

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, Germany

2-(3-Halogen-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon-Derivate aus 2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-Analoga, potente 5-Lipoxygenase-Inhibitoren

Untersuchungen an 1,4-Naphthochinonen, 27. Mitt.*

G. WURM und S. SCHWANDT

Es wird eine einfache und schnelle Methode zur Synthese halogener Hydroxyphenylnaphthochinone – potentielle 5-Lipoxygenase-(LOX)-Inhibitoren – beschrieben. Während der potente 5-LOX-Inhibitor **1** mit AlCl_3 zu **2a** und **2b** debutyliert wird, reagiert das oxidierte Cyclohexadienyliden-Derivat **3** unter vergleichbaren Bedingungen unter gleichzeitiger Halogenierung zu **4a** und mit AlBr_3 zu **4b**. Als Produkte einer Nebenreaktion bei der Umsetzung von **6** mit TiCl_4 bzw. BBr_3 werden die tetracyclischen Benzo[*b*]naphtho[2,1-*d*]furan-Derivate **8a** und **8b** isoliert. Ausgewählte Verbindungen wurden auf ihre 5-LOX inhibierenden und antioxidativen Eigenschaften untersucht. Es zeigte sich eine eindeutige Korrelation beider Aktivitäten bei Verbindungen mit einer 3-OH Funktion und zwei, einer oder keiner *tert*-Butylgruppe am Phenylring. Im Unterschied hierzu sind das Chinon **6** (3-Cl) und das Dibenzofuranderivat **8a** starke 5-LOX-Inhibitoren bei nur geringer antioxidativer Aktivität.

2-(3-Halogen-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthoquinones from their 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl) congeners, potent 5-lipoxygenase inhibitors

1,4-Naphthoquinones, XXVII

A new simple and fast method for the synthesis of halogenated hydroxyphenyl naphthoquinones as potential 5-lipoxygenase (LOX) inhibitors is presented. While the aryl naphthoquinone **1**, a potent 5-LOX inhibitor, with AlCl_3 is debutylyated to **2a** and **2b**, the oxidized cyclohexadienylidene derivative **3** reacts comparably by concomitant halogenation to **4a** and with AlBr_3 to **4b**, respectively. As products of a side reaction of **6** with TiCl_4 and BBr_3 the tetracyclic benzo[*b*]naphtho[2,1-*d*]furan derivatives **8a** and **8b** are isolated. Selected compounds are investigated for 5-lipoxygenase inhibiting and antioxidative properties. There is a clear-cut correlation of both qualities in those compounds with a 3-OH function and with two, one or without any *tert*-butyl group at the phenyl moiety. In contrast the quinone **6** (3-Cl) and the dibenzofuran **8a** are powerful 5-LOX inhibitors with only low antioxidative activity.

1. Einleitung

Vor einiger Zeit haben wir im Rahmen unserer Untersuchungen zur Synthese von 2-Phenyl-1,4-naphthochinon-Derivaten mit dem Hydroxylierungsmuster von Bioflavonoiden [1] auch eine neue Methode beschrieben. Sie besteht in der stufenweisen Debutylierung von 2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon-Derivaten (z. B. **1**) mit AlCl_3 zu den 2-(4-Hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinonen **2a** und **2b** (Schema 1).

Das Verfahren erwies sich der Meerwein-Arylierung gegenüber deshalb als besonders rationell, weil das durch die *tert*-Butylgruppen optimal abgeschirmte 2,6-Di-*tert*-butylphenol direkt zur Arylierung von 2-Halogen- bzw. 2,3-Dihalogen-1,4-naphthochinonen eingesetzt werden kann [2]. So entstehen in einstufigen Reaktionen ohne zusätzliche Schutzgruppen und ohne aktivierende Funktionen Arylnaphthochinone des Typs **1**.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

2.1. Synthese von 2-(3-Halogen-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinonen

