschließende Zyklisierung durch Ullmann-Kupplung

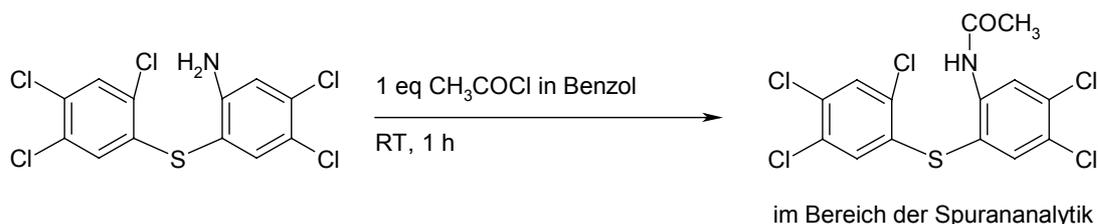
4.1.4.4.a) Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Acetylchlorid

Hintergrund

Verschiedentlich wurden Amine acetyliert, um eine der Formylierung analoge Aktivierung für den folgenden Ringschluß zu erreichen [178, 232].

Reaktion**Gleichung 4-20:**

Untersuchte Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Acetylchlorid.



Der Versuch zur Acetylierung des Stickstoffs war hier nicht erfolgreich. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten ein intaktes Amin, und ein zusätzliches Ein-Protonen-Signal im aromatischen Bereich, dem nicht weiter nachgegangen wurde. N-Acetyl-6'-amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid konnte nur im Spurenbereich mittels GC/MS detektiert werden.

¹H-NMR (Produkt in CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})=4,35$ (s, 2H, NH₂), 6,68 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,52 (s, 1H)

GC/MS (N-Acetyl-6'-amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid): $t_R=46:10$

413 (29 % (C₁₄H₈Cl₅NOS⁺)), 371 (28 % (C₁₂H₅Cl₅NS⁺)), 335 (29 % (C₁₂H₅Cl₄NS⁺)), 300 (18 % (C₁₂H₅Cl₃NS⁺)), 265 (8 % (C₁₂H₅Cl₂NS⁺)), 230 (4 % (C₁₂H₅ClNS⁺)), 202 (100 % (C₈H₆Cl₂NO⁺))

Fazit

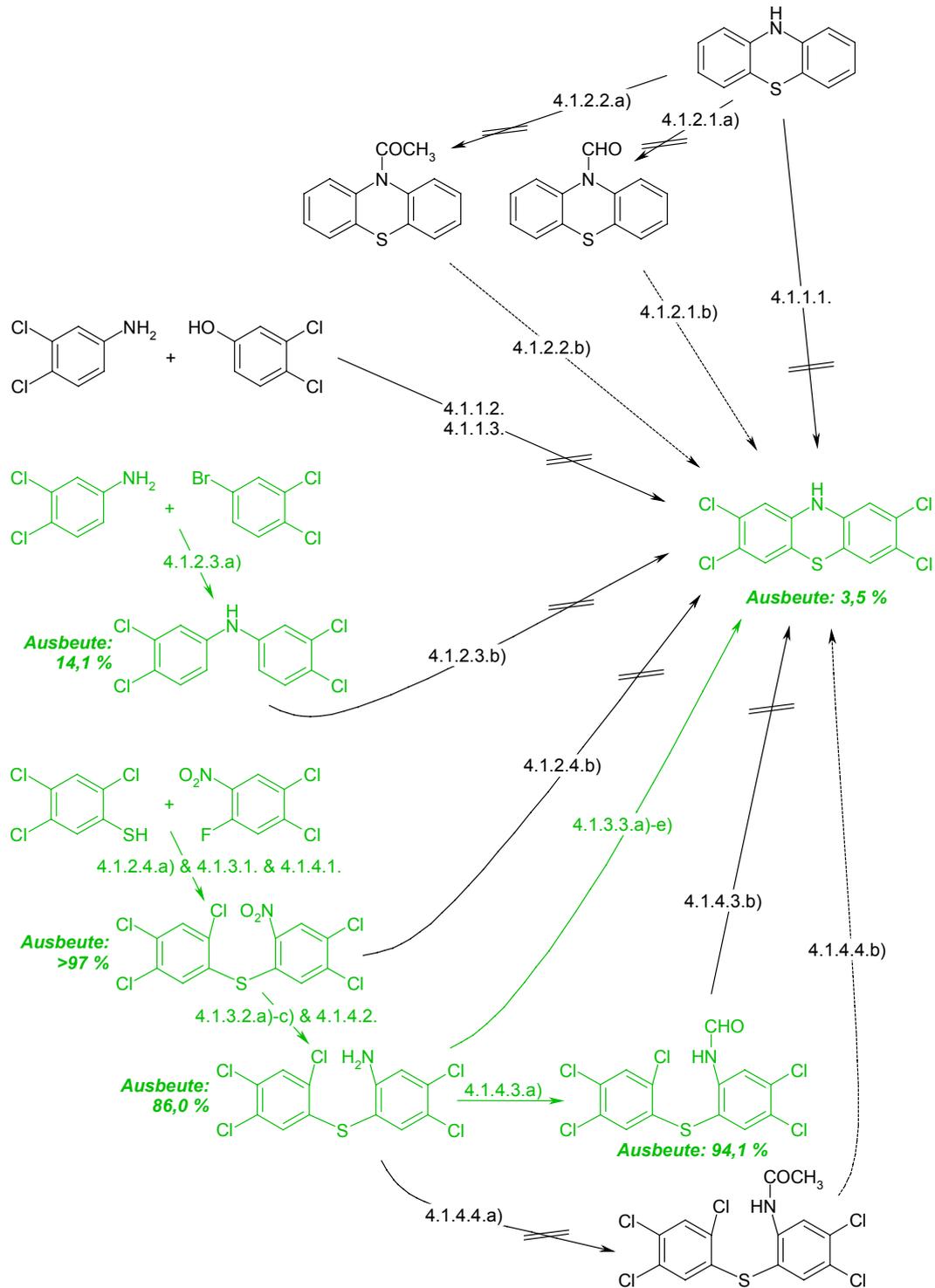
Die Reaktion war nicht erfolgreich; zwar wurden Hinweise auf ein acetyliertes Produkt im Spurenbereich des GC/MS gefunden, dies ist jedoch praktisch nicht geeignet.

4.1.4.4.b) *Zyklisierung von 6'-Acetamido-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid*

Die Reaktion wurde nicht durchgeführt, da das Edukt nicht hergestellt werden können (aus 4.1.4.4.a)).

4.1.5 Zusammenfassung der Syntheseversuche

Zur erstmaligen Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurden verschiedene ein- bis vierstufige Synthesestrategien entwickelt und untersucht. Die einzelnen zugehörigen Reaktionsschritte wurden mit unterschiedlichen Bedingungen der historischen, klassischen, sowie modernen Synthesechemie verfolgt. Aus der Vielzahl der Konstellationen gab es zwei erfolgreiche Reaktionswege: Reaktion 4.1.3.3.a) und Reaktion 4.1.3.3.e). Bei ersterer konnte das Zielprodukt allerdings nur mittels GC/MS und nur im Spurenbereich nachgewiesen werden. Reaktion 4.1.3.3.e) stellte sich als einzige präparativ erfolgreiche heraus: Eine Ullmann-Kupplung mit Katalysatoren höchsten Reinheitsgrades. Das Zielprodukt konnte in dem letzten Schritt dieser dreistufigen Synthese jedoch nur in einer Ausbeute von maximal 3,5 % gewonnen und nicht sauber aufgereinigt werden.



Schema 4-2:

Untersuchte Strategien zur erstmaligen Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin, Experimentalansätze.

Erfolgreiche Wege in grün. Nicht gelungene Reaktionen mit Doppelbalken am Reaktionspfeil. Nicht durchgeführte Reaktionen mit gestrichelten Reaktionspfeilen. (Die Zahlenangaben sind Kapitelnummern der Synthesversuche).

4.2 SYNTHESE – KINETIKSTUDIEN ZUR BILDUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN

(Vgl. Kapitel 4.1.3.3.e) und 4.3.3)

4.2.1 Variation der Katalysatorenzugabe zur Ullmann-Kupplung

Die Beobachtung des Verlaufs der Zielverbindung im Rohprodukt diente zur Studie des Einflusses verschiedener Bedingungen der Katalysatorenzugabe auf die Reaktion, um die Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin zu optimieren.

Nicht nur Lösungsmittelleffekte, sondern auch Effekte der Rohproduktmatrix haben Auswirkung auf die Verschiebung einzelner Protonensignale in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Daher sind die NH-Signale im Rohprodukt, verglichen mit der Reinsubstanz, zu tiefem Feld verschoben ($^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm})_{\text{NH}}=5,92-5,98$).

4.2.1.1 Einmalige Zugabe der Katalysatoren

Bei der Untersuchung der Zusammensetzung des Rohproduktes nach einmaliger Zugabe von Katalysatoren (siehe Abbildung 4-1) war wenig Variation über den gegebenen Zeitraum hinweg zu erkennen. Es stellte sich jedoch ein sinkendes Verhältnis von Zielverbindung zu Nebenprodukten heraus.

Im Hinblick auf die Versuche mit mehrfacher Katalysatorenzugabe diente diese Versuchsreihe als Nullkontrolle, da auch hier das Reaktionsgefäß täglich geöffnet und die Reaktion durch Probennahme gestört wurde.

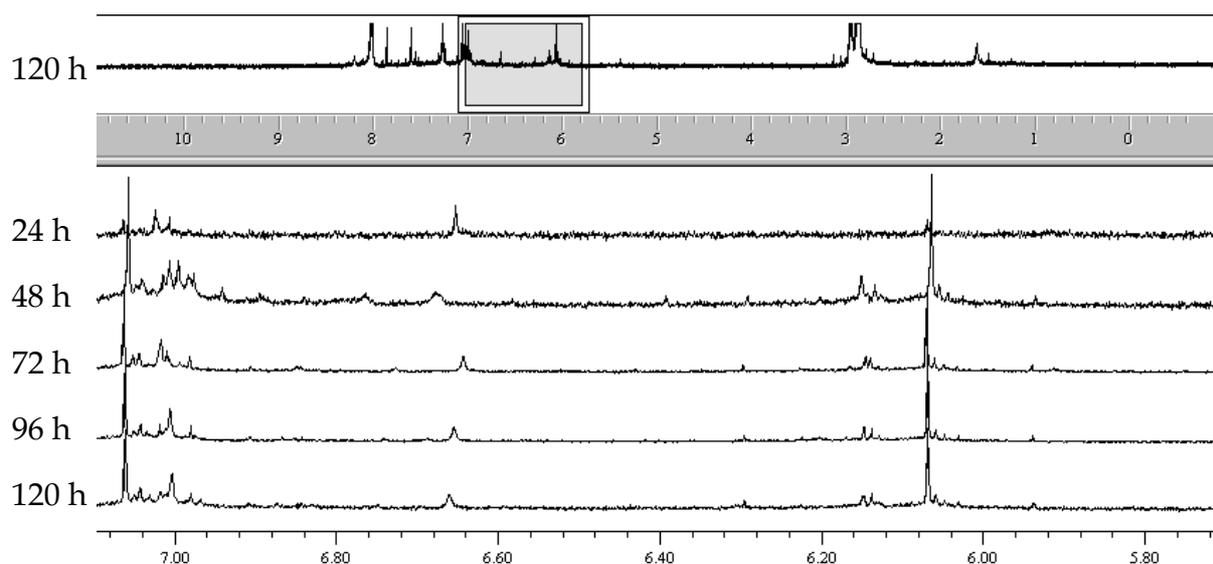


Abbildung 4-1:

Einmalige Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung zu Reaktionsbeginn, Zeitverlauf 24-120 h.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Rohproduktes der Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid (gemessen in CDCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ppm})_{2,3,7,8\text{-TCPT}}=5,92\text{-}5,98$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9). Ausschnitt der Spektren im relevanten Bereich zur visuellen Separation von anderen Komponenten im Rohprodukt.

4.2.1.2 *Sukzessive Zugabe der Katalysatoren an jedem zweiten Tag.*

Aus dem zeitlichen Verlauf der Rohproduktkomposition nach zweitäglicher Katalysatorenzugabe (siehe Abbildung 4-2) ist ersichtlich, daß der relative Gehalt an Zielverbindung bei 72 h, also nach der zweiten Zugabe von Katalysatoren (48 h), vergleichsweise stark abgenommen hat. Ein ungeklärter Zusammenhang liegt nahe.

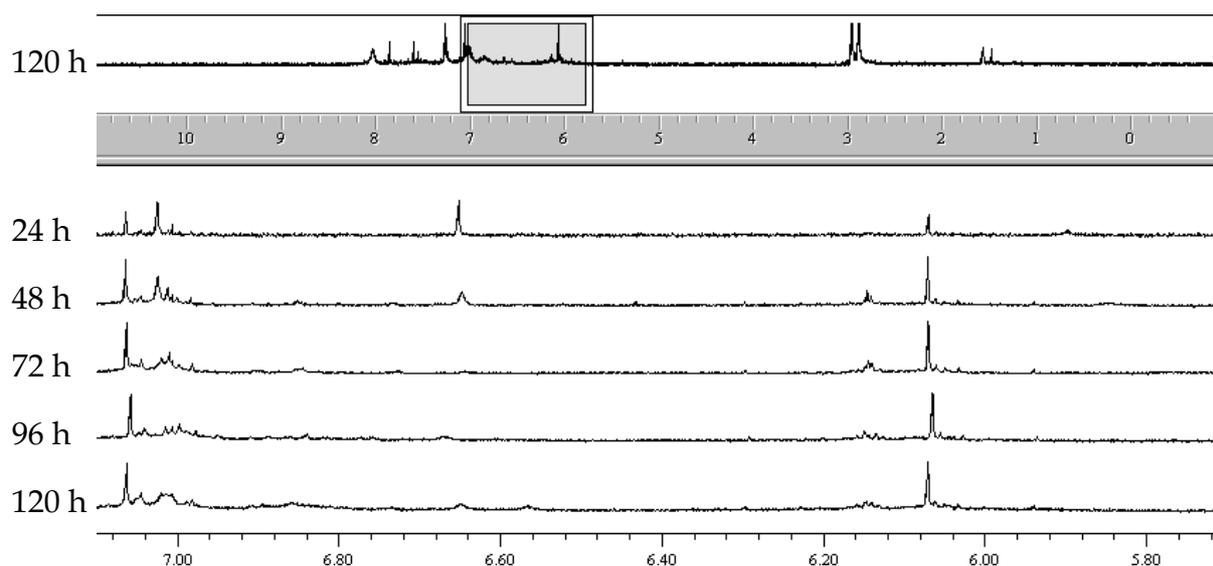


Abbildung 4-2:

Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung in Zwei-Tages Intervallen, Zeitverlauf 24-120 h.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Rohproduktes der Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid (gemessen in CDCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ppm})_{2,3,7,8\text{-TCPT}} = 5,92\text{-}5,98$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9).
Ausschnitt der Spektren im relevanten Bereich zur visuellen Separation von anderen Komponenten im Rohprodukt.

4.2.1.3 Tägliche Zugabe der Katalysatoren

Der im vorigen Abschnitt postulierte Zusammenhang zwischen Abnahme des Zielproduktes und Katalysatorenzugabe wird durch die bei täglicher Katalysatorenzugabe gefundenen Ergebnisse bestätigt. Schon nach der zweiten Zugabe, also nach 48 h, waren keine Signale der Zielverbindung mehr zu erkennen (siehe Abbildung 4-3).

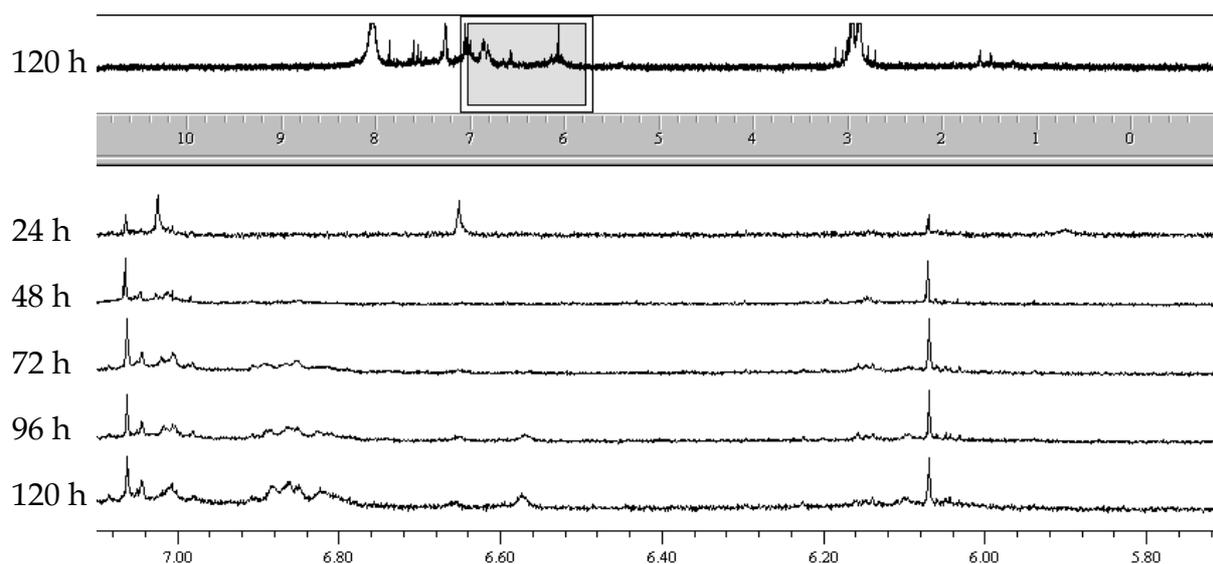


Abbildung 4-3:

Tägliche Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung, Zeitverlauf 24-120 h.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Rohproduktes der Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid (gemessen in CDCl_3).

$^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm})_{2,3,7,8\text{-TCPT}} = 5,92\text{-}5,98$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9).

Ausschnitt der Spektren im relevanten Bereich zur visuellen Separation von anderen Komponenten im Rohprodukt.

Fazit

Die Ergebnisse vorheriger Versuche* zeigten, daß die Zugabe beider Katalysatoren, des Kupfers und des Kupfer(I)iodids, Voraussetzung zur gewünschten Reaktion waren. Die hier gesammelten Erkenntnisse lassen darauf schließen, daß jedoch nur die einmalige Zugabe der Katalysatoren für die Reaktion vorteilhafte Bedingungen schaffte.

Des weiteren war ein sinkender relativer Anteil an Zielprodukt mit der Zeit erkennbar. Eine Semi-Quantifizierung wurde versucht, indem das Verhältnis der Zielverbindung zu einem einzelnen, aufgrund seiner Konstanz ausgewählten Hauptnebenprodukt ($^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm})=6,07$) bestimmt wurde. Der relative Anteil an Zielprodukt fällt bei allen drei Reaktionsbedingungen gleichsam mit der Zeit ab (Abbildung 4-4). Bei der Gewichtung der erhaltenen Aussage ist jedoch zu beachten,

* Siehe Kapitel 4.1.3.3.d) und e)

daß die drei Verläufe ausschließlich qualitativ und nicht quantitativ miteinander verglichen werden können, da sich bei den jeweiligen Reaktion durch die verschiedenen Reaktionsverhältnisse auch unterschiedliche Nebenproduktmatrixen bildeten.

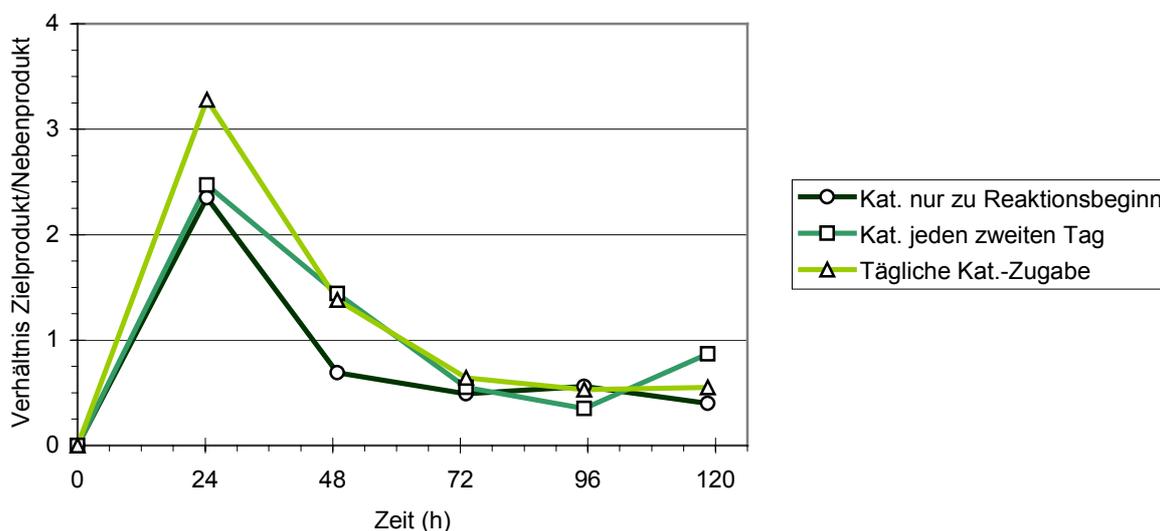


Abbildung 4-4:

Relativer Gehalt von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Rohprodukt unter Variation der Katalysatorenzugabe.

Zeitlicher Verlauf relativ zu einem ausgewählten Nebenprodukt ($^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm})=6,07$), semi-quantitativ mittels $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$ bestimmt. Ein Vergleich der Kurven untereinander ist nur qualitativ aussagekräftig

4.2.2 Zeitlicher Verlauf der Ullmann-Kupplung unter optimierten Reaktionsbedingungen

Auf den Erkenntnissen der Studien zu Variationen der Katalysatorenzugabe basierend wurde eine semi-quantitative Untersuchung des Zielproduktgehaltes unter optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt: Erstens wurden nur zu Beginn der Reaktion Katalysatoren zugegeben; zweitens wurde die frühe Reaktionsphase (erster Tag) untersucht, da sich in Vorversuchen (siehe Abbildung 4-4) ein kontinuierlich sinkender, relativer Produktanteil nach dem ersten Tag ergeben hatte. Aus den $^1\text{H-NMR-Spektren}$ der Rohprodukte ist eine klare Abnahme des Ausgangsmaterials, einhergehend mit einer Zunahme der Zielverbindung zu erkennen (Abbildungen 4-5 und 4-6).

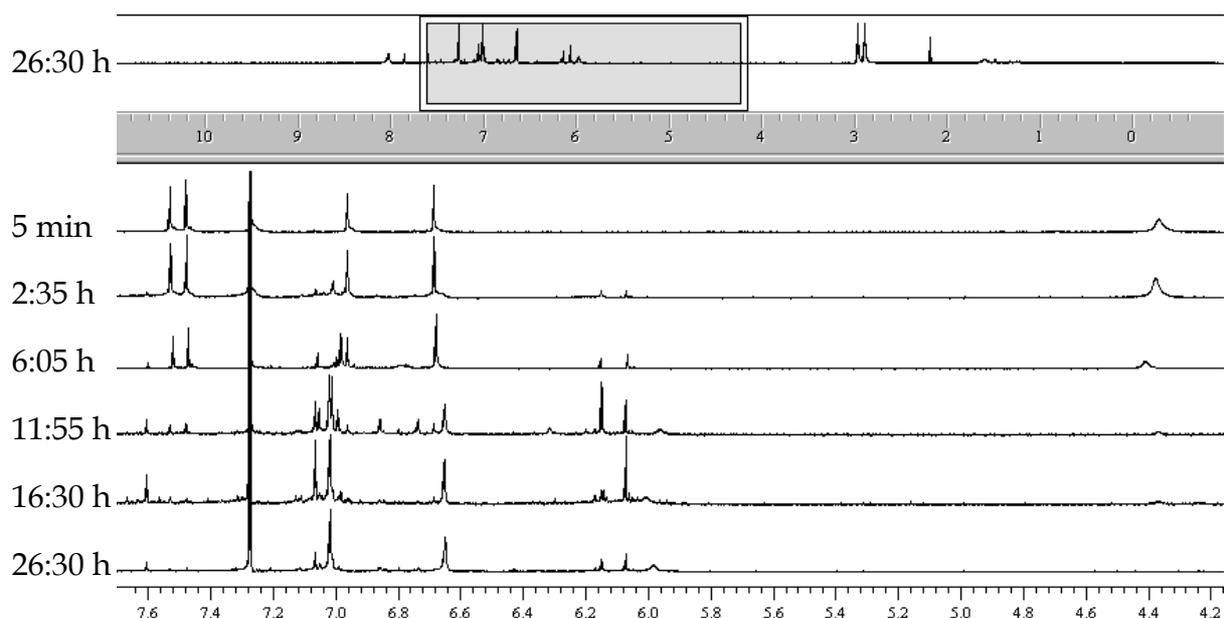


Abbildung 4-5:

Einmalige Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung zu Reaktionsbeginn, Zeitverlauf 0:05-26:30 h.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Rohproduktes der Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid (gemessen in CDCl_3).

$^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ppm})_{2,3,7,8\text{-TCPT}}=5,92\text{-}5,98$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9).

$^1\text{H-NMR}$ $\delta(\text{ppm})_{\text{Edukt}}=4,36$ (s, 2H, NH_2), 6,68 (s, 1H, C'_5), 6,96 (s, 1H, C'_2), 7,48 (s, 1H, C_3), 7,53 (s, 1H, C_6). Ausschnitt der Spektren im relevanten Bereich zur visuellen Separation von anderen Komponenten im Rohprodukt.

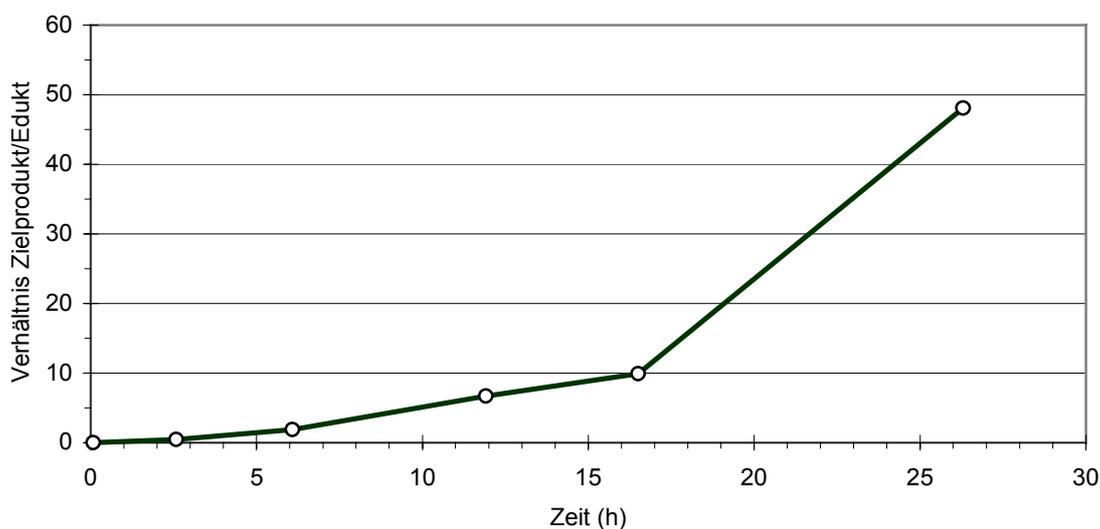


Abbildung 4-6:

Zeitlicher Verlauf des Verhältnisses von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin zum Edukt nach einmaliger Katalysatoren-Zugabe zu Reaktionsbeginn, bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

Durch Vergleich des Verhältnisses von Edukt und Produkt (Abbildung 4-5) ist eine semi-quantitative Abschätzung der Reaktionsverhältnisse möglich (Abbildung 4-6).

Fazit

Die Zielverbindung 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin bildet sich mit einem Maximum bei etwa 24 h und wird danach unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen wieder abgebaut.

4.3 SYNTHESE - GROßMAßSTAB

4.3.1 Synthese von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol

(Vgl. Kapitel 4.1.2.4.a)

Die Synthese erbrachte das Zielprodukt in einer Ausbeute von >97 % in >97 %iger Reinheit (Bestimmung des Reinheitsgrades ¹H-NMR-spektroskopisch).

(Identifizierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid: Siehe Kapitel 4.1.2.4.a))

4.3.2 Synthese von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid aus 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid

(Vgl. Kapitel 4.1.3.2.c)

Die Zielverbindung wurde in einer Ausbeute von 82,7 % mit >97 %iger Reinheit gewonnen.

(Identifizierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid: Siehe Kapitel 4.1.3.2.a.)

4.3.3 Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin aus 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid

(Vgl. Kapitel 4.1.3.3.e) und 4.2)

Anhand der kinetischen Erkenntnisse wurden optimierte Reaktionsbedingungen angewandt, um den größtmöglichen Gehalt von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Rohprodukt zu erreichen.

Bei der Gewinnung der Zielverbindung aus dem Produktgemisch allerdings ermöglichten letztendlich erst weitere Permutation von Trennungsbedingungen und genaueste Untersuchung der das Zielprodukt enthaltenden Fraktionen eine Aufreinigung: Weder herkömmliche Säulenchromatographie oder präparative Dünnschichtchromatographie noch MPLC ermöglichten eine quantitative Trennung der Zielverbindung aus aufkonzentriertem Rohprodukt.

Es wurde allerdings gefunden, daß 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin mobil ist, wenn es auf Silicagel aufgezogen wurde. Als Feststoff auf die Silicagel-Säule aufgegeben, ist es jedoch relativ immobil. Somit blieb nach Auftragen des Rohproduktpulvers bei dem letzten Säulengang der Großteil des Zielproduktes oben auf dem Silicagel liegen und wurde erst mit Aceton als Eluent von der Säule heruntergespült.

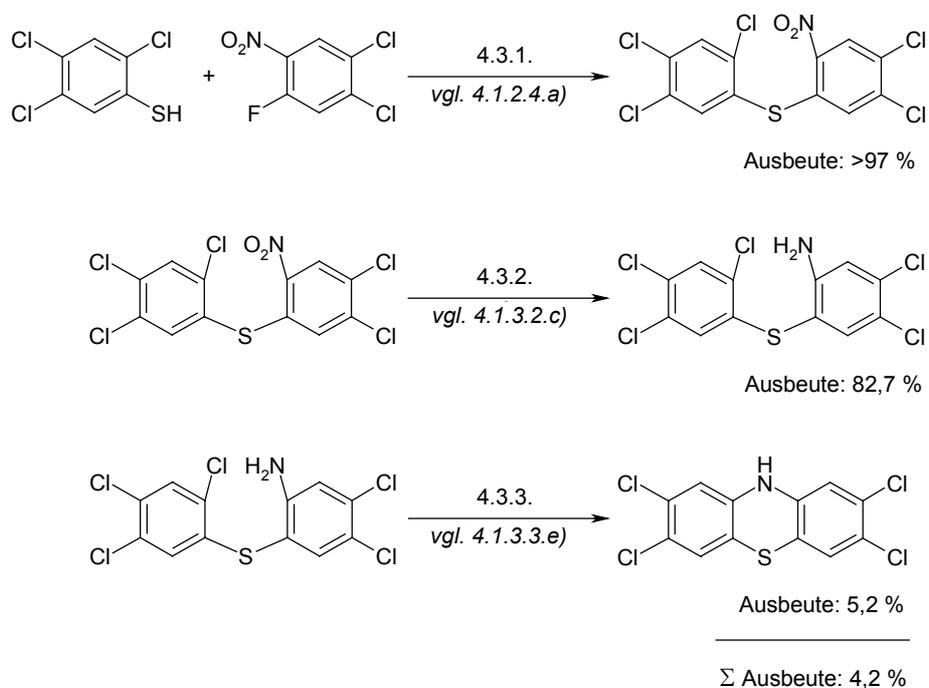
Eine weitere wichtige Beobachtung war, daß 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin bei mehrstündiger Lagerung als Lösung in Aceton instabil ist. Daher mußte das Lösungsmittel rasch entfernt werden. Da Aceton jedoch die bei weitem beste Löslichkeit bewirkte, konnte es hier nicht ersetzt werden.

Fazit

Nur das genaue Studium des Trennungsverhaltens von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin machte eine Aufreinigung möglich. Das Zielprodukt konnte in einer Gesamtausbeute von 5,2 % und einer Reinheit von 97 % gewonnen werden.

Gesamtfazit

Die Ausbeute an 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin lag nach drei Synthesestufen bei insgesamt 4,2 % der eingesetzten Edukt-Molmenge.



Schema 4-3:

Syntheseweg zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Gramm-Maßstab.

(Die Zahlenangaben sind Kapitelnummern der betreffenden Synthesen).

4.4 CHARAKTERISIERUNG VON 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN

Die strukturelle Identität und Komposition von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurde zuerst durch Kernresonanz-Spektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY) bestätigt. Es schloß sich gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie und Absorptionsspektroskopie im UV/VIS Bereich an, gefolgt von Elementaranalyse und Einkristall-Röntgenstrukturanalyse.

4.4.1 Kernresonanz-Spektroskopie

Die NMR-Spektren von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin bestätigten das Chlorierungsmuster des Trizyklus. Lösungsmittelleffekte waren erkennbar; so kam es in Aceton zum Auftreten von 5J -Kupplungen, die in Chloroform oder Tetrahydrofuran nicht erschienen. Das 2D-NMR-Spektrum in Chloroform zeigte eindeutig, daß die Protonen durch Ringsubstituenten so weit voneinander getrennt vorliegen, daß es zu keinerlei Kupplungen in diesem Lösungsmittel kommt. Des Weiteren kam es zwischen den Lösungsmitteln zu unterschiedlichen Verschiebungen der Protonensignale, vor allem denen des Amins.

$^1\text{H-NMR}$ (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in CDCl_3)

$\delta(\text{ppm})=5,83$ (s, 1H, NH), 6,63 (s, 2H, H4/H6), 7,01 (s, 2H, H1/H9)

$^1\text{H-NMR}$ (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Aceton- d_6)

$\delta(\text{ppm})=6,86$ (d, $^5J=1,2$ Hz, 2H, H4/H6), 7,16 (d, $^5J=1,5$ Hz, 2H, H1/H9), 8,33 (s, 1H, NH)

$^1\text{H-NMR}$ (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in THF- d_8)

$\delta(\text{ppm})=6,65$ (s, 2H, H4/H6), 7,09 (s, 2H, H1/H9), 8,10 (s, 1H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in CDCl_3)

$\delta(\text{ppm})=115,67$ (C1/C9), 117,63 (C12/C13), 125,93 (C3/C7), 127,39 (C4/C6), 131,11 (C2/C8), 139,72 (C11/C14)

COSY-2D-NMR (2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in CDCl_3)

$\delta(\text{ppm})=6,63/6,63$ (H4/H4 bzw. H6/H6), 7,01/7,01 (H1/H1 bzw. H9/H9)

4.4.2 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin ($\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_4\text{NS}$, 337,06 g/mol) weist aufgrund der Isotopenverteilung von Chlor (^{35}Cl 75,77 %, ^{37}Cl 24,23 %) ein für seine tetrachlorierte Struktur charakteristisches Isotopenmuster auf (siehe Abbildung 4-7). Die große Intensität des $[\text{M}^+]$ -Peaks bzw. hoher Massenpeaks ist für stabile, polyhalogenierte Heteroarene charakteristisch.

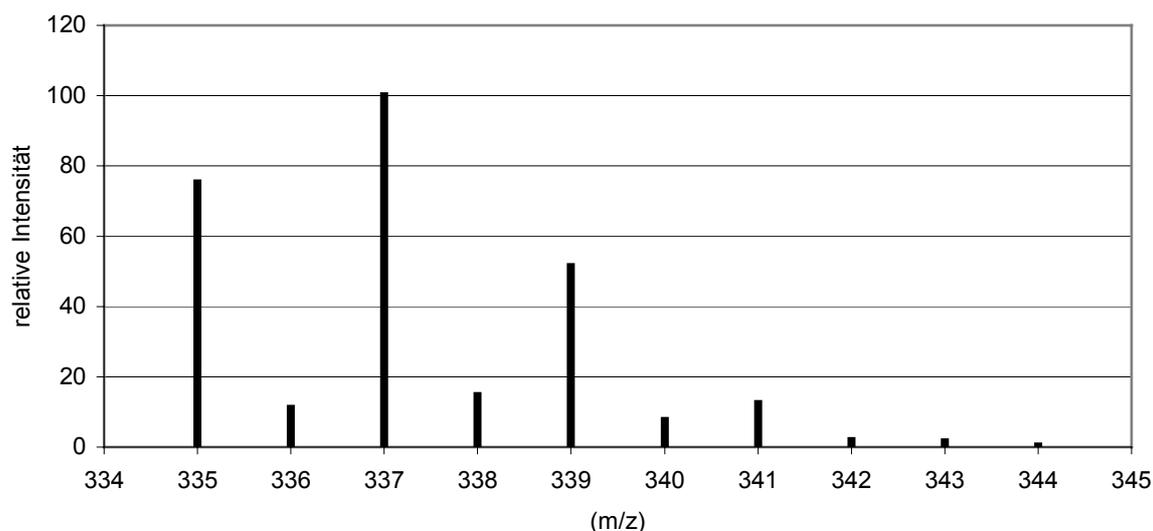


Abbildung 4-7:
Isotopenmuster von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Massenspektrum.

Des Weiteren wurden Abbauspezies zweifacher Ionisierung beobachtet. Das Fragmentierungsmuster von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin setzt sich wie folgt zusammen:

2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin:

335 (73 % ($C_{12}H_5Cl_4NS^+$)), 300 (62 % ($C_{12}H_5Cl_3NS^+$)), 264 (11 % ($C_{12}H_4Cl_2NS^+$)), 230 (9 % ($C_{12}H_5CINS^+$)), 194 (4 % ($C_{12}H_4NS^+$)), 168 (12 % ($[C_{12}H_5Cl_4NS]^{2+}$)), 132 (14 % ($C_{12}H_4Cl_2NS^{2+}$)).

4.4.3 UV/VIS-Spektroskopie

Zum Vergleich standen Phenothiazin, 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin, 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin und 1,2,3,7,8,9-Hexachlorphenothiazin (HxCPT).

Die Verbindungen wiesen nahezu identische UV/VIS-Spektren auf, unterschieden sich jedoch in einer bathochromen Verschiebung von zwei Absorptionsmaxima der chlorierten Verbindungen. Die Spektren sind in Abbildung 4-8 dargestellt. Die drei Banden des Benzols (${}^1B_{2u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ α -Bande, ${}^1B_{1u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ p-Bande, ${}^1E_{1u} \leftarrow {}^1A_{1g}$ β -Bande) werden durch den zusammenwirkenden Effekt des elektronen-

schiebenden, sekundären Amins und des elektronenziehenden Thioethers mit Chlorsubstituenten bathochrom verschoben. Der Grund hierfür liegt in dem mit Vergrößerung des Chromophors möglichen intramolekularen Charge-Transfer. Ein zunehmender Chlorierungsgrad zeigte eine stärkere bathochrome Verschiebung. Die Absorptionsmaxima lagen bei: Phenothiazin 251,7 nm, 1,3,7,9-TCPT 263,3 nm, 2,3,7,8-TCPT 264,4 nm und 1,2,3,7,8,9-HxCPT 269,2 nm.

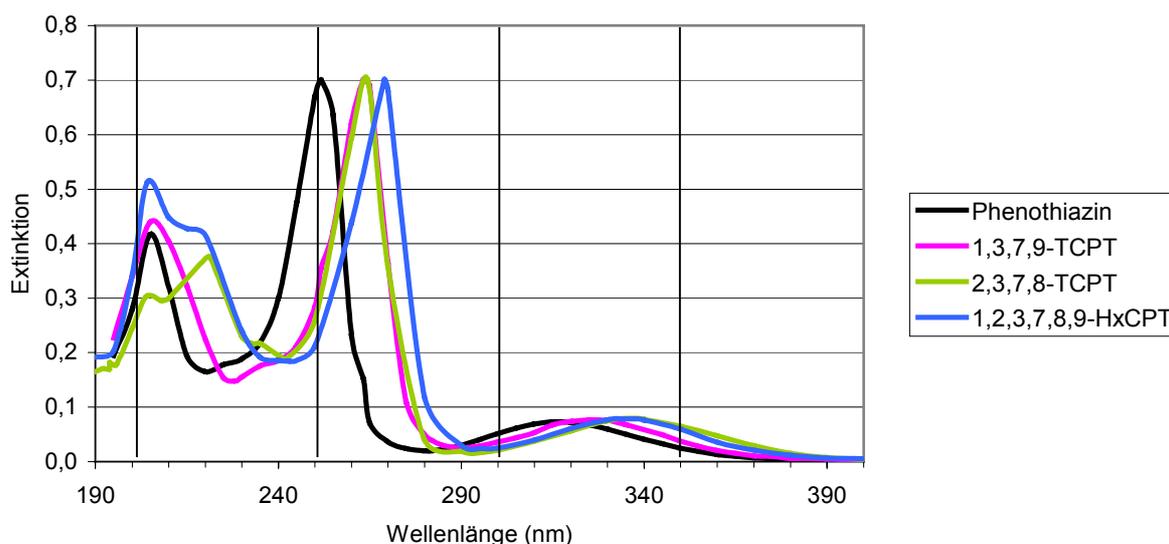


Abbildung 4-8:
UV/VIS-Spektren von Phenothiazin und chlorierten Derivaten in Methanol.

4.4.4 Elementaranalyse

Es wurden drei Elementaranalysen aus verschiedenen Großsynthesen von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin untersucht. Bei allen stellte sich die größte Abweichung vom Theoriewert beim Chloranteil heraus (siehe Tabelle 4-1). Die Elementaranalyse bestätigt die Zusammensetzung der untersuchten Substanz als Tetrachlorphenothiazin.

Tabelle 4-1:
Elementaranalysen verschiedener Einzelproben von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.
 (Abw. v. Theorie=absolute Abweichung vom Theoriewert).

Elementaranalyse von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin					
Theorie	% C	% H	% N	% Cl	% S
	42,76	1,50	4,16	42,07	9,51
Probe # 1	42,71	1,36	3,92	40,52	9,16
<i>Abw. v. Theorie (%)</i>	-0,05	-0,14	-0,24	-1,55	-0,35
Probe # 2	43,15	1,27	4,06	40,58	9,48
<i>Abw. v. Theorie (%)</i>	0,39	-0,23	-0,10	-1,49	-0,03
Probe #3	43,16	1,23	4,07	40,31	9,49
<i>Abw. v. Theorie (%)</i>	0,40	-0,27	-0,09	-1,76	-0,02
Mittelwert	43,01	1,29	4,02	40,47	9,38
Standardabweichung	0,257	0,067	0,084	0,142	0,188
<i>Abw. v. Theorie (%)</i>	0,24	-0,21	-0,14	-1,60	-0,14

4.4.5 Einkristall-Röntgenstrukturanalyse

Die Summenformel von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin konnte empirisch bestätigt werden. Das bestimmte Molekulargewicht von 337,03 g/mol lag im Rahmen des berechneten (337,06 g/mol). 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin bildet orthorhombische Kristalle der Raumgruppe $Pna2_1$ mit Zellen der Kantenlängen $a=20,7356$, $b=15,4686$, $c=3,7921$ Å. Die Dichte von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin wurde auf 1,840 g/cm³ bestimmt.

Die für Phenothiazine charakteristische, schmetterlingsähnliche Struktur mit Winkelung zwischen den Arylringen weist eine Abweichung von der Planarität des Moleküls in Höhe von 18,50° auf (Abbildung 4-9). Im Kristall liegt 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in parallelen Schichten zu rechtwinklig versetzten Molekülen vor (Abbildung 4-10).

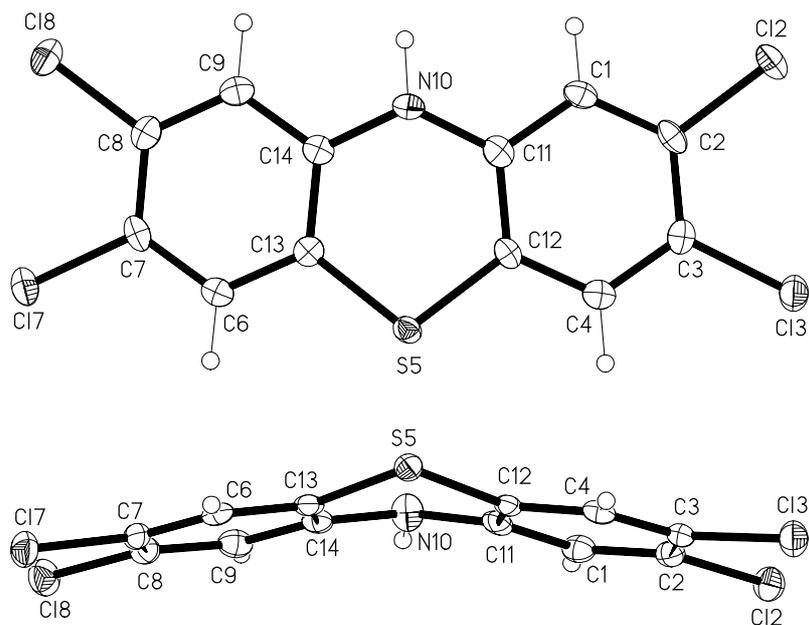


Abbildung 4-9:
Kristallstruktur eines Einzelmoleküls 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.
Blickrichtung auf den Trizyklus rechtwinklig zur und schräg entlang der S-N-Achse des Moleküls.

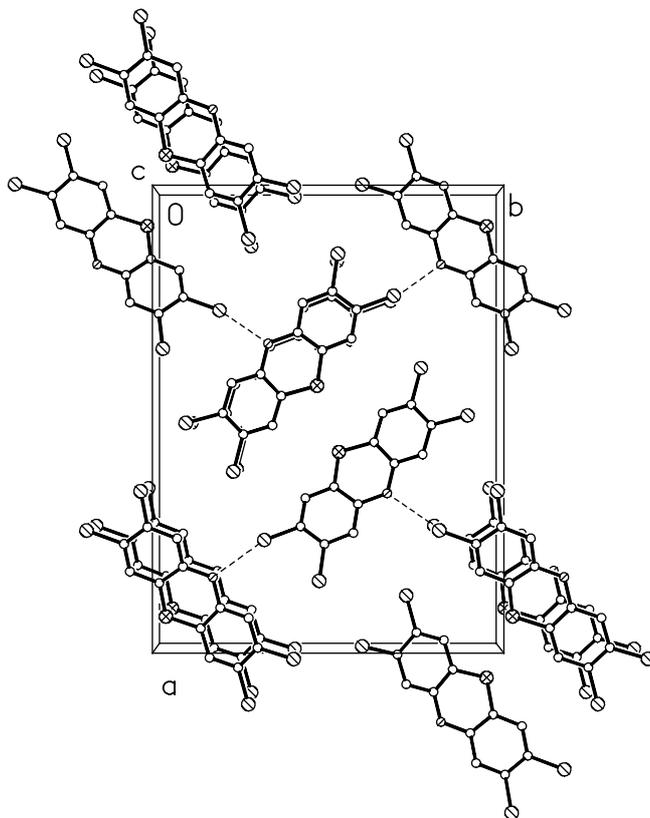


Abbildung 4-10:
Kristallstruktur von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.
Blick auf eine Einheitszelle.

4.5 IN VITRO-STUDIEN

Die *in vitro*-Studien am EROD-Bioassay ergaben eine Induktion des Testsystems durch TCPT (Abbildung 4-11). Die Induktion fiel bei zunehmender Inkubationszeit mit TCPT von 24 h nach 72 h ab, wohingegen der Standard TCDD eine stärkere Induktion über die Zeit bewirkte. Der Grund hierfür liegt in der Persistenz von TCDD. Es ist typisch für persistente Induktoren, daß sie bei längerer Inkubationszeit einen größeren Effekt bewirken. Die mit der Zeit sinkende Induktion durch TCPT weist auf einen Abbau der Verbindung im Testsystem der Leberzellen hin. Um daher den Effekt von TCPT mit dem von TCDD zu vergleichen, bieten die 24 h-Messungen die beste Basis.

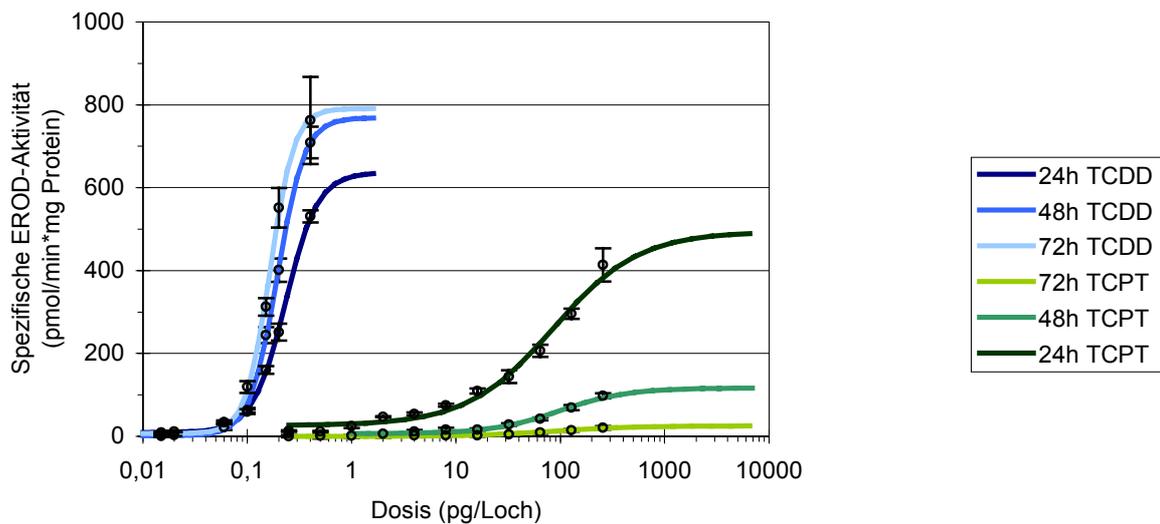


Abbildung 4-11:
Dosis-Wirkungs-Beziehungen von TCPT und TCDD im EROD-Bioassay.

Bei der Auswertung der Daten der 24 h Messung wurde für TCPT eine $ED_{50}=85,11$ pg/Loch gefunden, die nur gering vom Mittelwert der drei Zeitpunkte abwich ($ED_{50}=90,51$ pg/Loch, Standardabweichung (SD)=6,78). Für TCDD wurde nach 24 h eine $ED_{50}=0,231$ pg/Loch bestimmt (vgl. Mittelwert über alle Messungen: $ED_{50}=0,196$ pg/Loch, $SD=0,034$). Somit unterschied sich die Potenz* des TCPT von

* Mit der Potenz (potency) einer chemischen Verbindung wird allgemein die Position der Dosis-Wirkungs-Kurve entlang der Dosisachse bzw. Konzentrationsachse beschrieben.

der des TCDD um den Faktor $10^{-2,57}$ (Mittelwerte: Faktor $10^{-2,66}$). Die Berechnung des TEF-Wertes von TCPT ergab bei der 24 h-Messung $TEF=10^{-2,62}$.

Die maximale Wirkung* von TCPT lag mit $494,1 \text{ pmol}/_{\text{min}} \cdot \text{mg Protein}$ bei 77,6 % des maximalen Effektes von TCDD ($636,7 \text{ pmol}/_{\text{min}} \cdot \text{mg Protein}$), was dem Faktor $10^{-0,11}$ entspricht.

Die Werte des EROD-Bioassays ergaben übereinstimmend, daß die Potenz von TCPT etwa der $10^{-2,6}$ -fachen Potenz von TCDD entspricht, wohingegen die Wirkung von TCPT bei einem flacheren sigmoiden Kurvenverlauf nur unwesentlich unter der von TCDD liegt.

TCPT erwies sich bei den untersuchten Konzentrationen als nicht zytotoxisch.

4.6 AKUTE LETALITÄT

4.6.1 Akute perorale Letalität

Die Feststellung des akut letalen Dosisbereiches begann mit der Dosierung eines männlichen Meerschweinchens mit *p.o.* 100 mg/kg/d TCPT. Das Tier verlor täglich Körpergewicht und starb am 8. Tag. Folgend wurde ein Tier mit *p.o.* 50 mg/kg TCPT dosiert. Als es nach dem ersten Tag stark Körpergewicht verloren hatte, wurde die Dosisrate während der zwei folgenden Tage auf *p.o.* 10 mg/kg/d TCPT verringert. Nachdem daraufhin am dritten Tag wieder eine Gewichtserhöhung feststellbar war, wurde die Dosisrate zuerst auf *p.o.* 25 mg/kg/d TCPT erhöht und drei Tage später auf *p.o.* 50 mg/kg/d TCPT zurückgesetzt. Das Tier starb 11 Tage danach, am 17. Tag der Studie. Das dritte Tier erhielt *p.o.* 25 mg/kg/d TCPT und überlebte 18 Tage bei quasi konstantem Körpergewicht, bis die Studie beendet wurde. Folgend wurde eine Studie mit drei Tieren begonnen, die je *p.o.* 37,5 mg/kg/d TCPT erhielten. Nachdem am fünften Tag kein Trend zum Gewichtsverlust erkennbar war, wurden die Dosisraten schrittweise auf *p.o.* 44 mg/kg/d (Tag 5), 50 mg/kg/d (Tag 6-9), 57 mg/kg/d (Tag 10), 67 mg/kg/d

* Die maximale Wirkung (efficacy) einer chemischen Verbindung wird durch das asymptotische Maximum der Dosis-Wirkungs-Kurve beschrieben.

(Tag 11) und 75 mg/kg/d TCPT (Tag 12) erhöht, ohne daß Gewichtsverluste eintraten. Die Studie wurde ohne Feststellung eines Todesfalls an Tag 13 beendet.

Da Dosisraten von *p.o.* 50 mg/kg/d TCPT ohne lange vorherige Adaptation an kleinere Dosisraten bei zwei Tieren letal wirkte und *p.o.* 25 mg/kg/d TCPT klar subletal war, wurde der Bereich letaler Dosisraten als dazwischen liegend eingegrenzt. Obwohl streng genommen inkorrekt, da die Zahl nicht durch entsprechend größere Studien und Statistik abgesichert ist, wird fortan der Einfachheit halber der so eingegrenzte Dosisratenbereich als LD₅₀ bezeichnet.

Somit wurde die akut letale Toxizität von TCPT, auch im Hinblick auf den Todesfall während der Ovulationsstudien*, im Meerschweinchen auf *p.o.* LD₅₀=25-50 mg/kg/d TCPT bestimmt.

4.6.2 Akute intravenöse Letalität

Anhand der Syntheseerfahrungen war bekannt, daß die acetonische Lösung von TCPT für den Zeitraum von Herstellung der Dosierungslösung bis zur Dosierung der Tiere (<30 min) stabil ist.

Für Kinetikstudien dosierte Tiere[†] wurden beobachtet und die folgenden akuten Effekte gefunden:

- *i.v.* 1 und 3 mg/kg TCPT in 1 ml/kg Aceton (je eine Ratte): Die Tiere waren für 3 min bewußtlos. Nach einer Aufwachphase zeigten sie keine erkennbare Effekte mehr. Es wurde Blut im Urin gefunden.
- *i.v.* 5 mg/kg TCPT in 1 ml/kg Aceton (fünf Ratten): Die Tiere waren zwischen 1-4 min bewußtlos und zeigten nach einer Aufwachphase von 15-25 min keine erkennbaren Effekte mehr. Bei allen Tieren wurde Blut im Urin beobachtet.

* Siehe Kapitel 4.7

† Siehe Kapitel 3.10.3.1

- *i.v.* 10 mg/kg TCPT in 1 ml/kg Aceton (eine Ratte): Das Tier war für 10 min bewußtlos und für weitere 20 min regungslos. Es zeigte nach einer Aufwachphase keine erkennbaren Effekte mehr. Im Urin wurde Blut gefunden.
- *i.v.* 30 mg/kg TCPT in 1 ml/kg Aceton (zwei Ratten): Unabhängig von der Dauer der Injektion (30 sec-3 min) starben beide Tiere innerhalb von Sekunden mit Ende der Injektion.

Der akut letale Bereich von TCPT in Ratten liegt folglich bei *i.v.* LD₅₀=10-30 mg/kg TCPT.

4.7 OVULATIONSTUDIEN

Der Dosierungszeitraum von Tag 12 an für 9 Folgetage war gewählt worden, da bei Meerschweinchen zwischen dem 12. Tag und der Ovulation die Zykluslänge durch luteinisierendes Hormon bestimmt wird [233]. Alle Tiere verloren Körpergewicht während der Dosierungsphase des Versuchs. Folgende weitere Beobachtungen wurden während des betroffenen Zyklus gemacht:

- *p.o.* 2,5, 5 mg/kg/d TCPT: Beide Tiere hatten eine reguläre Zyklusdauer und ovulierten regelmäßig.
- *p.o.* 10 mg/kg/d TCPT: Die Vagina dieses Tieres öffnete sich nicht, das Häutchen wies an nur einem einzigen Tag einen leichten Riß auf. Es kann daher von einem Ausfallen der Ovulation ausgegangen werden. Des weiteren verlor das Tier auch nach Dosierungsende Körpergewicht, bis es an Tag 13 verstarb.
- *p.o.* 20 mg/kg/d TCPT: Bei keinem der beiden Tieren fand eine Ovulation statt. Die nächste Ovulation folgte in einem Tier nach einem irregulärem Intervall von 12 Tagen. Das andere Tier ovulierte erst wieder nach einer kompletten Zykluslänge. Die nachfolgenden Zyklen traten in beiden wieder in regulären Intervallen auf.

- Pair-fed zu *p.o.* 20 mg/kg/d TCPT: Die Vagina öffnete sich nicht weit genug zur Probenahme. Es wird von einem Ausfallen der Ovulation ausgegangen. Die nächsten Ovulationen folgen turnusgemäß.
- Kontrolle: Das Tier ovulierte regelmäßig, wobei es zum Tag des Eisprungs 5 % seines Körpergewichts verlor.

4.8 HPLC-ANALYTIK

4.8.1 Methodenentwicklung

Bei einer Direktschaltung von ADS-Kartusche und Detektor konnten bei einem Fließmittel der Zusammensetzung 95 % Wasser und 5 % Methanol die Parameter $t_M=7$ min und $t_A>50$ min für Ratten- sowie Meerschweinchenserum bestimmt werden. Somit wurde t_{V1} auf 15 min festgelegt. Bei der Bestimmung des Analyttransfers im Rückflußverfahren wurde ein Lösungsmittelgemisch von 8 % Wasser und 92 % Methanol verwendet. Der vollständige Transfer wurde dauerte $t_T=4$ min, t_{V2} wurde somit auf 20 min Gesamtzeit programmiert.



Abbildung 4-12:

HPLC-Spektrum einer Messung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Serum. Signal bei 24,05 min. Konkretes Beispiel: Meerschweinchen, dosiert mit *i.v.* 10 mg/kg 2,3,7,8-TCPT, Probenzeitpunkt 15 min. (Anm.: Baujahrbedingt war die HPLC-Anlage Soft- und Hardware-inkompatibel, so daß kein Ausdruck der Spektren möglich war. Die Abbildung ist eine Fotografie des Bildschirms).

Die entwickelte Methodik und Lösungsmittelwahl erwies sich als optimal. Sie ergab ein einzelnes Signal nach dem Rauschen durch die Ventilumschaltung (Abbildung 4-12). Dieses Signal stammte von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin und wies eine Gesamt-Retentionszeit von 24,05 min auf.

4.9 KINETIK

Wahrscheinlich aufgrund der chirurgischen Positionierung der Kanülen in den Drosselvenen kam es bei einigen Tieren zur Bildungen ventilähnlicher Eigenschaften der Kanülen, so daß zwar injiziert, nicht jedoch Blut entnommen werden konnte. Diese Tiere fielen folglich zur Probenahme aus. Ferner wurden die Proben der mit *i.v.* 1 und 3 mg/kg TCPT dosierten Ratten aufgrund während der Analytikphase absehbaren Nähe bzw. Unterschreitung des LOQ nicht untersucht. Somit wurden die Serumproben folgender Tiere gemessen:

- Ratten

i.v. 5 mg/kg TCPT: Zwei Tiere

i.v. 10 mg/kg TCPT: Ein Tier

p.o. 30 mg/kg TCPT: Ein Tier

- Meerschweinchen

i.v. 10 mg/kg TCPT: Zwei Tiere

4.9.1 Intravenöse Dosierung

Die computative Auswertung wird hier der klassischen Kurvenverrechnung gegenübergestellt. Bei Kurvenangleich nach exponentiellem Abbau wurde eine Anpassung an Ein-, Zwei- und Drei-Kompartiment-Modelle durchgeführt, um anhand der optimalen Annäherung das tatsächliche Modell zu bestimmen. Dargestellt sind die jeweils besten Approximationen.

4.9.1.1 Ratte *i.v.* 5 mg/kg TCPT

Bei der computativen Regression ergab das Zwei-Kompartiment-Modell die beste Kurvenanpassung. Bei dem Ein-Kompartiment-Modell war der Regressionskoeffizient niedriger ($R^2=0,9779$ ($n=8$)), und die Kurvenanpassung zu späteren Zeitpunkten wich stark von den Meßwerten ab. Das Drei-Kompartiment-Modell wies z.T. achtstellige Standardfehler bei gleichem Regressionskoeffizienten ($R^2=0,9946$ ($n=8$)) auf. Die für das Zwei-Kompartiment-Modell berechneten Parameter waren wie folgt:

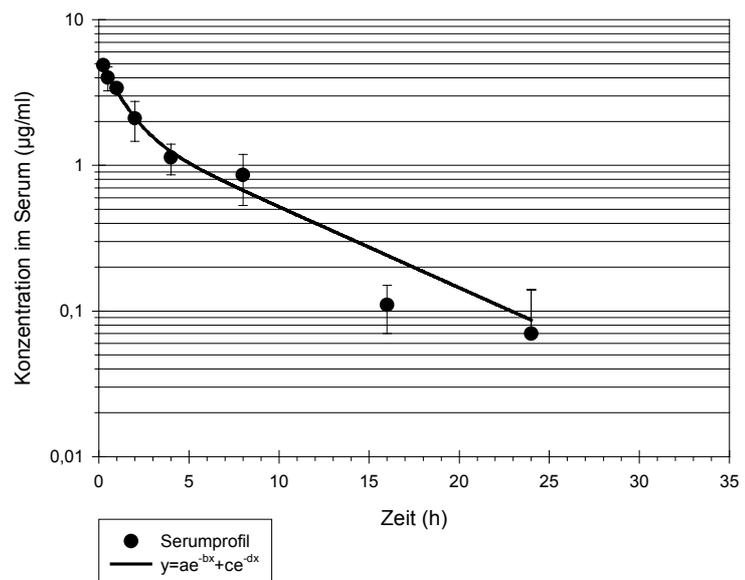
$y=ae^{-bx}+ce^{-dx}$	$a=3,700$	Standardfehler:	0,744
	$b=0,843$		0,284
	$c=1,862$		0,832
	$d=0,128$		0,057

$$R^2=0,9946 \text{ (n=8)}$$

$$t_{1/2(\text{Vert})}=0,82 \text{ h}$$

$$t_{1/2(\text{Elim})}=5,42 \text{ h}$$

Abbildung 4-13:
Kinetik Ratte, *i.v.* 5 mg/kg
TCPT, computativer
Kurvenvergleich, Zwei-
Kompartiment-Modell, Serum.



Der klassische Kurvenangleich erbrachte ebenfalls ein Zwei-Kompartiment-Modell, mit folgenden Parametern:

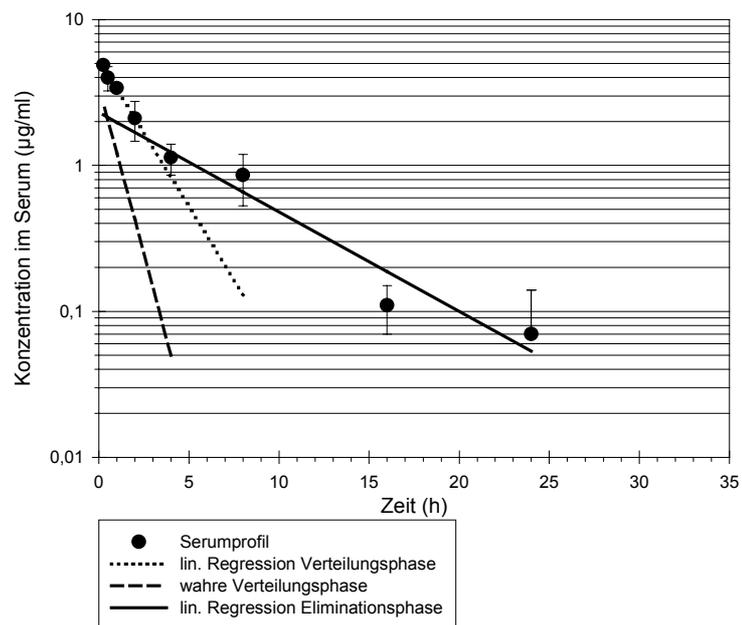
Verteilungsphase: $R^2=0,985$ (n=4, t=0,25, 0,5, 1, 2 h)

$t_{1/2(\text{Vert})}=0,73$ h

Eliminationsphase: $R^2=0,930$ (n=4, t=4, 8, 16, 24 h)

$t_{1/2(\text{Elim})}=4,45$ h

Abbildung 4-14:
Kinetik Ratte, *i.v.* 5 mg/kg
TCPT, klassischer
Kurvenangleich, Zwei-
Kompartiment-Modell, Serum.



4.9.1.2 Ratte *i.v.* 10 mg/kg TCPT

Zwar zeigt in dieser Messung der Regressionskoeffizient zur computativen Anpassung an ein Ein-Kompartiment-Modell ($R^2=0,9911$ (n=8)) nur wenig Abweichung vom Zwei-Kompartiment-Modell, doch war die Anpassung an spätere Zeitpunkte ungeeignet. Beim Versuch des Kurvenangleichs an ein Drei-Kompartiment-Modell wurde die maximale Iterationszahl überschritten, so daß das Programm die Daten nicht mehr verarbeiten konnte; die Anpassungsrechnungen waren zu komplex. Bei Anpassungen an das tatsächliche Modell ist der

Rechenprozeß jedoch gering, da nur geringe Annäherung nötig ist. Daher kann davon ausgegangen werden, daß das Drei-Kompartiment-Modell nicht zutrifft.

Das Zwei-Kompartiment-Modell ergab somit die beste Kurvenanpassung. Die berechneten Parameter waren wie folgt:

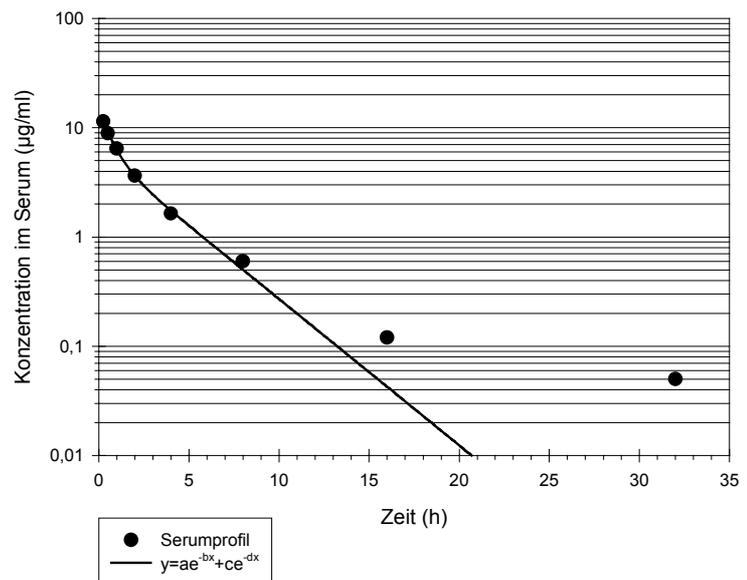
$y=ae^{-bx}+ce^{-dx}$	$a=8,447$	Standardfehler:	1,336
	$b=1,481$		0,350
	$c=5,920$		1,587
	$d=0,309$		0,066

$$R^2=0,9991 \text{ (n=8)}$$

$$t_{1/2(\text{Vert})}=0,47 \text{ h}$$

$$t_{1/2(\text{Elim})}=2,25 \text{ h}$$

Abbildung 4-15:
Kinetik Ratte, *i.v.* 10 mg/kg
TCPT, computativer
Kurvenvergleich, Zwei-
Kompartiment-Modell, Serum.



Auch der klassische Kurvenvergleich erbrachte ein Zwei-Kompartiment-Modell, mit den folgenden Parametern:

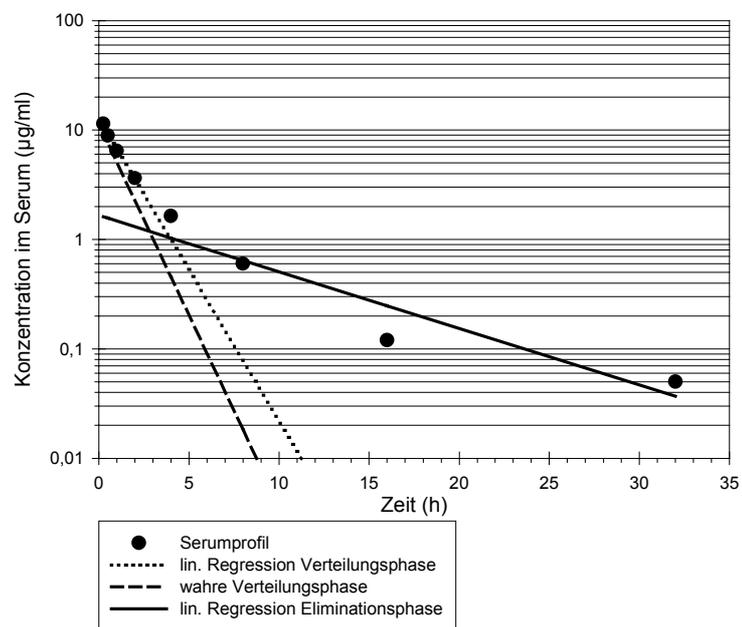
Verteilungsphase: $R^2=0,995$ (n=4, t=0,25, 0,5, 1, 2 h)

$t_{1/2(\text{Vert})}=0,86$ h

Eliminationsphase: $R^2=0,899$ (n=4, t=4, 8, 16, 32 h)

$t_{1/2(\text{Elim})}=5,63$ h

Abbildung 4-16:
Kinetik Ratte, *i.v.* 10 mg/kg
TCPT, klassischer
Kurvenvergleich, Zwei-
Kompartiment-Modell, Serum.



4.9.1.3 Meerschweinchen *i.v.* 10 mg/kg TCPT

Das Ein-Kompartiment-Modell erwies sich als schlechte computative Annäherung ($R^2=0,9742$ (n=9)). Bei dem Drei-Kompartiment-Modell ergaben sich neunstellige Standardfehler, so daß es als zu komplexe Möglichkeit zugunsten des Zwei-Kompartiment-Modells ausgeschlossen werden konnte. Der Regressionskoeffizient war mit dem des Zwei-Kompartiment-Modells identisch.

Das Zwei-Kompartiment-Modell ergab folglich die beste Kurvenanpassung.
Die berechneten Parameter waren wie folgt:

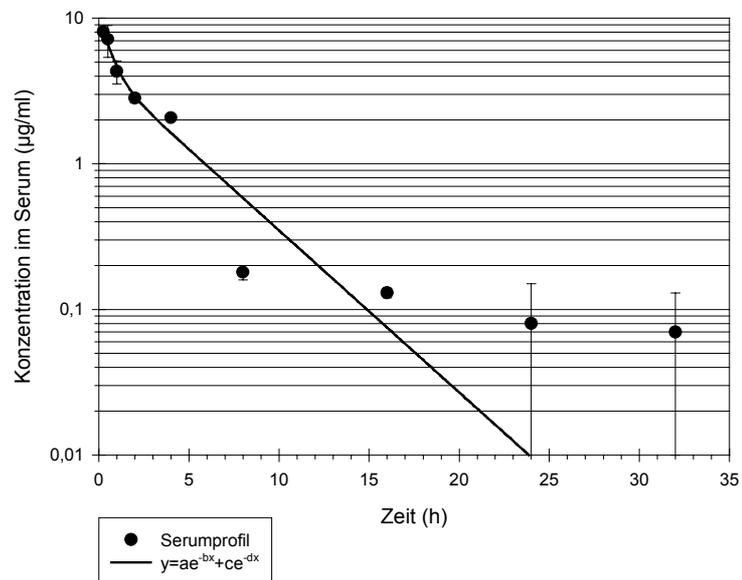
$y=ae^{-bx}+ce^{-dx}$	$a=6,132$	Standardfehler:	1,840
	$b=1,658$		1,022
	$c=4,518$		2,254
	$d=0,256$		0,125

$$R^2=0,9899 \text{ (n=9)}$$

$$t_{1/2(\text{Vert})}=0,42 \text{ h}$$

$$t_{1/2(\text{Elim})}=2,71 \text{ h}$$

Abbildung 4-17:
Kinetik Meerschweinchen, *i.v.*
10 mg/kg TCPT, computativer
Kurvenvergleich, Zwei-
Kompartiment-Modell, Serum.



Der klassische Kurvenvergleich erbrachte ebenfalls ein Zwei-Kompartiment-Modell. Die Parameter waren:

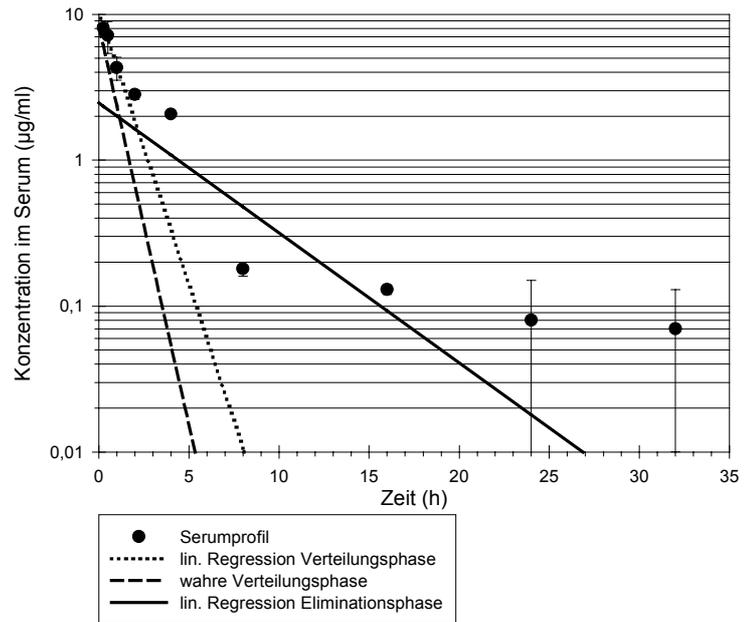
Verteilungsphase: $R^2=0,967$ (n=3, t=0,25, 0,5, 1 h)

$$t_{1/2(\text{Vert})}=0,55 \text{ h}$$

Eliminationsphase: $R^2=0,681$ (n=3, t=4, 8, 16 h)

$$t_{1/2(\text{Elim})}=3,38 \text{ h}$$

Abbildung 4-18:
Kinetik Meerschweinchen, *i.v.*
10 mg/kg TCPT, klassischer
Kurvenvergleich, Zwei-
Kompartment-Modell, Serum.



Zusammengefaßt sind die gefundenen Halbwertszeiten in Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2:
Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Serum
von Ratte und Meerschweinchen.

Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin				
	$t_{1/2}(\text{Vert})$		$t_{1/2}(\text{Elim})$	
	computativ	klassisch	computativ	klassisch
Ratte 5 mg/kg <i>i.v.</i>	0,82 h	0,73 h	5,42 h	4,45 h
Ratte 10 mg/kg <i>i.v.</i>	0,47 h	0,86 h	2,25 h	5,63 h
Meerschweinchen 10 mg/kg <i>i.v.</i>	0,42 h	0,55 h	2,71 h	3,38 h

4.9.2 Perorale Dosierung

Die nach der *p.o.* Dosierung in Serum gefundenen Konzentrationen von TCPT bewegten sich am Rande bzw. unter dem Quantifizierungslimit ($0,05 \mu\text{g/ml}$) und nur knapp oberhalb des Detektionslimits ($0,01 \mu\text{g/ml}$). Somit sind die gefundenen Werte, v.a. spätere Zeitpunkte, nicht aussagekräftig genug, um genaue Berechnungen anzustellen. Die Resorptions- und Verteilungsphase wurden aufgrund zu großer Probenintervalle in diesem Zeitraum unzureichend erfaßt.

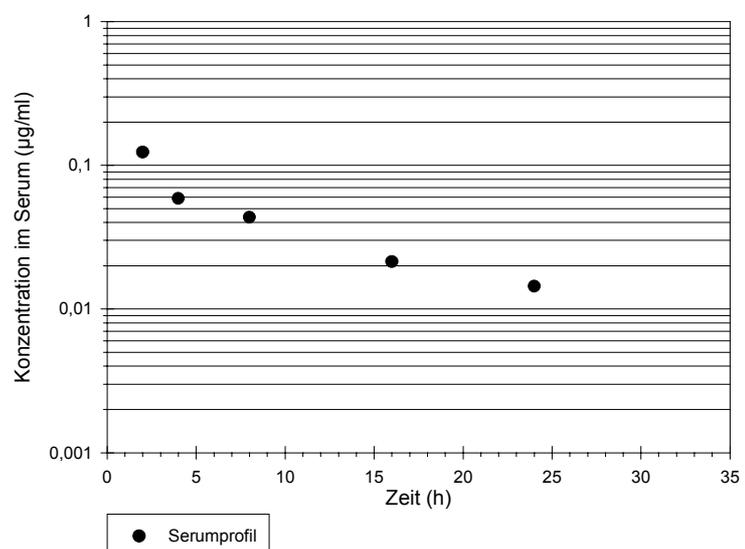
Aus den ersten beiden Meßwerten kann jedoch, unter Vernachlässigung der Elimination, ein Wert für die Verteilungsphase berechnet werden, der die längstmögliche Verteilungshalbwertszeit darstellt - unabhängig vom exakten Zeitpunkt des Konzentrationsmaximums. Somit gilt:

$$t_{1/2(\text{Vert})} \leq 0,54 \text{ h}$$

Unter Vernachlässigung der Elimination kann ebenso die langsamste Resorptions-Halbwertszeit aus dem nicht vorhandenen Meßwert bei $t=1 \text{ h}$ und dem ersten Meßwert ($t=2 \text{ h}$) berechnet werden. Da das Detektionslimit bei $0,01 \mu\text{g/ml}$ lag, ergibt die log-Gerade zwischen $0,01 \mu\text{g/ml}$ bei 1 h und dem Meßwert bei 2 h die geringst mögliche Steigung einer Resorptionsphase, unabhängig vom exakten Zeitpunkt des Konzentrationsmaximums. Somit beträgt die Resorptionshalbwertszeit

$$t_{1/2(\text{Resorp})} \leq 0,276 \text{ h}$$

Abbildung 4-19:
Kinetik Ratte, *p.o.* 30 mg/kg
TCPT, Datenpunkte, Serum.



5.1 SYNTHESE

Die Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin erwies sich als problematischer, als es zunächst angenommen wurde; sie stellte sich als der am stärksten zeitbestimmende Schritt des Projektes heraus.

Die Synthesestrategien basierten vollständig auf kommerziell erhältlichen Edukten. Hierfür gab es zwei Gründe: Es war davon auszugehen, daß die Chlorsubstituenten an den Arylringen gewisse deaktivierende Effekte ausüben würden. Das Ausmaß dieser war jedoch unbekannt. Somit war auch unklar, welcher der möglichen Synthesewege (siehe Schema 1-2) erfolgreich sein würde. Um daher innerhalb des für die Synthesearbeiten gesetzten zeitlichen Rahmens ein größeres Spektrum an Möglichkeiten untersuchen zu können, fand ein Screening basierend auf kommerziell erhältlichen Edukten statt. Außerdem wurden die Synthesen mit Hinblick auf die nachfolgende Herstellung größerer Mengen für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen entwickelt. Zu diesem Zweck ist eine auf kommerziell erhältlichen Edukten basierende Synthese zu bevorzugen.

Eine in der Literatur beschriebene einstufige Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin ^[153, 154] war bereits in Voruntersuchungen falsifiziert worden ^[155]. Dies konnte durch neue Untersuchungen mit abgewandelten Reaktionsbedingungen bestätigt werden.

Keiner der untersuchten ein- oder zweistufigen Synthesewege ergab die Zielverbindung, viele historisch bedeutsame Zugänge zur Phenothiazinstruktur versagten ebenso wie Variationen derselben.

Erst eine dreistufige Synthesestrategie führte zum Erfolg, bei der eine Ullmann-Kupplung angewandt wurde. Die ersten beiden Syntheseschritte dorthin gelangen fast quantitativ. Die Bildung des Thioethers war unter verschiedenen Lösungsmittel-Bedingungen sehr ausbeutevariabel. DMF als polares aprotisches Lösungsmittel ergab die schlechteste Ausbeute. Mit abnehmender Polarität des Solvens nahm auch der Anteil an Nebenprodukten stetig ab. Nach Erkennung

des Zusammenhangs zwischen Ausbeute und Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels konnten schnell optimale Reaktionsbedingungen gewählt werden, die einen vollständigen und sauberen Umsatz ergaben. Das vergleichsweise unpolare Lösungsmittel Dichlormethan schließlich ergab einen quasi nebenproduktfreien Ertrag von >97 %.

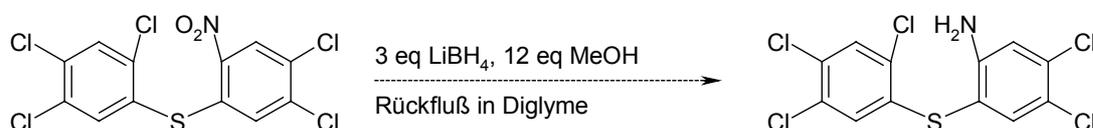
Wie strategisch die Eduktauswahl des Fluorids zur Diarylsulfidbildung war, soll anhand eines Beispiels aus der Hoch-Zeit der Phenothiazinsynthesen^[234] verdeutlicht werden. Hier wurde (in 30 % NaOH mit Ethanol) der Thioether über das Thiol und einen Chlorsubstituenten erzeugt. Obwohl auch über die so durchgeführte Synthese von Dichlordiarylsulfid berichtet wurde, so wird deutlich, daß spätestens bei der Synthese des hier angestrebten Zielproduktes Pentachlor-diarylsulfid mittels dieser Methode ein Produktgemisch entstanden wäre: Aufgrund von Mesomerieeffekten des Nitrosubstituenten wären mindestens zwei Hauptprodukte (2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid und 2,2',4,5,5'-Pentachlor-4'-nitro-diphenylsulfid) sowie ein Nebenprodukt (2,2',4,4',5-Pentachlor-5'-nitro-diarylsulfid) entstanden. Di- bzw. Polymerisationen des Trichlorsulfids wären unwahrscheinlich, jedoch nicht auszuschließen gewesen. All dies war bei der Reaktion aus Kapitel 4.1.2.4.a) durch Wahl des Fluorsubstituenten umgangen worden.

Die zweite Stufe, die Reduktion einer Nitrogruppe zum Amin als Vorbereitung auf den letzten Reaktionsschritt, erwies sich ebenfalls als gut gangbar. Die Gründe für die niedrigen Ausbeuten zweier sonst ertragsreicher Reduktionsreaktionen blieben im vorliegenden Fall ungeklärt. Die auf 1854^[192, 193] zurückdatierende Verwendung von Eisen als Reduktionsmittel war die älteste der untersuchten Reaktionsbedingungen und erwies sich als die erfolgreichste.

Nachdem sich die Reduktion nach Béchamp somit als leicht durchführbar sowie ökonomisch herausstellte, erfolgten keine Untersuchungen von Alternativreaktionen mehr. Als vielversprechend galten noch mindestens zwei mögliche Reduktionswege:

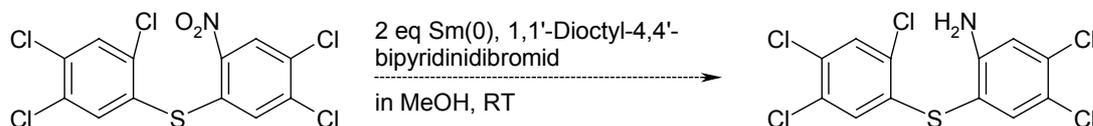
Gegenüber der klassischen Reduktion von Nitrobenzol mit Lithiumborhydrid ^[235] wurde in der Literatur die Verwendung eines mit Methanol gemischten Lösungsmittels als überlegen beschrieben ^[236]. So konnte z.B. durch den Zusatz von Methanol zu Diethylenglykoldimethylester (Diglyme) die Ausbeute bei der Reduktion von Nitrobenzol zu Anilin von 41 % auf 87 % erhöht werden. Eine Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf den Syntheseweg zu TCPT ist in Gleichung 5-1 dargestellt.

Gleichung 5-1:
Alternative Reaktionsbedingungen zur Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit Lithiumborhydrid.



Eine weitere Alternative wäre eine der neuesten Methoden zur Reduktion aromatischer Nitrogruppen gewesen: Der Einsatz von Samarium(0) mit 1,1'-Dioctyl-4,4'-bipyridinidibromid ^[237] (Gleichung 5-2 zeigt diese Alternativreaktion an dem Syntheseweg zu TCPT). Sie wird nicht nur als hochselektiv, sondern auch mit 79-99 % Ausbeute als sehr ertragreich beschrieben. Da jedoch Samarium in doppelter Äquivalentzahl zugesetzt werden muß, stellt dies im Vergleich zu Eisen eine unökonomische Alternative dar.

Gleichung 5-2:
Alternative Reaktionsbedingungen zur Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit Samarium(0).



Der letzte Schritt der dreistufigen Synthese erwies sich als der zeit- und ausbeutelimittierende. In der klassischen Phenothiazinchemie fand die Bindungsbildung überwiegend zwischen Amin und Bromsubstituent statt, der für diese Reaktion eine bessere Abgangsgruppe darstellt.

Es wurden unterschiedlichste Zugänge zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin untersucht, von denen nur einer über Umsetzung im Spurenbereich hinaus erfolgreich war. Es handelte sich um eine Variation der Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid. Interessanterweise ergab eine Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Iod kein Zielprodukt. Neben dem angewandten Weg zur Herstellung des Kupfers in Form von Zementkupfer sind noch weitere Herstellungsmethoden für diesen Katalysator bekannt. So kann u.a. hochreaktives Kupfer durch die Reduktion von Kupfer(I)iodid mit stöchiometrischen Mengen an Kalium und 10 % Naphthalin in Dimethoxyethan unter Schutzgas hergestellt werden [238], oder auch durch die Reduktion eines Kupfer(I)phosphin Komplexes mit Lithium-naphthalid unter Schutzgasatmosphäre [239]. Da mit Zementkupfer jedoch bereits ein hochreaktiver Katalysator zur Verfügung stand, waren keine signifikanten Ausbeuteverbesserungen durch andere Kupferkonformationen zu erwarten.

Eine Untersuchung unterschiedlicher Zugabebedingungen der erfolgreichen Katalysatorkombination zeigte, daß mehrfache Zuführung nicht reaktionsfördernd war. Studien der Kinetik dieser Reaktion ergaben, daß nach der Entstehung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin sein Abbau einsetzte, so daß das Zielprodukt nur innerhalb eines begrenzten Zeitfensters vorhanden war. Der Maximalgehalt im Reaktionsgemisch war nach etwa 24 h erreicht. Die Aufreinigung der Zielverbindung erwies sich nicht nur wegen des trotzdem geringen Gehalts im Rohprodukt als extrem aufwendig, sondern auch weil ein Nebenprodukt mit exakt gleichen chromatographischen Eigenschaften gebildet wurde. Erst vielfache Abwandlung der Aufreinigungsbedingungen ergab den entscheidenden Schritt zu sauberem TCPT: Das Verhalten der auf Silica gezogenen vs. aufgestäubten Substanz.

Dieser letzte Reaktionsschritt stellte die schwierigste Hürde bei der Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin dar, sowohl im Hinblick auf seine Durchführbarkeit als auch bezüglich Ausbeute und Aufreinigung.

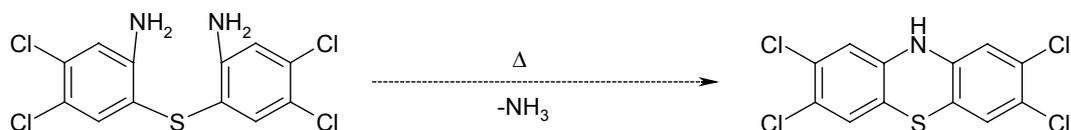
Die ebenfalls untersuchten Reaktionsbedingungen zur Heck-Reaktion waren zwar stereotypisch für diese, doch wurden seit ihrer Entdeckung noch zahlreiche

Variationen entwickelt. Obwohl Palladiumacetat als Katalysator ausreicht [240], wird verschiedentlich Triphenylphosphin als Katalysatorkomponente bei der Heck-Reaktion postuliert [241, 242]. Ebenso wurden weitere Reaktionsbedingungen und Palladiumkatalysatoren entwickelt [243], z.B. Pd(OAc)₂/±BINAP [206], Pd₂(dba)₃/BINAP [244] sowie Palladiumkomplexe mit o-Biphenyl-P(tBu)₂ oder o-Biphenyl-PCy₂ mit NaOtBu [245].

Eine Nutzung der Smiles-Umlagerung (siehe Kapitel 4.1.2.4.b)) über das 3,4,4',5'-Tetrachlor-2'-Nitro-diphenylsulfid erscheint aufgrund der geringen Ausbeute des Umlagerungsproduktes unrentabel.

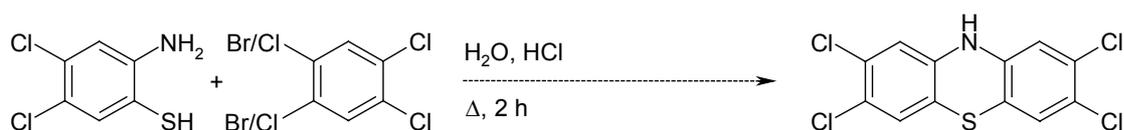
Bei Verfügbarkeit entsprechender kommerziell erhältlicher Edukte wäre eine Imipramin-analoge Zyklisierung durch Ammoniak-Elimination zu versuchen gewesen (Gleichung 5-3).

Gleichung 5-3:
Alternative Zyklisierung in Imipramin-Analogie.

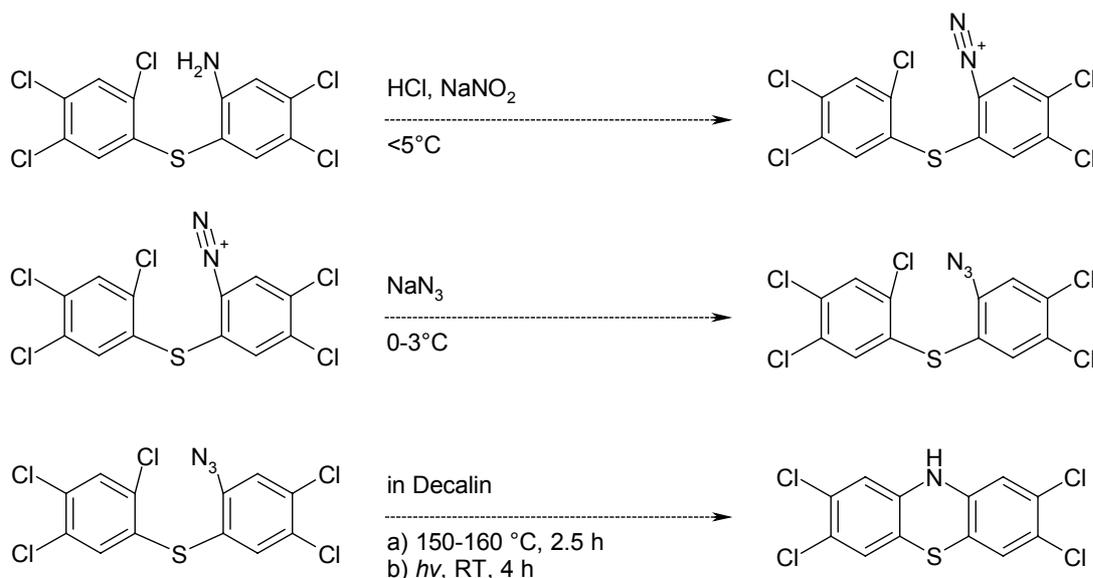


Anhand der einstufigen Synthese einer verwandten Verbindungsklasse soll die Einschränkung der primären Synthesemöglichkeiten von TCPT durch Eduktverfügbarkeit verdeutlicht werden: Edukte zu einer nur in der verwandten Diazaphenothiazinchemie erwähnten Synthese [184] waren nicht verfügbar (Projektion auf die Synthese von TCPT in Gleichung 5-4).

Gleichung 5-4:
Alternative Synthesestrategie aus der Diazaphenothiazin-Chemie.



Eine letzte Alternative wäre die Synthese via Azid-Elimination gewesen. Cadogan hat bei seinen Phenothiazinsynthese in den 1970er Jahren die Zyklisierung mittels Thermo- oder Photolyse bewirkt [179, 182]. Hierzu wurde aus dem Amin ein Azid gebildet, bei dessen Zerfall der Ringschluß erfolgte (auf die TCPT-Synthese angepaßte Reaktionen siehe Schema 5-1). Cadogan erhielt mit dieser Methode 3-Chlorphenothiazin in einer Ausbeute von 34 %.



Schema 5-1:
Alternative Synthesestrategie über die Thermo-/Photolyse eines Azids.

Dieser Reaktionsweg wurde aufgrund des bei Vergrößerung des Reaktionsansatzes unkalkulierbaren Risikos nicht versucht.

Fazit

Es ist gelungen, einen erfolgreichen Syntheseweg für TCPT zu finden, und die Verbindung für die folgenden *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen in Grammengen herzustellen. Hierzu erfolgte ein Screening potentieller Synthesewege mit kommerziell erhältlichen Edukten. Es wird aus den zahlreichen erfolglosen Synthesewegen und der geringen Ausbeute der erfolgreichen Route geschlußfolgert, daß die lateralen Chlorsubstituenten an den Arylringen diese so stark deaktivierten, daß eine Kupplung zum Phenothiazin mit einem Chlorsubstituent als Abgangsgruppe extrem disfavorisiert wurde. Daher erscheint es nach der

Entwicklung dieser erfolgreichen Route nun sinnvoll, bei Folgesynthesen maßgeschneidertes Edukt zu verwenden (siehe Kapitel 6).

5.2 EIGENSCHAFTEN 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN

Der rosa-graue Feststoff 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin ist thermostabil sowie oxidationsstabil an Luft, wie die Reaktionsbedingungen und die Gewinnung von Kristallen zeigten. Es ist anzunehmen, daß es sich in einer energetischen Mulde befindet, wobei die Aktivierungsenergie für deren Verlassen durch verlängerte Reaktionsbedingungen oder Lösung in Aceton erreicht werden. Das Molekül selbst besitzt im Kristall eine sterische Schmetterlingskonfiguration mit einer Abweichung von der Planarität in Höhe von $18,5^\circ$. Dies korreliert mit semi-empirischen Berechnungen, die $19,8^\circ$ *in vacuo* vorausgesagt hatten [155].

5.3 EROD-BIOASSAY

Der EROD-Bioassay zeigte, daß TCPT in TCDD-analoger Weise eine enzymatische Induktion im Testsystem bewirkt. Bei längeren Inkubationszeiten veränderte sich die Wirkung von TCPT; sie nahm mit zunehmender Inkubationszeit ab. Dies ist charakteristisch für nicht-persistente Induktoren, die ein Maximum an spezifischer *in vitro* EROD-Aktivität nach ca. 24 h Inkubationszeit aufweisen [246]. Zum Zeitpunkt der hier gemessenen Maximalinduktion (24 h) zeigte sich eine Wirkung von TCPT, die etwa 77 % der Maximalaktivität des TCDDs entspricht. Dabei verfügt TCPT über eine um den Faktor $10^{-2,6}$ geringere Potenz (0,25 %) von TCDD.

Da die ED_{50} aller Zeitpunkte von TCPT im selben Bereich lagen, kann ausgeschlossen werden, daß ein aktiver Metabolit während der Inkubation mit Hepatozyten gebildet wurde.

5.4 TOXIZITÄT

Die Untersuchung der akuten Letalität ist generell die erste Studie, die mit einer neuen Verbindung *in vivo* durchgeführt wird. Erstens gibt sie quantitativen Aufschluß über die akute Toxizität zum Vergleich mit anderen Verbindungen

(hier in Analogie zu TCDD). Zweitens zeigt sie die Symptome akuter Toxizität und drittens deren Reversibilität. Schließlich dienen die Ergebnisse als Basis zur Dosisauswahl für Folgestudien.

Die Bestimmung der LD₅₀ erfolgt normalerweise mit einer Einzeldosis und Beobachtung der Letalität über 14 Tage. Bei subchronischen Studien werden die Tiere in der Regel 90 Tage exponiert. Sie dienen der Bestimmung einer Dosisgrenze, bei der keine erkennbaren negativen Effekte mehr auftreten (NOAEL). Für die vorliegenden Toxizitätsstudien wurden die Tiere täglich mit dem Ziel der Letalitätsbestimmung dosiert. Die Mehrfachdosierung geschah aufgrund der kurzen Halbwertszeit von TCPT im Gegensatz zu TCDD, die schon vor den Kinetikstudien theoretisch herleitbar und von Literatur über Phenothiazine bekannt war: TCDD wird hauptsächlich unmetabolisiert durch Desquamation des Gastrointestinaltraktes ausgeschieden, es wird nur langsam eliminiert. Im Vergleich dazu bietet TCPT wesentlich reaktivere Zentren für Enzymaktivität, so z.B. Phase I-Metabolismus an den Heteroatomen (Oxidation) oder Phase II-Metabolismus am Amin. Für letzteren kommt besonders Glucuronidierung in Frage, die eine hohe Kapazität im Körper aufweist. Damit war sicher von einer schnellen Elimination von TCPT auszugehen, selbst wenn die Glucuronisationsprodukte enterohepatisch zyklisieren sollten. Um somit akute, letale Effekte einer Einzeldosis beobachten zu können, hätten außerordentlich hohe Mengen TCPT verabreicht werden müssen. Um zum persistenten TCDD analoge Ergebnisse zu erzielen, mußte das schnell eliminierte TCPT täglich dosiert werden.

Die akute perorale Toxizität in Meerschweinchen

$$p.o. LD_{50}(TCPT)=25-50 \text{ mg/kg/d}$$

verglichen mit $p.o. LD_{50}(TCDD)=2,1 \mu\text{g/kg}^{[95]}$

weist einen Unterschied mit Faktor $10^{-4,1}-10^{-4,4}$ (0,004-0,008 %) auf.

Dahingegen ergeben die Daten der intravenösen Toxizität in Ratten

$$i.v. LD_{50}(TCPT)=10-30 \text{ mg/kg}$$

verglichen mit $i.v. LD_{50}(TCDD)=45 \mu\text{g/kg}$ [95]

einen Faktor von $10^{-2,3}$ - $10^{-2,8}$ (0,15-0,45 %).

Symptom von TCPT- wie auch TCDD-Toxizität ist Gewichtsverlust, der bei nicht-letalen Dosen/Dosisraten nach Expositionsende reversibel sein kann.

Will man die *in vivo*-Toxizität einer Verbindung beurteilen, so geschieht dies am besten über Effekte nach intravenöser Dosierung. Hier wird die Variabilität durch Resorption ausgeschlossen, da 100 % der Dosis sicher den Organismus erreichen. Bei peroraler Dosierung spielt nicht nur Resorption, sondern auch vor allem der *first-pass*-Effekt (erste Leberpassage) eine große Rolle für die systemische Verfügbarkeit der untersuchten Verbindung. So ist auch die orale Bioverfügbarkeit von Chlorpromazin im Menschen niedrig (10,5-24,7 % [85] bzw. 32 ± 19 % [86]). Die Bioverfügbarkeit von Chlorpromazin variiert zwischen Individuen und weniger mit der Formulierung des Medikaments [247]. Verglichen mit Chlorpromazin ist die Bioverfügbarkeit von TCDD im Menschen mit >86 % [79] relativ hoch. Im Meer-schweinchen ist die Resorption von TCDD mit etwa 50 % wesentlich geringer [248].

Fazit

Die Differenz der *in vivo*-Potenz von TCPT und TCDD kann anhand der Daten aus intravenöser Dosierung auf $10^{-2,5}$ (0,32 %) veranschlagt werden. Dies korreliert auch bestmöglich mit dem Potenzunterschied von $10^{-2,6}$ (0,25 %), der bei den *in vitro*-Studien gefunden wurde. Somit wurde der Potenzunterschied in zwei verschiedenen Systemen mit unterschiedlichen Endpunkten unabhängig voneinander auf einen nahezu identischen Wert quantifiziert.

5.5 OVULATION

Die Wahl der Tierspezies war aufgrund technischer Kriterien auf Meerschweinchen gefallen. In Gegensatz zu 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin und dessen Sulfoxid, die eine bessere Löslichkeit aufweisen, und deren Effekte auf die Ovulation in Ratten bekannt sind [126], ist TCPT unlöslich in oral nicht schädigenden Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelmengen und mußte somit als Feststoff verabreicht werden. Die Dosierung von Ratten mittels Kapsel-Schlundsonde hätte deren Narkotisierung erfordert (siehe Kapitel 3.10.3.2), welche Auswirkungen auf den weiblichen Zyklus hat. Meerschweinchen hingegen konnten ohne Betäubung dosiert werden (siehe Kapitel 3.10.1.1). In der Literatur sind zwar speziesübergreifende reproduktive Effekte von TCDD beschrieben [98], doch die detaillierte Untersuchung des Einflusses auf den weiblichen Zyklus fand bisher nur in Ratten statt. Für TCDD sowie 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin und -sulfoxid konnte bei niedrigen Dosen eine Reduktion der Ovulationsrate und der Anzahl der Ova gefunden werden [109, 110, 126]. Im Gegensatz dazu zeigten mit TCPT dosierte Meerschweinchen nur Effekte im toxisch/letalen Dosisbereich. Die Einstellung der Ovulation unter diesen Bedingungen wird auf Einschränkung des Energiehaushalts zurückgeführt. Wie hochenergetisch der Eisprung ist, zeigte der regelmäßige Körpergewichtsverlust des Kontrolltieres zur Ovulation.

Fazit

Die beim weiblichen Zyklus in Meerschweinchen beobachteten Effekte werden somit nicht der direkten Wirkung von TCPT zugeschrieben.

5.6 KINETIK

Die ADS-Technologie hat gegenüber konventioneller Probenaufarbeitung entscheidende Vorteile. Diese beginnen schon bei der Proteinseparation. Bei Proteinfällungen z.B. mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure kommt es oft zu Co-Präzipitationen, die durch einen Verlust an Präzision und Empfindlichkeit eine schlechte Genauigkeit der Analytik bewirken. Festphasen-Extraktion (SPE) ist zeitintensiv,

wohingegen die online-Aufarbeitung sauber und schnell geht. Zwar wird für die Entwicklung der optimalen Bedingungen einige Zeit benötigt, und die Methode beansprucht etwas größere apparative Komplexität. Doch bei Bearbeitung eines großen Probenaufkommens stellt sie eine langfristige Zeitersparnis dar.

Bei dem Konzentrationsverlauf von TCPT im Serum über die Zeit wurde unabhängig von der Methode der Bestimmung ein Zwei-Kompartiment-Modell festgestellt. Es handelt sich um eine Verteilungsphase und eine Eliminationsphase aus dem zentralen Kompartiment (Formel 5-1).

$$C_p = C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t}$$

Formel 5-1:

Gleichung zum pharmakologischen Zwei-Kompartiment-Modell.

(C=Konzentration, k=Geschwindigkeitskonstante; t=Zeit; p, 1, 2=Plasma, Kompartiment 1, Kompartiment 2)

Die beiden Untersuchungsmodelle, computativ und klassisch, unterschieden sich zum Teil in den jeweils berechneten Halbwertszeiten (siehe Tabelle 4-2). Generell wurden zur klassischen Bestimmung der Eliminationsphase die letzten drei bzw. vier Datenpunkte der Konzentrationskurve verwendet. Zur Bestimmung der Eliminationsphase in Meerschweinchen wurden jedoch die Zeitpunkte zwischen 4-16 h zur Berechnung herangezogen, obwohl sich dadurch eine schlechtere Geradenangleichung ergab ($R^2=0,681$ (n=3, t=4, 8, 16 h)) vs. $R^2=0,922$ (n=4, t=8, 16, 24, 32 h)). Die Auswahl dieser Datenpunkte war analytisch bedingt, da die Meßwerte bei 24 und 32 h nur knapp oberhalb der Bestimmungsgrenze lagen und zudem deutliche Standardabweichungen aufwiesen. Somit stellte die angepaßte Datenregression aufgrund praktischer Überlegungen trotz niedrigeren Regressionskoeffizienten die realistischere Berechnung dar. Geringe analytische Variationen v.a. in der Eliminationsphase führen beim klassischen Modell bei unbedachter Auswahl der zu regressierenden Zeitpunkte leicht zu starken Auswirkungen auf die Berechnung der Halbwertszeit, da sich hieraus eine bedeutsame Veränderung der Kurvensteigung ergeben kann. Der computative Kurvenangleich hingegen gewichtet Abweichungen im niedrigen Konzentrationsbereich weniger, da er stark auf den

verlässlichen Werten höherer Konzentrationen basiert. Mit Angleichungsversuchen als Ein-, Zwei- oder Drei-Kompartiment-Modell konnte das richtige System anhand der Fehlerabweichungen gefunden werden.

Aufgrund der zu niedrigen Meßwerte nach peroraler Dosierung konnte eine angestrebte Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit von TCPT in Ratten nicht erfolgen. Es kann jedoch festgestellt werden, daß eine 6-fach höhere *p.o.* Dosis, verglichen mit *i.v.* 5 mg/kg TCPT, einen vergleichsweise sehr niedrigen Serumspiegel erzeugte. Die orale Bioverfügbarkeit kann somit im niedrigen Prozentbereich veranschlagt werden.

Die Untersuchung der einzelnen, mit *i.v.* 10 mg/kg TCPT dosierten Ratte entsprach nicht Optimalbedingungen, da es sich nur um ein Einzeltier handelte, welches zudem während der ersten 30 min der Studiendauer aufgrund der TCPT-Gabe starke toxische Effekte bis zur Bewußtlosigkeit zeigte.

Als sicherste Ergebnisse sind die Daten der mit *i.v.* 5 mg/kg TCPT dosierten Ratten und der mit *i.v.* 10 mg/kg TCPT dosierten Meerschweinchen anzusehen, da hier computative und klassische Berechnung übereinstimmende Ergebnisse lieferten.

Tetrachlorphenothiazin wird schnell im Organismus verteilt und auch, erwartungsgemäß, relativ schnell wieder eliminiert. Die Eliminationshalbwertszeit in Ratten beträgt 5,42 h verglichen mit einer Halbwertszeit von 11 Tagen für TCDD [82]. Dies entspricht einer 49-fach schnelleren Elimination. In Meerschweinchen wurde die Eliminationshalbwertszeit von TCPT mit 2,71 h als wesentlich kürzer als in Ratten bestimmt, obwohl sie für TCDD mit etwa 30 Tagen [81] wesentlich länger als in Ratten ist.

Anhand der von Ratten erhaltenen Halbwertszeit kann eine erste Vorhersage der Halbwertszeit im Menschen erfolgen. Hierzu gibt es zwei Möglichkeiten: Erstens der direkte Vergleich mit einem bekannten Phenothiazin, z.B. Chlorpromazin. Dessen Halbwertszeit in der Ratte beträgt 9,1 h [87], im Menschen beläuft sie sich auf 30 ± 7 h [86]. Dieses Verhältnis direkt auf TCPT übertragen ergäbe eine Halbwertszeit im Menschen von 18 ± 4 h. Die zweite Möglichkeit ist die Verwendung einer in der

Literatur beschrieben empirischen Formel, die auf 50 verschiedenen Xenobiotika basierend entwickelt wurde [249]. Sie steht auch in sehr guter Korrelation zu den Halbwertszeiten von PCDDs [80] (siehe Formel 5-2). Mit dieser ist eine Eliminationshalbwertszeit von TCPT im Menschen bei 58 h berechnet.

$$\log t_{1/2(\text{Elim}),\text{M}} = 1,34 \log t_{1/2(\text{Elim}),\text{R}} + 1,25$$

Formel 5-2:

Empirische Formel zur Berechnung der Eliminationshalbwertszeit im Menschen.

$t_{1/2(\text{Elim}),\text{M}}$ = Zu berechnende Eliminationshalbwertszeit im Menschen (Tage),

$t_{1/2(\text{Elim}),\text{R}}$ = In Ratten gemessene Eliminationshalbwertszeit (Tage).

Aufgrund des höheren Chlorierungsgrades von TCPT verglichen mit Chlorpromazin könnte eine leicht höhere Persistenz erwartet werden. Jedoch erlaubt das freie N-H eine schnellere Metabolisierung, so daß die Halbwertszeit von TCPT kürzer als die des Chlorpromazins ist. Die Halbwertszeit von TCPT im Menschen wird anhand des direkten Vergleichs innerhalb der eigenen Substanzklasse aufgrund der somit ähnlicheren physiko-chemischen Eigenschaften näher an dem mit Chlorpromazin berechneten Wert vermutet.

5.7 FAZIT: 2,3,7,8-TETRACHLORPHENOTHIAZIN ALS DIOXIN-ANALOGON

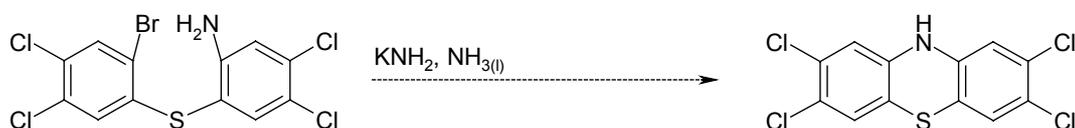
Mit der Synthese von TCPT konnte ein neuartiges, strukturelles Analogon zu TCDD entwickelt werden. Die Strukturen beider Verbindungen sind sich sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in der durch die verschiedenen Heteroatome bedingten Molekülgeometrie. Im Gegensatz zum planaren TCDD ist TCPT leicht gewinkelt. Anhand von Untersuchungen der Enzyminduktion sowie Letalität weist TCPT *in vitro* und *in vivo* eine Potenz auf, die, beim Erreichen analoger Endpunkte, um $10^{-2,6}$ bzw. $10^{-2,5}$ unter der von TCDD liegt. Keine Analogie konnte bei der Untersuchung reproduktiver Effekte gefunden werden. Strukturell bedingt wird TCPT schneller eliminiert und ist in geringerem Maße oral bioverfügbar als TCDD. Es ist gelungen, die kinetisch nachteiligen Eigenschaften des TCDDs in einem strukturellen Analogon geringerer Potenz bezüglich Letalität und Enzym-Induktion kinetisch vorteilhaft anzupassen.

Da auch die Einführung einer zusätzlichen Abgangsgruppe am Amin in klassischen Synthesepublikationen als ausbeuteerhöhender Faktor beschrieben wurde (siehe Kapitel 4.1.4), ist dieser Weg evtl. für das bromierte N-Formamid möglich, wobei wiederum eine Ausbeuteerhöhung denkbar sein kann. So ist die Durchführbarkeit weiterer über das Chlorid erfolgloser Synthesewege denkbar, doch wurde durch das Screening, welches falsch-positive Aussagen ausschließt, schon ein sicher auch über das Bromid durchführbarer Zugang zu TCPT gefunden

Sollte sich TCPT in weiteren Studien als gutes TCDD-Substitut erweisen, so kann eine Untersuchung weiterer Synthesemöglichkeiten zur Ausbeuteerhöhung sinnvoll werden. Als Alternative zur Ullmann-Kupplung über das Bromid zählt die Zyklisierung zwischen Amin und Bromsubstituent mit Kaliumamid in flüssigem Ammoniak, die nur für Bromid als Abgangsgruppe beschrieben wurde^[250] (Gleichung 6-1).

Gleichung 6-1:

Ausblick: Mögliche Zyklisierung eines bromierten Eduktes.



6.2 TOXIKOLOGISCHE STUDIEN

Die hier ermittelten Halbwertszeiten sind aufgrund geringer Tierzahlen statistisch limitiert abgesichert. Daher bietet sich bei Verfügbarkeit geeigneter Mengen an TCPT eine größere Kinetik-Studie (5 Tiere/Dosisgruppe) mit subtoxischen und toxischen Dosen an, bei der auch eine höhere perorale Dosis genaueren Aufschluß über die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung geben kann. Die hier nur ungefähr bestimmten LD_{50} -Werte können ebenfalls mit Dosisgruppen geeigneter Größe statistisch abgesichert werden. Unter Verwendung isopenmarkierten TCPTs können auch pharmako-/toxikokinetische Untersuchungen durchgeführt werden, die genauere Einblicke in die Verteilung von TCPT im Körper sowie der Eliminationswege erlauben.

Neben der bereits durchgeführten Bestimmung der *in vitro*-EROD-Aktivität bietet sich auch die *in vivo*-Untersuchung dieser Enzyminduktion zum Vergleich der Wirkung von TCPT mit TCDD an, da sie einen kontroversen Aspekt in der Diskussion um den Mechanismus der Dioxin-Toxizität darstellt. Hierbei können auch Northern- und Western-Blots sowie quantitative PCR-Techniken wichtige Erkenntnisse über die zellulären Vorgänge liefern.

Des Weiteren sind basierend auf den in dieser Arbeit erlangten Kenntnissen der Eliminationshalbwertszeiten in Ratte und Meerschweinchen *steady-state*-Studien möglich, bei denen die Konzentration der Verbindung im Tier durch Anpassung der Dosierungsintervalle konstant bleibt. So wird die Fluktuation zwischen Wirkung der Substanz auf das Tier und Erholung des Tieres nach Eliminierung dieser minimiert und optimale Untersuchungsbedingungen ermöglicht. Unter *steady-state*-Bedingungen kann TCPT als Ovulationshemmer trotz in Meerschweinchen nicht direkt korrelierbarer Effekte auch in Ratten untersucht werden. Da die *i.v.* LD₅₀ für Ratten im Löslichkeitsbereich von TCPT in Aceton liegt, können signifikant niedrigere Dosen in physiologisch verträglichen Acetonvolumina intravenös verabreicht werden. Der Effekt des Stresses täglicher *i.v.* Dosierungen in die Schwanzvene könnten sich auf die Ovulation auswirken, so daß die Dosierung über eine kanülierte Drosselvene oder mittels implantierter Pumpe als sinnvollste Applikationsformen erscheinen. Neben Ovulations-Studien sind auch Untersuchungen weiterer reproduktiver Effekte zur Abschätzung von TCPT bezüglich seines Gefahrenpotentials als TCDD-Analogon nötig. Darüber hinaus können Zelltests Aufschluß über weitere Gefahrenpotentiale der neuen Verbindung, z.B. mögliche Mutagenität (Ames-Test), geben.

Als erste Untersuchung möglicher TCDD-analoger hormetischer Effekte von TCPT sollte die Bestimmung seiner Wirkung auf das Immunsystem durchgeführt werden. Hierfür stehen vergleichsweise einfache *in vivo* und *in vitro* Methoden zur Verfügung [142, 144]. Die Erforschung möglicher krebs-präventativer Effekte von TCPT kann im Gegensatz dazu nur in Langzeitstudien (Lebensdauer der Tiere) erfolgen, bei denen die Tiere unter chronischer Exposition in verschiedenen Dosisgruppen

auch histo-pathologisch untersucht werden. Hierzu sind jedoch große Mengen an Substanz nötig.

Die vorliegende Arbeit hat die Grundlagen für weitere Studien geschaffen. In erster Linie sind weiterführende kinetische Untersuchungen an der neuen Substanz zur genaueren Bestimmung ihrer Verteilung, Eigenschaften und Zielorgane erforderlich. Ausgiebigere Analogie-Studien zu TCDD werden eine exaktere Einschätzung der Analogie der Verbindungen ermöglichen. Studien zu hormetischen Effekten von TCPT werden auch im Hinblick auf die Entwicklung potentieller Pharmazeutika angestrebt.

Zur Untersuchung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin (TCPT) als Dioxin-Analogon wurde diese Verbindung erstmalig synthetisiert. Es folgte die chemische, toxikologische und kinetische Erstbeschreibung bis zur Bioproben-Analytik.

Nachdem sich zahlreiche zum Teil für Phenothiazine historisch bedeutsame Reaktionswege und -bedingungen als ungängig erwiesen hatten, konnte TCPT in drei Stufen über eine intramolekulare Ullmann-Kupplung des betreffenden Diarylsulfids in geringer Ausbeute hergestellt werden. Die Identität und Konformation des TCPTs konnten neben spektroskopischen und spektrometrischen Methoden auch zweifelsfrei mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden. Die Verbindung erwies sich als ein um $18,5^\circ$ von der Planarität abweichendes, schmetterlingsähnlich auf Achse der Heteroatome gewinkeltes Molekül und unterschied sich somit sterisch leicht von den planaren Dioxin-Strukturen.

Erste Untersuchungen der Enzyminduktion *in vitro* und der Letalität in Meerschweinchen (*p.o.*) zeigten zu 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) analoge Effekte. Dahingegen konnten keine direkten anti-ovulativen Effekte von TCPT in Meerschweinchen gefunden werden.

Die Potenz von TCPT unterschied sich bzgl. EROD-Aktivität *in vitro* wie auch bzgl. Letalität in Ratten (*i.v.*) unabhängig voneinander und unter Beobachtung verschiedener Endpunkte um etwa den Faktor $10^{-2,6}$ (0,25 %) von der des TCDDs.

Die Kinetik von TCPT im Serum wurde in Ratten und Meerschweinchen bestimmt, wobei eine Methode der in HPLC-Analytik integrierten online-Bioproben-Aufarbeitung angewandt wurde. Die gemessenen Eliminationshalbwertszeiten in Ratten (5,42 h) und Meerschweinchen (2,71 h) lagen erwartungsgemäß weit unterhalb derer von TCDD (11,1 ^[82] bzw. 30,2 Tage ^[81]).

In mehrfacher Hinsicht konnten bei TCPT dioxinanaloge Eigenschaften wiedergefunden werden. Jedoch zeigten einige Ergebnisse auch die Einflüsse der strukturellen Unterschiede, so daß durch einzelne Experimente eine generelle Analogie in Frage gestellt wird.

A first-time synthesis of 2,3,7,8-tetrachlorophenothiazine (TCPT) was performed for the investigation of its properties as a dioxin-analogue. The chemical characterization of the hitherto unknown compound, an initial estimate of its toxicity and kinetics in serum as well as analytics in bio-samples were also conducted.

After the application of multiple historically important syntheses had failed, the compound was synthesized in low yield by an intra-molecular Ullmann-coupling of the corresponding diarylamine. The successful synthesis was accomplished in three-step process. In addition to spectroscopic and spectrometric methods, the identity and conformation of TCPT were definitively confirmed by the resolution of the crystal structure. It was revealed that the molecule has a butterfly shape, folded along the heteroatom axis. Thus, its deviation from planarity (by 18.5 °) sterically distinguishes it slightly from the strictly planar dioxins.

Initial studies on enzyme-induction *in vitro* and lethality in guinea pigs (*p.o.*) showed the dioxin-like effects of TCPT. However, no direct effects on the reproductive system of the female guinea pig were found.

EROD-activity *in vitro* and lethality in rats (*i.v.*), representing different endpoints in independent systems, were determined. The results showed a 10^{-2.6} times lower (0.25 %) potency of TCPT as compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).

Serum-kinetics were assayed in the rat and guinea pig by the application of HPLC analysis of bio-samples with integrated online sample processing. As expected, the elimination half-life of TCPT with 5.42 h in the rat and 2.71 h in the guinea pig proved that TCPT was far less persistent than TCDD (11.1 ^[82] and 30.2 ^[81] days, respectively).

In several instances, an analogy between TCPT and TCDD could be found. However, other results showed the effects of the difference in structure, leading to findings in TCPT that question a general analogy.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström (1 Å=0,1 nm)
ADS	Alkyl-Diol-Silica
AhR	aryl hydrocarbon receptor (Ah-Rezeptor)
anhyd	wasserfrei
arnt	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BSA	bovine serum albumin
concd	konzentriert
COSY	correlation spectroscopy
CYP	Zytochrom P450
δ	chemische Verschiebung zu tiefem Feld von Tetramethylsilan
d	Tag(e); Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
Diglyme	Diethylenglykoldimethylester
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED ₅₀	Dosis zum Erreichen von 50 % des Maximizeffekts
eq	Äquivalent(e)
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
GC	Gaschromatographie (-Gerät)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
hPa	Hektopascal
HPLC	high-performance liquid chromatography
ID	Innendurchmesser
iu	internationale Einheit für Heparin
<i>i.v.</i>	intravenös
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K _{ow}	<i>n</i> -Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
Kat.	Katalysator

KPG	Kern-präzisionsgeschliffen
LD ₅₀	für 50 % der Versuchstiere letale Dosis
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
m	Multipllett
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MPLC	medium-pressure liquid chromatography
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl Datenpunkte
NMR	nuclear magnetic resonance
NOAEL	no observable adverse effect level (Dosis ohne erkennbare negative Wirkung)
NOEL	no observable effect level (Dosis ohne erkennbare Wirkung)
OCDD	Octachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
OD	Außendurchmesser
ODS	Octadecyl-Silica
PCDD	polychloriertes Dibenzo- <i>p</i> -dioxin
PCDF	polychloriertes Dibenzofuran
PCR	polymerase chain reaction
<i>p.o.</i>	peroral
ppm	parts per million (10 ⁻⁶)
R ²	Regressionskoeffizient
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor
RAM	restricted access material
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SD	Standardabweichung
Sdp	Siedepunkt
sec	Sekunden
Smp	Schmelzpunkt
SPE	solid phase extraction
<i>t</i>	Zeitpunkt(e)

$t_{1/2}(\text{Elim})$	Eliminationshalbwertszeit
$t_{1/2}(\text{Resop})$	Resorptionshalbwertszeit
$t_{1/2}(\text{Vert})$	Verteilungshalbwertszeit
t_A	Zeitpunkt des ersten Analytendurchbruchs
t_M	Zeitpunkt der vollständigen Matrixeluierung
t_R	Retentionszeit
t_T	Dauer des Analyttransfers
t_{V1}	Zeitpunkt der ersten Ventil-Schaltung
t_{V2}	Zeitpunkt der zweiten Ventil-Schaltung
TBME	<i>tert.</i> -Butyl-methylether
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCPT	2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin
TEF	toxicity equivalence factor(s)
TEQ	toxic equivalent
THF	Tetrahydrofuran
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
UV/VIS	ultraviolett/visible
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/w	Gewicht pro Gewichtseinheit
2-D	zweidimensional
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure
∅	Durchmesser

Chemikalienhersteller:

- ① Acros Organics, Fair Lawn, New Jersey, USA
- ② Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA
- ③ Airgas Inc., Radnor, Pennsylvania, USA
- ④ Fisher Scientific Company Inc., Fair Lawn, New Jersey, USA
- ⑤ Lancaster Inc., Pelham, New Hampshire, USA
- ⑥ AAPER Alcohol and Chemical Company, Shelbyville, Kentucky, USA
- ⑦ MCB Manuf. Chem. Incorporated, Cincinnati, Ohio, USA
- ⑧ Aufbereitungsanlage der University of Kansas, USA

10.1 ORIGINAL-DATENSATZ ZUR EINKRISTALL-RÖNTGENSTRUKTURANALYSE

Crystal data and structure refinement

Empirical formula	C ₁₂ H ₅ Cl ₄ N S
Formula weight	337.03
Crystal system	Orthorhombic
Space group	<i>Pna21</i>
Unit cell dimensions	a = 20.7356(18) Å α = 90° b = 15.4686(13) Å β = 90° c = 3.7921(3) Å γ = 90°
Volume	1216.32(18) Å ³
Z, Z'	4, 1
Density (calculated)	1.840 Mg/m ³
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
F(000)	672
Absorption coefficient	1.120 mm ⁻¹
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.9158 and 0.6567
Theta range for data collection	1.96 to 25.99°
Reflections collected	6689
Independent reflections	2155 (R(int) = 0.0233)
Data / restraints / parameters	2155 / 1 / 163
ωR(F2 all data)	ωR2 = 0.0764
R(F obsd data)	R1 = 0.0284
Goodness-of-fit on F2	1.065
Observed data (I > 2σ(I))	2122
Absolute structure parameter	0.01(7)
Largest and mean shift / s.u.	0.001 and 0.000
Largest diff. peak and hole	0.521 and -0.225 e/Å ³

$$\omega R2 = \{ \Sigma [\omega(F_o^2 - F_c^2)^2] / \Sigma [\omega(F_o^2)^2] \}^{1/2}$$

$$R1 = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$$

Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters.

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	0.57689(11)	0.77389(15)	0.5877(7)	0.0177(5)
C(2)	0.51286(11)	0.79932(14)	0.5582(7)	0.0176(5)
Cl(2)	0.49186(3)	0.90198(4)	0.69331(19)	0.02254(16)
C(3)	0.46771(10)	0.74260(16)	0.4228(7)	0.0166(5)
Cl(3)	0.38742(2)	0.77147(4)	0.37295(18)	0.02273(16)
C(4)	0.48659(10)	0.66019(15)	0.3198(7)	0.0165(5)
S(5)	0.57261(2)	0.53227(4)	0.17962(18)	0.01547(15)
C(6)	0.67314(10)	0.43390(15)	0.4049(7)	0.0156(5)
C(7)	0.73396(10)	0.42031(15)	0.5383(7)	0.0175(5)
Cl(7)	0.76302(3)	0.31494(4)	0.56922(17)	0.02295(17)
C(8)	0.77122(10)	0.48909(16)	0.6544(7)	0.0185(5)
Cl(8)	0.84820(3)	0.47391(4)	0.8203(2)	0.02428(17)
C(9)	0.74672(10)	0.57235(16)	0.6416(7)	0.0186(5)
N(10)	0.66198(8)	0.67132(13)	0.4891(7)	0.0202(5)
C(11)	0.59645(11)	0.69274(15)	0.4762(7)	0.0167(5)
C(12)	0.55039(9)	0.63482(14)	0.3440(6)	0.0142(4)
C(13)	0.64829(10)	0.51734(14)	0.3841(7)	0.0150(5)
C(14)	0.68528(10)	0.58688(15)	0.5071(7)	0.0157(5)

Bond lengths [Å] and angles [°]

C(1)-C(11)	1.385(3)	C(3)-Cl(3)	1.734(2)
C(1)-C(2)	1.389(3)	C(4)-C(12)	1.383(3)
C(1)-H(1)	0.9500	C(4)-H(4)	0.9500
C(2)-C(3)	1.382(3)	S(5)-C(12)	1.765(2)
C(2)-Cl(2)	1.725(2)	S(5)-C(13)	1.766(2)
C(3)-C(4)	1.390(3)	C(6)-C(7)	1.375(3)

C(6)-C(13)	1.392(3)	C(7)-C(6)-H(6)	119.9
C(6)-H(6)	0.9500	C(13)-C(6)-H(6)	119.9
C(7)-C(8)	1.386(3)	C(6)-C(7)-C(8)	120.7(2)
C(7)-Cl(7)	1.742(2)	C(6)-C(7)-Cl(7)	119.02(19)
C(8)-C(9)	1.385(3)	C(8)-C(7)-Cl(7)	120.26(17)
C(8)-Cl(8)	1.732(2)	C(9)-C(8)-C(7)	119.9(2)
C(9)-C(14)	1.391(3)	C(9)-C(8)-Cl(8)	118.46(18)
C(9)-H(9)	0.9500	C(7)-C(8)-Cl(8)	121.66(18)
N(10)-C(14)	1.394(3)	C(8)-C(9)-C(14)	119.9(2)
N(10)-C(11)	1.400(3)	C(8)-C(9)-H(9)	120.0
N(10)-H(10)	0.9499	C(14)-C(9)-H(9)	120.0
C(11)-C(12)	1.402(3)	C(14)-N(10)-C(11)	124.05(19)
C(13)-C(14)	1.401(3)	C(14)-N(10)-H(10)	109.1
C(11)-C(1)-C(2)	120.8(2)	C(11)-N(10)-H(10)	116.0
C(11)-C(1)-H(1)	119.6	C(1)-C(11)-N(10)	119.2(2)
C(2)-C(1)-H(1)	119.6	C(1)-C(11)-C(12)	119.3(2)
C(3)-C(2)-C(1)	119.8(2)	N(10)-C(11)-C(12)	121.5(2)
C(3)-C(2)-Cl(2)	121.60(18)	C(4)-C(12)-C(11)	119.6(2)
C(1)-C(2)-Cl(2)	118.56(18)	C(4)-C(12)-S(5)	118.76(17)
C(2)-C(3)-C(4)	119.7(2)	C(11)-C(12)-S(5)	121.51(16)
C(2)-C(3)-Cl(3)	121.83(18)	C(6)-C(13)-C(14)	119.4(2)
C(4)-C(3)-Cl(3)	118.43(18)	C(6)-C(13)-S(5)	118.38(17)
C(12)-C(4)-C(3)	120.7(2)	C(14)-C(13)-S(5)	122.16(17)
C(12)-C(4)-H(4)	119.6	C(9)-C(14)-N(10)	119.1(2)
C(3)-C(4)-H(4)	119.6	C(9)-C(14)-C(13)	120.0(2)
C(12)-S(5)-C(13)	101.22(11)	N(10)-C(14)-C(13)	120.9(2)
C(7)-C(6)-C(13)	120.1(2)		

Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$)

The anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$2\pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(1)	23(1)	16(1)	14(1)	-2(1)	-1(1)	-3(1)
C(2)	28(1)	11(1)	14(1)	2(1)	3(1)	3(1)
Cl(2)	31(1)	14(1)	23(1)	-2(1)	1(1)	4(1)
C(3)	18(1)	20(1)	12(1)	4(1)	2(1)	3(1)
Cl(3)	20(1)	22(1)	25(1)	0(1)	-1(1)	5(1)
C(4)	21(1)	17(1)	12(1)	4(1)	0(1)	-3(1)
S(5)	19(1)	14(1)	14(1)	-3(1)	-1(1)	1(1)
C(6)	19(1)	16(1)	11(1)	-1(1)	5(1)	-3(1)
C(7)	23(1)	14(1)	16(1)	2(1)	5(1)	5(1)
Cl(7)	24(1)	18(1)	27(1)	2(1)	3(1)	7(1)
C(8)	16(1)	24(1)	16(1)	2(1)	2(1)	1(1)
Cl(8)	17(1)	29(1)	28(1)	4(1)	-1(1)	2(1)
C(9)	19(1)	21(1)	16(1)	1(1)	0(1)	-4(1)
N(10)	18(1)	15(1)	27(1)	-2(1)	-2(1)	-4(1)
C(11)	23(1)	15(1)	13(1)	5(1)	1(1)	0(1)
C(12)	21(1)	12(1)	10(1)	3(1)	2(1)	2(1)
C(13)	17(1)	18(1)	10(1)	2(1)	2(1)	-1(1)
C(14)	19(1)	16(1)	12(1)	2(1)	2(1)	-2(1)

Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters

	x	y	z	U(eq)
H(1)	0.6076	0.8126	0.6854	0.021
H(4)	0.4553	0.6208	0.2317	0.020
H(6)	0.6480	0.3862	0.3267	0.019
H(9)	0.7719	0.6195	0.7246	0.022
H(10)	0.6883	0.7077	0.6305	0.024

Torsion angles [°]

C(11)-C(1)-C(2)-C(3)	1.3(4)	C(3)-C(4)-C(12)-C(11)	0.4(4)
C(11)-C(1)-C(2)-Cl(2)	-178.7(2)	C(3)-C(4)-C(12)-S(5)	-175.44(19)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	0.6(4)	C(1)-C(11)-C(12)-C(4)	1.4(4)
Cl(2)-C(2)-C(3)-C(4)	-179.46(19)	N(10)-C(11)-C(12)-C(4)	-176.8(2)
C(1)-C(2)-C(3)-Cl(3)	-178.9(2)	C(1)-C(11)-C(12)-S(5)	177.2(2)
Cl(2)-C(2)-C(3)-Cl(3)	1.1(3)	N(10)-C(11)-C(12)-S(5)	-1.0(3)
C(2)-C(3)-C(4)-C(12)	-1.4(4)	C(13)-S(5)-C(12)-C(4)	-163.1(2)
Cl(3)-C(3)-C(4)-C(12)	178.0(2)	C(13)-S(5)-C(12)-C(11)	21.1(2)
C(13)-C(6)-C(7)-C(8)	0.2(4)	C(7)-C(6)-C(13)-C(14)	-1.3(4)
C(13)-C(6)-C(7)-Cl(7)	178.69(19)	C(7)-C(6)-C(13)-S(5)	175.2(2)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	1.1(4)	C(12)-S(5)-C(13)-C(6)	161.3(2)
Cl(7)-C(7)-C(8)-C(9)	-177.5(2)	C(12)-S(5)-C(13)-C(14)	-22.3(2)
C(6)-C(7)-C(8)-Cl(8)	-179.5(2)	C(8)-C(9)-C(14)-N(10)	-178.6(2)
Cl(7)-C(7)-C(8)-Cl(8)	2.0(3)	C(8)-C(9)-C(14)-C(13)	-0.1(4)
C(7)-C(8)-C(9)-C(14)	-1.1(4)	C(11)-N(10)-C(14)-C(9)	-157.4(3)
Cl(8)-C(8)-C(9)-C(14)	179.5(2)	C(11)-N(10)-C(14)-C(13)	24.2(4)
C(2)-C(1)-C(11)-N(10)	176.0(2)	C(6)-C(13)-C(14)-C(9)	1.3(4)
C(2)-C(1)-C(11)-C(12)	-2.3(4)	S(5)-C(13)-C(14)-C(9)	-175.0(2)
C(14)-N(10)-C(11)-C(1)	156.3(3)	C(6)-C(13)-C(14)-N(10)	179.8(2)
C(14)-N(10)-C(11)-C(12)	-25.5(4)	S(5)-C(13)-C(14)-N(10)	3.4(3)

Hydrogen bonds (Å and °)

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(10)-H(10)	Cl(7)#1	0.95	2.56	3.492(2) 168.0

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x+3/2, y+1/2, z+1/2

10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Strukturformeln von unsubstituiertem Dioxin (1) und Phenothiazin (2).....	1
Abbildung 1-2: Atomnummerierung. Polychloriertes Dibenzo- <i>p</i> -dioxin (3) und polychloriertes Dibenzofuran (4).....	2
Abbildung 1-3: Atomnummerierung. Phenothiazin (5).....	3
Abbildung 1-4: Die drei Klassen medizinischer Phenothiazine: Aliphatische Seitenkette (6) (Promazin), Piperidyl Seitenkette (7) (Periciazin), Piperazinyl Seitenkette (8) (Perphenazin).....	3
Abbildung 1-5: Hauptbestandteile von Agent Orange: 2,4-D (9) und 2,4,5-T (10).....	6
Abbildung 1-6: Methylenblau (11), das erste synthetisch hergestellte Phenothiazin.....	7
Abbildung 1-7: Chlorpromazin (12), prominentestes Phenothiazin.....	8
Abbildung 2-1: Strukturformeln von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin (12) und 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin (13).....	27
Abbildung 3-1: Utensilien und Gelatine-Kapseln zur peroralen Dosierung.....	63
Abbildung 3-2: Dosierung eines Meerschweinchens mit einer Gelatine-Kapsel.....	64
Abbildung 3-3: Dosierung einer Ratte mit Gelatine-Kapsel.....	67
Abbildung 3-4: Struktur und Aufbau von Alkyl-Diol-Silica.....	69
Abbildung 3-5: Schaltplan der HPLC-Anlage zur Anwendung der ADS-Technologie.....	70
Abbildung 4-1: Einmalige Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung zu Reaktionsbeginn, Zeitverlauf 24-120 h.....	111
Abbildung 4-2: Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung in Zweitages Intervallen, Zeitverlauf 24-120 h.....	112
Abbildung 4-3: Tägliche Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung, Zeitverlauf 24-120 h.....	113
Abbildung 4-4: Relativer Gehalt von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Rohprodukt unter Variation der Katalysatorenzugabe.....	114

Abbildung 4-5: Einmalige Zugabe von Katalysatoren zur Ullmann-Kupplung zu Reaktionsbeginn, Zeitverlauf 0:05-26:30 h.	115
Abbildung 4-6: Zeitlicher Verlauf des Verhältnisses von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin zum Edukt nach einmaliger Katalysatoren-Zugabe zu Reaktionsbeginn, bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.	115
Abbildung 4-7: Isotopenmuster von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Massenspektrum.	120
Abbildung 4-8: UV/VIS-Spektren von Phenothiazin und chlorierten Derivaten in Methanol.	121
Abbildung 4-9: Kristallstruktur eines Einzelmoleküls 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.	123
Abbildung 4-10: Kristallstruktur von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.	123
Abbildung 4-11: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von TCPT und TCDD im EROD-Bioassay.	124
Abbildung 4-12: HPLC-Spektrum einer Messung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Serum.	128
Abbildung 4-13: Kinetik Ratte, <i>i.v.</i> 5 mg/kg TCPT, computativer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	130
Abbildung 4-14: Kinetik Ratte, <i>i.v.</i> 5 mg/kg TCPT, klassischer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	131
Abbildung 4-15: Kinetik Ratte, <i>i.v.</i> 10 mg/kg TCPT, computativer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	132
Abbildung 4-16: Kinetik Ratte, <i>i.v.</i> 10 mg/kg TCPT, klassischer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	133
Abbildung 4-17: Kinetik Meerschweinchen, <i>i.v.</i> 10 mg/kg TCPT, computativer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	134
Abbildung 4-18: Kinetik Meerschweinchen, <i>i.v.</i> 10 mg/kg TCPT, klassischer Kurvenangleich, Zwei-Kompartiment-Modell, Serum.	135
Abbildung 4-19: Kinetik Ratte, <i>p.o.</i> 30 mg/kg TCPT, Datenpunkte, Serum.	136

10.3 FORMELVERZEICHNIS

Formel 5-1: Gleichung zum pharmakologischen Zwei-Kompartiment-Modell.	147
Formel 5-2: Empirische Formel zur Berechnung der Eliminations- halbwertszeit im Menschen.	149

10.4 GLEICHUNGENVERZEICHNIS

Gleichung 4-1: Direkte Chlorierung von Phenothiazin in Gegenwart von Perchlorsäure.	78
Gleichung 4-2: Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel.	81
Gleichung 4-3: Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,4-Dichloranilin und 3,4-Dichlorphenol bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.	82
Gleichung 4-4: Untersuchte N-Formylierung von Phenothiazin durch Ameisensäure.	83
Gleichung 4-5: Untersuchte N-Acetylierung von Phenothiazin durch Acetylchlorid.	85
Gleichung 4-6: Bildung des Diarylamins aus 3,4-Dichloranilin und 1-Brom-3,4-dichlorbenzol durch basische Schmelze mit Katalysator.	86
Gleichung 4-7: Untersuchte zyklisierende Dehydrierung von 3,3',4,4'-Tetrachlor- diphenylamin bei Einbau von Schwefel in Gegenwart eines Katalysators.	88
Gleichung 4-8: Bildung des Diarylsulfids aus 2,4,5-Trichlor-thiophenol und 1,2-Dichlor-4-fluor-5-nitrobenzol in basischer Suspension.	89
Gleichung 4-9: Untersuchte Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro- diphenylsulfid durch Triethylphosphit.	90
Gleichung 4-10: Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Zinn(II)chlorid.	93
Gleichung 4-11: Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch elementaren Wasserstoff.	95
Gleichung 4-12: Reduktion von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch <i>in situ</i> generierten Wasserstoff.	96

Gleichung 4-13: Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermische Elimination von Chlorwasserstoff.	97
Gleichung 4-14: Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch thermochemische Elimination von Chlorwasserstoff.	98
Gleichung 4-15: Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Heck-Reaktion.	99
Gleichung 4-16: Untersuchte Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Iod.	101
Gleichung 4-17: Zyklisierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung mit Kupfer und Kupfer(I)iodid.	102
Gleichung 4-18: Formylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Ameisensäure.	105
Gleichung 4-19: Untersuchte Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-formamido-diphenylsulfid durch Ullmann-Kupplung.	106
Gleichung 4-20: Untersuchte Acetylierung von 6'-Amino-2,3',4,4',5-pentachlor-diphenylsulfid durch Acetylchlorid.	107
Gleichung 5-1: Alternative Reaktionsbedingungen zur Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit Lithiumborhydrid.	139
Gleichung 5-2: Alternative Reaktionsbedingungen zur Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit Samarium(0).	139
Gleichung 5-3: Alternative Zyklisierung in Imipramin-Analogie.	141
Gleichung 5-4: Alternative Synthesestrategie aus der Diazophenothiazin-Chemie.	141
Gleichung 6-1: Ausblick: Mögliche Zyklisierung eines bromierten Eduktes.	151

10.5 SCHEMATAVERZEICHNIS

Schema 1-1: Chemische Bildung von TCDD in Lösung als Nebenprodukt bei der Synthese von 2,4,5-T.	9
Schema 1-2: Synthesewege zum Phenothiazingerüst. a) Über das Diarylamin, b) über den Diarylthioether, c) einstufig mit doppelter Bindungsbildung.	11

Schema 3-1: Untersuchte Strategien zur erstmaligen Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.	30
Schema 3-2: Für die Herstellung von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Gramm-Maßstab ausgewählte, dreistufige Synthese.	53
Schema 4-1: Smiles-Umlagerung bei der Zyklisierung von 2,3',4,4',5-Pentachlor-6'-nitro-diphenylsulfid durch Triethylphosphit.....	91
Schema 4-2: Untersuchte Strategien zur erstmaligen Synthese von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin, Experimentalansätze.....	109
Schema 4-3: Syntheseweg zu 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin im Gramm-Maßstab.....	118
Schema 5-1: Alternative Synthesestrategie über die Thermo-/Photolyse eines Azids.	142
Schema 6-1: Ausblick: Mögliche Synthese von TCPT über selbstsynthetisiertes Edukt.....	150

10.6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Toxizitäts-Äquivalent Faktoren für PCDDs und PCDFs nach NATO ^[88] und WHO ^[89]	18
Tabelle 4-1: Elementaranalysen verschiedener Einzelproben von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin.	122
Tabelle 4-2: Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten von 2,3,7,8-Tetrachlorphenothiazin in Serum von Ratte und Meerschweinchen.	135

10.7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] V. Merz, W. Weith. *Zur Kenntnis des Perchlorphenols*. Ber. dtsh. chem. Ges. **1872**, 5, 458-463.
- [2] W. Sandermann, H. Stockmann, R. Casten. *Über die Pyrolyse des Pentachlorphenols*. Chem. Ber. **1957**, 90, 690-692.
- [3] O. Unger, K. A. Hofmann. *Zur Kenntnis des Thiodiphenylamins*. Ber. dtsh. chem. Ges. **1896**, II, 1362-1368.
- [4] R. G. Wood, C. H. McCale, G. Williams. *The crystal structure of some heterocyclic organic compounds of analogous constitution. Part II. Phenthiazine, phenoxthionone, phenoxselenine, and phenoxtellurine*. Philosoph. Mag. **1941**, 31, 71-80.
- [5] C. Bodea, M. Raileanu. *Chlor-nitro-phenthiazone und Hydroxy-chlor-nitro-phenthiazine*. Liebigs Ann. Chem. **1959**, 620, 88-93.
- [6] C. Bodea, M. Terdic, I. Silberg. *Hochhalogenierte Phenothiazine und Phenthiazone*. Ann. Chem. **1964**, 673, 113-120.
- [7] H. Gilman, P. R. V. Ess, D. A. Shirley. *The Metalation of 10-Phenylphenothiazine and 10-Ethylphenothiazine*. J. Am. Chem. Soc. **1944**, 66, 1214-1216.
- [8] H. Gilman, D. A. Shirley. *Some Derivatives of Phenothiazine*. J. Am. Chem. Soc. **1944**, 66, 888-893.
- [9] F. Ullmann, A. Stein. *Ueber Diphenylen-dioxyd*. Ber. dtsh. chem. Ges. **1906**, 39, 622-625.
- [10] Patentschrift, Deutsches Reichspatent **1910**, Bayer & Co.
- [11] W. Sandermann. *Dioxin. Die Entstehungsgeschichte des 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxins (TCDD, Dioxin, Sevesogift)*. Nat.wiss. Rundsch. **1984**, 37, 173-178.
- [12] J. Kimmig, K. H. Schluz. *Chlorierte aromatische zyklische Äther als Ursache der sogenannten Chlorakne*. Naturwissenschaften **1957**, 44, 337-338.
- [13] J. Kimmig, K. H. Schulz. *Berufliche Akne (sog. Chlorakne) durch chlorierte aromatische zyklische Äther*. Dermatologica **1957**, 115, 540-546.
- [14] K. H. Schulz. *Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Atiologie der Chlorakne*. Arch. Klin. Exp. Dermatol. **1957**, 206, 589-596.
- [15] D. E. Lilienfeld, M. A. Gallo. *2,4-D, 2,4,5-T, and 2,3,7,8-TCDD: An overview*. Epidemiol. Rev. **1989**, 11, 28-58.

- [16] A. L. Young, C. E. Thalken, E. L. Arnold, J. H. Cupello, L. G. Cocerham, *Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the environment: Summary and decontamination recommendations*. Boulder, CO, USAFA, USAFA-TR-76-18, **1976**. (Zit. in [17]).
- [17] D. Lenoir, H. J. Sandermann. *Entstehung und Wirkung von Dioxinen*. Biol. Unserer Zeit **1993**, 23, 363-369.
- [18] E. Homberger, G. Reggiani, J. Sambeth, H. K. Wipf. *The Seveso accident: Its nature, extent and consequences*. Ann. Occup. Hyg. **1979**, 22, 327-370.
- [19] L. Bisanti, F. Bonetti, F. Caramaschi, G. DelCorno, C. Favaretti, S. Giambelluca, E. Marni, E. Montesarchio, V. Puccinelli, G. Remotti, C. Volpato, E. Zambrelli, *Experience of the accident of Seveso*. Proc. of the 6th European Teratology Society **1978**. (Zit. in [18]).
- [20] A. DiDomenico, S. Cerlesi, S. Ratti. *A two-exponential model to describe the vanishing trend of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the soil at Seveso, northern Italy*. Chemosphere **1990**, 20, 1559-1566.
- [21] P. Cikryt. *Die Gefährdung des Menschen durch Dioxin und verwandte Verbindungen*. Nach. Chem. Tech. Lab. **1991**, 39, 648-656.
- [22] ZDF, *Nachrichtenarchiv*. <http://www.heute.de>, **2003**
- [23] H. Berneth, *Farbstoffe - eine Übersicht*, Bayer AG, Leverkusen, **2001**.
- [24] P. J. Blower, N. J. Carter. *Rapid preparation of ¹²⁵I-labelled methylene blue and toluidine blue: Potential new agents for parathyroid scintigraphy*. Nucl. Med. Comm. **1990**, 11, 413-420.
- [25] H. Atamna, M. Krugliak, G. Shalmiev, E. Deharo, G. Pescarmona, H. Ginsburg. *Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on Plasmodium falciparum in culture and their inhibition of P. vinckei petteri and P. yoelii nigeriensis in vivo*. Biochem. Pharmacol. **1996**, 51, 693-700.
- [26] D. G. Cunningham Owens, *A Guide to the Extrapyramidal Side-Effects of Antipsychotic Drugs*, The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, UK, **1999**.
- [27] G. Beaumont, S. Dobbins, D. Latta, W. P. McMillin. *Mequitazine in the treatment of hayfever*. Br. J. Clin. Pract. **1990**, 44, 183-188.
- [28] R. J. Baldessarini, F. I. Tarazi, *Drugs and the treatment of psychiatric disorders in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10. Auflage (Herausgeber: J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman), The McGraw-Hill Companies, New York, **2001**, Seiten 447-520.

- [29] D. Lenoir, H. Fiedler. *Bildungswege für chlorierte Dibenzo-p-dioxine und -furane bei der Abfallverbrennung*. UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. **1992**, 4, 157-163.
- [30] D. Lenoir, S. Leichsenring. *Konzepte und Methoden des Umweltschutzes: Das Beispiel Dioxine*. Chem. Unserer Zeit **1996**, 30, 182-191.
- [31] D. Lenoir, A. Wehrmeier, K.-W. Schramm, A. Kaune, R. Zimmermann, P. H. Taylor, S. S. Sidhu. *Thermal formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans: Investigations on relevant pathways*. Environ. Eng. Sci. **1998**, 15, 37-47.
- [32] H. Vogg, L. Stieglitz. *Thermal behaviour of PCDD/F in fly ash from municipal waste incinerators*. Chemosphere **1986**, 15, 1373-1378.
- [33] L. C. Dickson, D. Lenoir, O. Hutzinger. *Surface-catalyzed formation of chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans during incineration*. Chemosphere **1989**, 19, 277-282.
- [34] M. Oehme, S. Mano, A. Mikaelson. *Formation and presence of polyhalogenated and polycyclic compounds in the emissions of small and large scale municipal waste incinerators*. Chemosphere **1987**, 16, 1221.
- [35] A. Kaune, D. Lenoir, U. Nikolai, A. Kettrup. *Estimating PCDD/F concentrations in the stack gas of hazardous waste incinerators from concentrations of chlorinated benzenes and biphenyls*. Chemosphere **1994**, 29, 2083-2096.
- [36] Y. Okamoto, M. Tomonari. *Formation pathways from 2,4,5-trichlorophenol (TCP) to polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs): An ab initio study*. J. Chem. Phys. **1999**, 103, 7686-7691.
- [37] K. L. Froese, O. Hutzinger. *Polychlorinated benzene, phenol, dibenzo-p-dioxin, and dibenzofuran in heterogeneous combustion reactions of acetylene*. Environ. Sci. Technol. **1996**, 30, 998-1008.
- [38] K. L. Froese, O. Hutzinger. *Polychlorinated benzene and polychlorinated phenol in heterogeneous combustion of ethylene and ethane*. Environ. Sci. Technol. **1996**, 30, 1009-1013.
- [39] A. Wehrmeier, D. Lenoir, S. S. Sidhu, P. H. Taylor, W. A. Rubey, A. Kettrup, B. Dellinger. *Role of copper species in chlorination and condensation of acetylene*. Environ. Sci. Technol. **1998**, 32, 2741-2748.
- [40] C. Klimm, *Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine, Dibenzofurane, Biphenyle und Hexachlorbenzol im Belebungs- und Faulprozeß kommunaler Kläranlagen*. Dissertation, Technische Universität München (München), **1996**.

- [41] C. Klimm, K.-W. Schramm, B. Henkelmann, D. Martens, A. Kettrup. *Formation of octa- and heptachlorodibenzo-p-dioxins during semi-anaerobic digestion of sewage sludge*. *Chemosphere* **1998**, 37, 2003-2011.
- [42] L. L. Lamparski, T. J. Nestruck, V. A. Stenger. *Presence of chlorodibenzo dioxins in a sealed 1933 sample of dried municipal sewage sludge*. *Chemosphere* **1984**, 13, 361-365.
- [43] L. G. Öberg, C. Rappe. *Biochemical formation of PCDD/Fs from chlorphenols*. *Chemosphere* **1992**, 25, 49-52.
- [44] C. Rappe, H. R. Buser, H.-P. Bosshardt. *Dioxins, dibenzofurans and other polyhalogenated aromatics: Production, use, formation, and destruction*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1979**, 320, 1-18.
- [45] G. W. Gribble. *The natural production of chlorinated compounds*. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 310A-319A.
- [46] R. T. Podoll, H. M. Jaser, T. Mill. *Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Rates of volatilization and photolysis in the environment*. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, 20, 490-492.
- [47] M. Senma, Z. Taira, T. Taga, K. Osaki. *Dibenzo-p-dioxin, C₁₂H₈O₂*. *Crystallogr. Struct. Comm.* **1973**, 2, 311-314.
- [48] A. W. Cordes, C. K. Fair. *Dibenzo-p-dioxin*. *Acta Crystallogr.* **1974**, B 30, 1621-1623.
- [49] F. P. Boer, F. P. Van Remoortere, P. P. North, M. A. Neuman. *The crystal and molecular structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Acta Crystallogr.* **1972**, B28, 1023-1029.
- [50] B. K. Gullett, A. Touati. *PCDD/F emissions from forest fire simulations*. *Atmos. Environ.* **2003**, 37, 803-813.
- [51] C. Gaus, O. Pöpke, N. Dennison, D. Haynes, G. R. Shaw, D. W. Connell, J. F. Müller. *Evidence for the presence of a widespread PCDD source in coastal sediments and soils from Queensland, Australia*. *Chemosphere* **2001**, 43, 549-558.
- [52] J. F. Müller, D. Haynes, M. McLachlan, F. Böhme, S. Will, G. R. Shaw, M. Mortimer, R. Sadler, D. W. Connell. *PCDDs, PCDFs, PCBs and HCB in marine and estuarine sediments from Queensland, Australia*. *Chemosphere* **1999**, 39, 1707-1721.
- [53] K.-W. Schramm, B. Henkelmann, A. Kettrup. *PCDD/F sources and levels in river Elbe sediments*. *Wat. Res.* **1995**, 29, 2160-2166.

- [54] C. Gaus, G. J. Brunskill, R. Weber, O. Pöpke, J. F. Müller. *Historical PCDD inputs and their source implications from dated sediment cores in Queensland (Australia)*. Environ. Sci. Technol. **2001**, 35, 4597-4603.
- [55] J. B. Ferrario, C. J. Byrne, D. H. Cleverly. *2,3,7,8-Dibenzo-p-dioxins in mined clay products from the United States: Evidence for possible natural origin*. Environ. Sci. Technol. **2000**, 34, 4524-4532.
- [56] H. Jobst, R. Aldag. *Dioxine in Lagerstätten-Tonen*. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. **2000**, 12, 2-4.
- [57] S. Hashimoto, T. Wakimoto, R. Tatsukawa. *Possible natural formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins as evidenced by sediment analysis from the Yellow Sea, the East China Sea and the Pacific Ocean*. Mar. Pollut. Bull. **1995**, 30, 341-346.
- [58] S. Hashimoto, T. Wakimoto, R. Tatsukawa. *PCDDs in the sediments accumulated about 8120 years ago from Japanese coastal areas*. Chemosphere **1990**, 21, 825-835.
- [59] I. Jüttner, B. Henkelmann, K.-W. Schramm, C. E. W. Steinberg, R. Winkler, A. Kettrup. *Occurrence of PCDD/F in dated lake sediments of the Black Forest, southwestern Germany*. Environ. Sci. Technol. **1997**, 31, 806-812.
- [60] J. M. Czuczwa, R. A. Hites. *Environmental fate of combustion-generated polychlorinated dioxins and furans*. Environ. Sci. Technol. **1984**, 18, 444-450.
- [61] L.-O. Kjeller, K. C. Jones, A. E. Johnston, C. Rappe. *Increases in the polychlorinated dibenzo-p-dioxin and -furan content of soils and vegetation since the 1840s*. Environ. Sci. Technol. **1991**, 25, 1619-1627.
- [62] R. E. Alcock, J. C. Jones. *Dioxins in the environment: A review of trend data*. Environ. Sci. Technol. **1996**, 30, 3133-3143.
- [63] UNEP, *Dioxin and Furan Inventories, National and Regional Emissions of PCDD/PCDF*. Geneva, Switzerland, United Nations Environment Programme, **1999**
- [64] P. Luthardt. *Dioxin-Inventare*. WLB Wasser, Luft und Boden **2002**, 6, 2-4.
- [65] SCALE, *Integrated Monitoring of Dioxins & PCBs in the Baltic Region*. Oxfordshire, UK, Technical Working Group on Integrated Monitoring as part of the European Commission's SCALE initiative (Science, Children, Awareness raising, Legal instruments, and Evaluation), <http://www.environmentandhealth.org>. **2004**
- [66] UNEP, *Standardized Toolkit for Identification and Quantification of Dioxin and Furan Releases*. Geneva, Switzerland, United Nations Environment Programme, <http://www.pops.int/documents/guidance>. **2003**

- [67] WHO, *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 15*, Geneva, **1977**.
- [68] M. Bunge, L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W. G. Lorenz, J. R. Andreesen, H. Görisch, U. Lechner. *Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium*. *Nature* **2003**, 421, 357-360.
- [69] W. R. Mabey, J. H. Smith, R. T. Podoll, H. L. Johnson, T. Mill, T. W. Chou, J. Gate, I. Waight-Partridge, H. Jaber, D. Vandenberg. *Aquatic Fate Process Data for Organic Priority Pollutants*. EPA Report **1982**, EPA-440/4-81-014, 107-108.
- [70] Cullinane, Rees. *Trans. Faraday Soc.* **1940**, 36, 507. (Zit. in [4]).
- [71] M. V. Jovanovic, E. R. Biehl. *Correlation of dihedral angles with ¹³C chemical shifts of quarternary carbon atoms of some phenothiazine derivatives*. *J. Heterocycl. Chem.* **1987**, 24, 51-53.
- [72] J. J. H. McDowell. *The crystal and molecular structure of chlorpromazine*. *Acta Crystallogr.* **1969**, B25, 2175-2181.
- [73] J. P. Malrieu, B. Pullman. *Theor. Chim. Acta* **1964**, 2, 293. (Zit. in [74]).
- [74] H. Ulrich, *Methods of Organic Chemistry in Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl): Heterocycles IV: Six-Membered and Larger Heterocycles with Maximum Unsaturation, Vol. E 9a* (Ed.: E. Schaumann), Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **1997**, Seiten 510-556.
- [75] G. C. Pappalardo, G. Ronsisvalle. *Dipole moments and conformations of 2,3-diazaphenothiazines*. *J. Mol. Struct.* **1974**, 22, 361-368.
- [76] H. Poiger, H. R. Buser, H. Weber, U. Zweifel, C. Schlatter. *Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites*. *Experientia* **1982**, 38, 484-486.
- [77] H. Poiger, H. R. Buser, *The Metabolism of TCDD in the Dog and Rat in Biological Mechanisms of Dioxin Action, Vol. 18* (Herausgeber: A. Poland, R. D. Kimbrough), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., **1984**, p. 39.
- [78] B. L. Goodwin, *Handbook of Intermediary Metabolism*, Chapman and Hall Ltd., London, **1976**.
- [79] H. Poiger, C. Schlatter. *Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man*. *Chemosphere* **1986**, 15, 1489-1494.
- [80] H. J. Geyer, K.-W. Schramm, E. A. Feicht, A. Behechti, C. Steinberg, R. Brüggemann, H. Poiger, B. Henkelmann, A. Kettrup. *Half-lives of tetra-, penta-, hexa-, hepta-, and octachlorodibenzo-p-dioxins in rats, monkeys, and humans - a critical review*. *Chemosphere* **2002**, 48, 631-644.

- [81] T. A. Gasiewicz, R. A. Neal. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin tissue distribution, excretion, and effects on clinical chemical parameters in guinea pigs*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1979**, 51, 329-339.
- [82] L. W. D. Weber, S. W. Ernst, B. U. Stahl, K. K. Rozman. *Tissue distribution and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats after intravenous injection*. *Fund. Appl. Toxicol.* **1993**, 21, 523-534.
- [83] W. N. Piper, J. Q. Rose, P. J. Gehring. *Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat*. *Environ. Health Perspect.* **1973**, 5, 241-244.
- [84] J. Q. Rose, J. C. Ramsey, T. H. Wentzler, R. A. Hummel, P. J. Gehring. *The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1976**, 36, 209-226.
- [85] R. Koytchev, R. G. Alken, V. Kirkov, G. Neshev, M. Vagaday, U. Kunter. *Absolute Bioverfügbarkeit von Chlorpromazin, Promazin und Promethazin*. *Arzneim. Forsch.* **1994**, 44, 121-125.
- [86] J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10 Auflage, The McGraw-Hill Companies, New York, **2001**.
- [87] M. A. Mahju, R. P. Maickel. *Accumulation of phenothiazine tranquilizers in the rat brain and plasma after repeated dosage*. *Biochem. Pharmacol.* **1969**, 18, 2701-2710.
- [88] N. P. Salzman, B. B. Brodie. *Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1956**, 118, 46-54.
- [89] NATO, *Committee on the Challenges of Modern Society. Scientific Basis for the Development of the International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds. Pilot Study on Industrial Information Exchange on Dioxins and Related Compounds*. Brüssel, North Atlantic Treaty Organization, 176: 1-56, **1988**
- [90] WHO. *WHO Experts Re-evaluate Health Risks from Dioxins*. Press Release WHO **1998**, 45.
- [91] K. Herxheimer. *Über Chlorakne*. *Münch. Med. Wochenschr.* **1899**, 46, 278.
- [92] A. Geusau, K. Abraham, K. Geissler, M. O. Sator, G. Stingl, E. Tschachler. *Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: Clinical and laboratory effects*. *Environ. Health Perspect.* **2001**, 109, 865-869.

- [93] J. Abel, *2,3,7,8-TCDD-Intoxikation beim Menschen*. Dioxin - Eine technische, analytische, ökologische und toxikologische Herausforderung **1987**, 634, 487-501.
- [94] M. W. Harris, J. A. Moore, J. G. Vos, B. N. Gupta. *General biological effects of TCDD in laboratory animals*. Environ. Health Perspect. **1973**, 5, 101-109.
- [95] B. A. Schwetz, J. M. Norris, G. L. Sparschu, V. K. Rowe, P. J. Gehring, J. L. Emerson, C. G. Gerbig. *Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins*. Environ. Health Perspect. **1973**, 9, 87-99.
- [96] R. Eisler, *Dioxin Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*, Vol. 85, **1986**.
- [97] H. J. Geyer, I. Scheunert, K. Rapp, A. Kettrup, F. Korte, H. Greim, K. Rozman. *Correlation between acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and total body fat content in mammals*. Toxicology **1990**, 65, 97-107.
- [98] R. E. Peterson, H. M. Theobald, G. L. Kimmel. *Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: Cross-species comparisons*. Crit. Rev. Toxicol. **1993**, 23, 283-335.
- [99] R. J. Kociba, P. A. Keeler, C. N. Park, P. J. Gehring. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): Results of a 13-week oral toxicity study in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1976**, 35, 553-574.
- [100] G. L. Sparschu. *Study of the teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat*. Food Cosmet. Toxicol. **1971**, 9, 405.
- [101] F. J. Murray, F. A. Smith, K. D. Nitschke, C. G. Humiston, R. J. Kociba, B. A. Schwetz. *Three-generation reproductive study of rats given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the diet*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1979**, 50, 241-252.
- [102] J. R. Allen, D. A. Barsotti, J. P. VanMiller, L. J. Abrahamson, J. J. Lalich. *Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Food Cosmet. Toxicol. **1977**, 15, 401.
- [103] J. R. Allen, D. A. Barsotti, L. K. Lambrecht, J. P. VanMiller. *Reproductive effects of halogenated aromatic hydrocarbons on nonhuman primates*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **1979**, 320, 419-425.
- [104] D. A. Barsotti, L. J. Abrahamson, J. R. Allen. *Hormonal alteration in femal rhesus monkeys fed a diet containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **1979**, 21, 463-469.

- [105] S. L. Schantz, D. A. Barsotti, J. R. Allen. *Toxicological effects produced in nonhuman primates exposed to fifty parts per trillion 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1979**, 48, A180.
- [106] K. D. Courtney, J. A. Moore. *Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1971**, 20, 396-403.
- [107] M. J. Thomas, J. A. Thomas, *Toxic Responses of the Reproductive System in Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Ed.: C. D. Klaassen), McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, **2001**, Seiten 673-709.
- [108] J. T. Hamm, C.-Y. Chen, L. S. Birnbaum. *A mixture of dioxins, furans, and non-ortho PCBs based upon consensus toxic equivalency factors produces dioxin-like reproductive effects*. Toxicol. Sci. **2003**, 74, 182-191.
- [109] X. Li, D. C. Johnson, K. K. Rozman. *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on estrous cyclicity and ovulation in female Sprague-Dawley rats*. Toxicol. Lett. **1995**, 78, 219-222.
- [110] X. Li, D. C. Johnson, K. K. Rozman. *Reproductive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female rats: Ovulation, hormonal regulation, and possible mechanism(s)*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1995**, 133, 312-327.
- [111] P. Mocarelli, P. Brambilla, P. M. Gerthoux, D. G. P. Jr., L. L. Needham. *Change in sex ratio with exposure to dioxin*. Lancet **1996**, 348, 409.
- [112] P. Mocarelli, P. M. Gerthoux, E. Ferrari, D. G. P. Jr., S. M. Kieszak, P. Brambilla, N. Vincoli, S. Signorini, P. Tramacere, V. Carreri, E. J. Sampson, W. E. Turner, L. H. Needham. *Paternal concentrations of dioxins and sex ratio of offspring*. Lancet **2000**, 355, 1858-1863.
- [113] J. E. Michalek, A. J. Rahe, C. A. Boyle. *Paternal dioxin and the sex of children fathered by veterans of Operation Ranch Hand*. Epidemiology **1998**, 9, 474-475.
- [114] J. M. Warmerdam, J. F. Greene, *Analysis of sex ratios from Seveso and Ranch Hand cohorts using binominal probability*. Dioxin **2002** Barcelona, Epidemiol. Ed. 59, 391-393.
- [115] K. K. Rozman. *A critical view on the mechanism(s) of toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Implications for human safety assessment*. Dermatosen **1989**, 37, 81-92.
- [116] K. Rozman, W. L. Roth, H. Greim, B. U. Stahl, J. Doull. *Relative potency of chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) in acute, subchronic and chronic (carcinogenicity) toxicity studies: Implications for risk assessment of chemical mixtures*. Toxicology **1993**, 77, 39-50.

- [117] B. U. Stahl, A. Kettrup, K. K. Rozman. *Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. Part I: Acute toxicity and toxic equivalency factors (TEFs)*. Arch. Toxicol. **1992**, 66, 471-477.
- [118] L. W. D. Weber, M. Lebofsky, B. U. Stahl, A. Kettrup, K. K. Rozman. *Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. Part II: Structure-activity relationship with inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate carboxylase, and χ -glutamyl transpeptidase activities*. Arch. Toxicol. **1992**, 66, 478-483.
- [119] L. W. D. Weber, M. Lebofsky, B. U. Stahl, A. Kettrup, K. K. Rozman. *Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. Part III: Structure-activity relationship with increased plasma tryptophan levels, but no relationship to hepatic ethoxyresorufin O-deethylase activity*. Arch. Toxicol. **1992**, 66, 484-488.
- [120] L. W. D. Weber, B. U. Stahl, K. K. Rozman. *Are serotonergic mechanisms involved in the acute toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins*. Chemosphere **1992**, 25, 161.
- [121] O. P. Mehtonen, K. Aranko, L. Mälkonen, H. Vapaatalo. *A survey of sudden death associated with the use of antipsychotic or antidepressant drugs: 49 cases in Finland*. Acta Psychiatr. Scand. **1991**, 84, 58-64.
- [122] K. T. Szabo, R. L. Brent. *Species differences in experimental teratogenesis by tranquillizing agents*. Lancet **1974**, 1, 565.
- [123] B. E. Walker, A. Patterson. *Induction of cleft palate in mice by tranquillizers and barbiturates*. Teratology **1974**, 10, 159-164.
- [124] Y. Chambon. *Action de la chlorpromazine sur l'évolution et l'avenir de la gestation chez la rate*. Ann. Endocrinol. **1955**, 16, 912-922.
- [125] I. Fratta, S. B. Zak, P. Greengard, E. B. Sigg. *Fetal death from nicotinamide-deficient diet and its prevention by chlorpromazine and imipramine*. Science **1964**, 145, 1429-1430.
- [126] K. W. Fried, X. Gao, B. K. Petroff, K.-W. Schramm, P. F. Terranova, K. K. Rozman. *Effect of chlorinated phenothiazines on ovulation in rats*. Toxicologist **2002**, 66, 835.
- [127] D. E. Sobel. *Fetal damage due to ECT, insulin coma, chlorpromazine, or reserpine*. Arch. Gen. Psychiat. **1960**, 2, 606-611.
- [128] L. Milkovich, B. J. VanDenBerg. *An evaluation of the teratogenicity of certain anti-nauseant drugs*. Am. J. Obstet. Gynecol. **1976**, 125, 244-248.

- [129] D. Slone, V. Siskind, O. P. Heinonen, R. R. Monson, D. W. Kaufman, S. Shapiro. *Antenal exposure to the phenothiazines in relation to congenital malformations, perinatal mortality rate, birth weight, and intelligence quotient score.* Am. J. Obstet. Gynecol. **1977**, 128, 486-488.
- [130] C. Rumeau-Rouquette, J. Goujard, G. Huel. *Possible teratogenic effect of phenothiazines in human beings.* Teratology **1977**, 15, 57-64.
- [131] A. Poland, E. Glover. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and enzyme induction.* Ecol. Bull. **1978**, 27, 145-148.
- [132] V. J. Wroblewski, J. R. Olson. *Hepatic metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the rat and guinea pig.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **1985**, 81, 231-240.
- [133] M. Van den Berg, J. De Jongh, H. Poiger. *The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity.* Crit. Rev. Tox. **1994**, 24, 1-74.
- [134] A. Parkinson, *Biotransformation of Xenobiotics in Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Ed.: C. D. Klaassen), McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, **2001**, Seiten 977-1046.
- [135] K. Abraham, R. Krowke, D. Neubert. *Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Dose-dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin O-deethylase in rats following a single injection.* Arch. Toxicol. **1988**, 62, 359-368.
- [136] K. K. Rozman, J. R. Gorski, D. Dutton, A. Parkinson. *Effects of vitamin A and/or thyroidectomy on liver microsomal enzymes and their induction in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats.* Toxicology **1987**, 46, 107-117.
- [137] T. N. Thompson, J. B. Watkins, Z. Gregus, C. D. Klaassen. *Effect of microsomal enzyme induction on the soluble enzymes of hepatic phase II biotransformation.* Toxicol. Appl. Pharmacol. **1982**, 66, 400-408.
- [138] L. Rivera-Calimlim. *Problems in therapeutic blood monitoring of chlorpromazine.* Ther. Drug. Monit. **1982**, 4, 41-49.
- [139] P. Galanopoulou, C. Karageorgiou, K. Dimakopoulou. *Effect of enzyme induction on bioavailability of hetacillin in patients treated with anticonvulsants and chlorpromazine.* Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. **1990**, 15, 15-18.
- [140] T. D. Luckey, *Recent Progress in Microbiology in Recent Progress in Microbiology*, Almquist and Wikell, Stockholm, **1959**, Seiten 340-349.

- [141] K. Rozman, B. Stahl, H. Sterzl-Eckert, *Polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane (PCDD/F) in Toxikologie* (Eds.: H. Greim, E. Deml), VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1996**, Seiten 451-461.
- [142] R. P. Sharma, R. J. Kociba, P. J. Gehring. *Immunotoxicologic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1978**, *45*, 333.
- [143] J. E. Thigpen, R. E. Faith, E. E. McConnel. *Increased susceptibility to bacterial infection as a sequela of exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Infect. Immunol.* **1975**, *12*, 1319-1324.
- [144] F. Fan, D. Wierda, K. K. Rozman. *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine on humoral and cell-mediated immunity in Sprague-Dawley rats*. *Toxicology* **1996**, *106*, 221-228.
- [145] J. Huff. *2,3,7,8-TCDD: A potent and complete carcinogen in experimental animals*. *Chemosphere* **1992**, *25*, 173-176.
- [146] J. P. Van Miller, J. J. Lalich, J. R. Allen. *Increased incidence of neoplasms in rats exposed to low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Chemosphere* **1977**, *9*, 537-544.
- [147] R. J. Kociba, D. G. Keyes, J. E. Beyer, R. M. Carreon, C. E. Wade, D. A. Dittenber, R. P. Kalnins, L. E. Frauson, C. N. Park, S. D. Barnard, R. A. Hummel, C. G. Humiston. *Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine in rats*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1978**, *46*, 279-303.
- [148] M. A. Fingerhut, W. E. Halperin, D. A. Marlow, L. A. Piacitelli, P. A. Honchar, M. H. Sweeney, A. L. Greife, P. A. Dill, K. Steenland, A. J. Suruda. *Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 212-218.
- [149] A. Zober, P. Messerer, P. Huber. *Thirty-four-year mortality follow-up of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1990**, *62*, 139-157.
- [150] A. Manz, *Exposition gegenüber HCH und Auswirkungen auf die Mortalität*. Dortmund, Berlin, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Fb 789, **1998**
- [151] M. G. Ott, A. Zober. *Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor incident*. *Occup. Environ. Med.* **1996**, *53*, 606-612.

- [152] M. Viluksela, Y. Bager, J. T. Tuomisto, G. Scheu, M. Unkila, R. Pohjanvirta, S. Flodström, V.-M.-. Kosma, J. Mäki-Paakkanen, T. Vartiainen, C. Klimm, K.-W. Schramm, L. Wärngård, J. Tuomisto. *Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains*. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6911-6920.
- [153] D.-x. Li, Q.-l. Yue, L. Chen. *Synthesis of N-ethylphenothiazine and its derivatives*. *J. Shanxi Univ., China* **1988**, *3*, 66-71.
- [154] S. Huang, L. Ma, L. Chen. *Fluorescence spectra study on 2,3,7,8-tetrachloro-N-ethylphenothiazine*. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* **1997**, *17*, 112-114.
- [155] K. W. Fried, *Synthese, Analytik und Aufreinigung von 1,3,7,9-Tetrachlorphenothiazin und Oxoderivaten*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2000**.
- [156] L. Gattermann. *Untersuchungen über Diazoverbindungen*. *Chem. Ber.* **1890**, *23*, 1218-1228.
- [157] R. J. K. Taylor, *Organocopper Reagents - A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, **1994**.
- [158] <http://qobrue.usc.es/jsgroup/MestRe-C/MestRe-C.htm>.
- [159] H. D. Flack. *On enantiomorph-polarity estimation*. *Acta Crystallogr.* **1983**, *A39*, 876-881.
- [160] A. Hanberg, F. Waern, L. Asplund, E. Haglund, S. Safe. *Swedish dioxin survey: Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests*. *Chemosphere* **1990**, *20*, 1161-1164.
- [161] K. Doods, *Arbeitsanweisung / SOP Micro-EROD-Assay (in vitro)*, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Ökologische Chemie, Ökotoxikologie Gruppe, Neuherberg, **2003**.
- [162] M. D. Reuber. *A transplantable bile-secreting hepatocellular carcinoma in the rat*. *J. Natl. Cancer Inst.* **1961**, *26*, 891-897.
- [163] H. C. Pitot, C. Peraino, P. A. Marse, V. R. Potter. *Hepatoma in tissue culture compared with adapting liver in vivo*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **1964**, *13*, 229-245.
- [164] W. C. Young, E. W. Dempsey, H. I. Myers. *Cyclic reproductive behavior in the female guinea pig*. *J. Comp. Psychol.* **1935**, *19*, 313-335.

- [165] K.-S. Boos, A. Randolphi, S. Vielhauer, A. Walfort, D. Lubda, F. Eisenbeiss. *Alkyl-diol silica (ADS): Restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids*. Fresenius' J. Anal. Chem. **1995**, 352, 684-690.
- [166] R. E. Majors, K.-S. Boos, C.-H. Grimm, D. Lubda, G. Wieland. *Practical guidelines for HPLC-integrated sample preparation using column switching*. LC-GC **1996**, 14, 554-560.
- [167] K.-S. Boos, A. Rudolphi. *The use of restricted-access media in HPLC, part I - classification and review*. LC-GC **1997**, 15, 602-611.
- [168] A. Rudolphi, K.-S. Boos. *The use of restricted-access media in HPLC, part II - applications*. LC-GC **1997**, 15, 814-823.
- [169] K.-S. Boos, C.-H. Grimm. *High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings*. Trends Anal. Chem. **1999**, 18, 175-180.
- [170] Merck KGaA *LiChrospher ADS Manual*. 4. Internationales LiChrospher ADS Anwender Treffen **1999**.
- [171] W. Diederich, *persönliche Mitteilung*. **2001**
- [172] A. Dutta, G. Georg, *persönliche Mitteilung*. **2001**
- [173] N. Wiberg, *Hollemann - Wiberg. Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1995**.
- [174] *Verfahren zur Herstellung eines Thiodiphenylaminderivates*. Patentschrift, Gesellschaft für Chemische Industrie in Basel, Schweizerische Eidgenossenschaft, Eidgenössisches Amt für Geistiges Eigentum **1939**.
- [175] S. P. Massie, P. K. Kadaba. *Ring derivatives of phenothiazine. The synthesis of 1-substituted phenothiazines by thionation*. J. Org. Chem. **1956**, 21, 347-348.
- [176] B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, ELBS Edition of fifth edition, Longman Group Ltd, Singapore, **1989**.
- [177] A. J. Saggiomo, P. N. Craig, M. Gordon. *Synthesis of 2-aza- and 8-chloro-2-aza-phenothiazine*. J. Org. Chem. **1958**, 23, 1906-1909.
- [178] E. A. Nodiff, M. Hausman. *A new phenothiazine synthesis. The halogen-induced Smiles rearrangement*. J. Org. Chem. **1964**, 29, 2453-2455.

- [179] J. I. G. Cadogan, S. Kulik, M. J. Todd. *Reduction of nitro- and nitroso-compounds by tervalent phosphorus reagents. Part VII. A new synthesis of phenothiazines involving a new molecular rearrangement.* J. Chem. Soc. (C) **1970**, 2437-2441.
- [180] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, Barth Verlagsgesellschaft mbH, Leipzig, Berlin, Heidelberg, **1985**.
- [181] D. L. Boger, S. L. Castle, S. Miyazaki, J. H. Wu, R. T. Beresis, O. Loiseleur. *Vancomycin CD and DE macrocyclization and atropisomerism studies.* J. Org. Chem. **1999**, *64*, 70-80.
- [182] J. I. G. Cadogan, S. Kulik. *Reduction of nitro- and nitroso-compounds by tervalent phosphorus reagents. Part bIX. The 'blocked ortho' effect in reactions of 2,3-disubstituted aryl 2-nitrophenyl and 2,6-disubstituted aryl 2-azidophenyl sulphides: A new series of nitrene-induced aromatic rearrangements.* J. Chem. Soc. (C) **1971**, 2621-2632.
- [183] G. E. Bonvicino, L. H. Yogodzinski, R. A. Hardy. J. Org. Chem. **1962**, *27*, 4272. (Zit. in [178]).
- [184] A. P. Phillips, N. B. Metha, J. Z. Strelitz. *Syntheses of 1,3-diazaphenothiazines. I.* J. Org. Chem. **1963**, *28*, 1488-1490.
- [185] M. Messer, D. Farge. Bull. Sci. Chim. France **1968**, 2832. (Zit. in [182]).
- [186] C. Corral, J. Lissavetzky, G. Quintanilla. *Synthesis of 10-aminophenothiazines and derivatives.* J. Heterocycl. Chem. **1978**, *15*, 1137-1140.
- [187] R. Kwok, P. Franc. J. Org. Chem. **1968**, *33*, 2880. (Zit. in [182]).
- [188] W. J. Evans, S. Smiles. J. Chem. Soc. **1935**, 181. (Zit. in [184]).
- [189] C.-Q. Hu, K. Chen, Q. Shi. *Anti-AIDS agents. 10. Acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from chrysanthemum morifolium and a structure-activity correlation with some related flavonoids.* J. Nat. Prod. **1994**, *57*, 42-51.
- [190] H. M. Grotta, J. T. F. Page, C. J. Riggle, A. A. Manian. *Some hydroxylated derivatives of chlorpromazine.* J. Heterocycl. Chem. **1967**, *4*, 611-618.
- [191] R. Subho, P. Flaherty, E. Reiff, D. Dutta, *persönliche Mitteilung.* **2001**
- [192] A. J. Béchamp. *De l'action des protoxels de fer.* Ann. Chim. Phys. **1854**, *3*, 186-196.

- [193] A. J. Béchamp. *Ueber die Einwirkung der Eisenoxydulsalze auf Nitronaphthalin und Nitrobenzol*. Ann. **1854**, 93, 401-403.
- [194] G. Georg, *persönliche Mitteilung*. **2001**
- [195] P. Flaherty, *persönliche Mitteilung*. **2001**
- [196] J. C. Antilla, S. L. Buchwald. *Copper-catalyzed coupling of arylboronic acids and amines*. Org. Lett. **2001**, 3, 2077-2079.
- [197] H. A. Dieck, R. F. Heck. J. Am. Chem. Soc. **1974**, 96, 1133. (Zit. in [242]).
- [198] R. F. Heck. *Palladium-catalyzed reactions of organic halides with olefins*. Acc. Chem. Res. **1979**, 12, 146.
- [199] B. A. Patel, R. F. Heck. J. Org. Chem. **1978**, 43, 3898. (Zit. in [242]).
- [200] B. A. Patel, J. I. Kim, D. D. Bender, L. C. Kao, R. F. Heck. J. Org. Chem. **1981**, 46, 1061. (Zit. in [242]).
- [201] J. I. Kim, B. A. Patel, R. F. Heck. J. Org. Chem. **1981**, 46, 1067. (Zit. in [242]).
- [202] C. B. Ziegler, R. F. Heck. J. Org. Chem. **1978**, 43, 2941. (Zit. in [242]).
- [203] W. C. Frank, Y. C. Kim, R. F. Heck. J. Org. Chem. **1978**, 43, 2947. (Zit. in [242]).
- [204] C. B. Ziegler, R. F. Heck. J. Org. Chem. Soc. **1974**, 96, 1133. (Zit. in [242]).
- [205] J. F. Hartwig. *Transition metal catalyzed synthesis of arylamines and aryl ethers from aryl halides and triflates: Scope and mechanism*. Angew. Chem., Int. Ed. **1998**, 37, 2046-2067.
- [206] J. P. Wolfe, S. L. Buchwald. *Scope and limitations of the Pd/BINAP-catalyzed amination of aryl bromides*. J. Org. Chem. **2000**, 65, 1144-1157.
- [207] A. DeMeijere, F. E. Meyer. *Fine feathers make fine birds: The Heck reaction in modern garb*. Angew. Chem., Int. Ed. **1994**, 33, 2379-2411.
- [208] R. F. Heck, *Palladium Reagents in Organic Synthesis*, Academic, London, **1985**.
- [209] S. Buck, *persönliche Mitteilung*. **1998**
- [210] F. Ullmann. Forsch.ber. dtsh. chem. Ges. **1903**, 36, 2382-2384. (Zit. in [251]).
- [211] F. Ullmann, Sponagel. Chem. Ber. **1905**, 38, 2211. (Zit. in [251]).
- [212] F. Ullmann. Ann. Chem. **1907**, 355, 312. (Zit. in [251]).
- [213] I. Goldberg. Chem. Ber. **1906**, 39, 1691. (Zit. in [251]).

- [214] I. Goldberg. Chem. Ber. **1907**, *40*, 4541. (Zit. in [251]).
- [215] H. E. Ungnade, E. F. Orwoll. J. Org. Syn. Chem. **1955**, *3*, 566. (Zit. in [252]).
- [216] J. Lindley. Tetrahedron **1984**, *40*, 1433-1456. (Zit. in [252]).
- [217] F. D. Hager. J. Org. Syn. Chem. **1941**, *1*, 544. (Zit. in [252]).
- [218] S. Gauthier, J. M. J. Fréchet. Synthesis **1987**, 383. (Zit. in [252]).
- [219] R. C. Fuson, E. A. Cleveland. Org. Syn. **1955**, *3*, 339. (Zit. in [242]).
- [220] P. E. Fanta. Chem. Rev. **1964**, *64*, 613. (Zit. in [242]).
- [221] P. E. Fanta. *The Ullmann Synthesis of Biaryls*. Synthesis **1974**, 9-21.
- [222] M. Sainsbury. Tetrahedron **1980**, *36*, 3327. (Zit. in [252]).
- [223] E. Brown, J.-P. Robin. Tetrahedron Lett. **1977**, 2015. (Zit. in [252]).
- [224] E. Brown, J.-P. Robin. Tetrahedron Lett. **1978**, 3613. (Zit. in [252]).
- [225] T. Cohen, T. Poeth. J. Am. Chem. Soc. **1972**, *94*, 4363. (Zit. in [252]).
- [226] D. L. Boger, Y. Nomoto, B. R. Teegarden. *Vancomycin and ristocetin models: Synthesis via the Ullmann macrocyclization reaction*. J. Org. Chem. **1993**, *58*, 1425-1433.
- [227] J. G. Michels, E. D. Amstutz. *Studies in the sulfone series. V. 2,3-Diaminophenothiazine-5-dioxide*. J. Am. Chem. Soc. **1950**, *72*, 888-892.
- [228] M. Sugahara, T. Ukita. *A facile copper-catalyzed Ullmann condensation: N-Arylation of heterocyclic compounds containing an -NHCO- moiety*. Chem. Pharm. Bull. **1997**, *45*, 719-721.
- [229] P. N. Craig, M. Gordon, J. J. Lafferty, B. M. Lester, A. J. Saggiomo, C. L. Zirkle. *Synthesis of phenothiazines. VI. Certain 2-substituted phenothiazines and their 10-aminoalkyl derivatives*. J. Org. Chem. **1961**, *26*, 1138-1143.
- [230] A. J. Lin, S. Kasina. *Synthesis of 3-substituted 7-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-10-methylphenothiazines as potential antitumor agents*. J. Heterocycl. Chem. **1981**, *18*, 759-761.
- [231] E. A. Nodiff, N. Oda, T. Hayazaki, S. Ina, T. Ito, S. Nishibe, T. Ueda, K. Suzuki, M. Hausman, A. A. Manian. *Synthesis of possible metabolites of chlorpromazine. II. 3-, 8- and 9-Hydroxychlorpromazine*. J. Heterocycl. Chem. **1968**, *5*, 165-177.
- [232] H. L. Yale. *3-Chloro-10-dialkylaminoalkylphenothiazines*. J. Am. Chem. Soc. **1955**, *77*, 2270-2272.

- [233] P. F. Terranova, G. S. Greenwald. *Increased ovulation rate in the cyclic guinea pig after a single injection of antiserum to LH*. J. Reprod. Fert. **1981**, 61, 37-42.
- [234] R. H. B. Galt, J. D. Loudon. *Extrusion of sulphur. Part IV. Effect of substituents in 11-phenyldibenzo[b,f]-1:4-thiazepine*. J. Chem. Soc. **1959**, 885-889.
- [235] R. F. Nystrom, W. G. Brown. J. Am. Chem. Soc. **1948**, 70, 3738. (Zit. in [236]).
- [236] K. Soai, A. Ookawa. *Mixed solvents containing methanol as useful reaction media for unique chemoselective reductions with lithium borohydride*. J. Org. Chem. **1986**, 51, 4000-4005.
- [237] C. Yu, B. Liu, L. Hu. *Samarium (0) and 1,1'-dioctyl-4,4'-bipyridinium dibromide: A novel electron-transfer system for the chemoselective reduction of aromatic nitro groups*. J. Org. Chem. **2001**, 66, 919-924.
- [238] R. D. Rieke, L. D. Rhyne. *Preparation of highly reactive metal powders. Activated copper and uranium. The Ullmann coupling and preparation of organometallic species*. J. Org. Chem. **1979**, 44, 3445-3446.
- [239] G. W. Ebert, R. D. Rieke. *Direct formation of organocopper compounds by oxidative addition of zerovalent copper to organic halides*. J. Org. Chem. **1984**, 49, 5280-5282.
- [240] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, E. M. Kosower, *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1994**.
- [241] C. Elschenbroich, A. Salzer, *Organometallchemie*, B. G. Teubner, Stuttgart, **1993**.
- [242] F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, **1990**.
- [243] J. P. Wolfe, S. L. Buchwald, *Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Aryl Triflates: N-Hexyl-2-methyl-4-methoxyaniline and N-Methyl-N-(4-chlorophenyl)aniline in Organic Syntheses, Vol. 78* (Ed.: W. R. Roush), Division of Organic Chemistry, American Chemical Society, Denton, TX, USA, **2000**, Seiten 23-35.
- [244] J. P. Wolfe, S. Wagaw, S. L. Buchwald. *An improved catalyst system for aromatic carbon-nitrogen bond formation: The possible involvement of bis(phosphine) palladium complexes as key intermediates*. J. Am. Chem. Soc. **1996**, 118, 7215-7216.
- [245] J. P. Wolfe, H. Tomori, J. P. Sadighi, J. Yin, S. L. Buchwald. *Simple, efficient catalyst systems for the palladium-catalyzed amination of aryl chlorides, bromides, and triflates*. J. Org. Chem. **2000**, 65, 1158-1174.
- [246] C. Klimm, A. M. Hofmaier, K.-W. Schramm, A. Kettrup, *Using TEF concept for assessing toxic potency of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial samples. Dioxin* **1999**.

- [247] S. H. Curry, S. Evans, R. F. Chatfield, S. Potter. *Chlorpromazine in four preparations: A case of bioavailability without any difference*. J. Hosp. Pharm. **1974**, 32, 77-80.
- [248] R. J. Nolan, F. A. Smith, J. G. Hefner. *Elimination and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female guinea pigs following a single oral dose*. Toxicol. Appl. Pharmacol. **1979**, 48, A 162.
- [249] H. J. Geyer, K.-W. Schramm, E. A. Feicht, A. Behechti, A. Kettrup, J. T. M. Buters, *Correlation between the half-life $t_{1/2}$ of various xenobiotics in rats and humans*. 6th International ISSX Meeting **2001**, Suppl. 1, 203.
- [250] B. J. Hrutford, J. F. Bunnett. *A general principle for the synthesis of heterocyclic and homocyclic compounds*. J. Am. Chem. Soc. **1958**, 80, 2021-2022.
- [251] P. E. Weston, H. Adkins. *Catalysis with Copper in the Ullmann Reaction*. J. Am. Chem. Soc. **1928**, 50, 859-866.
- [252] L. A. Paquette, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, **1995**.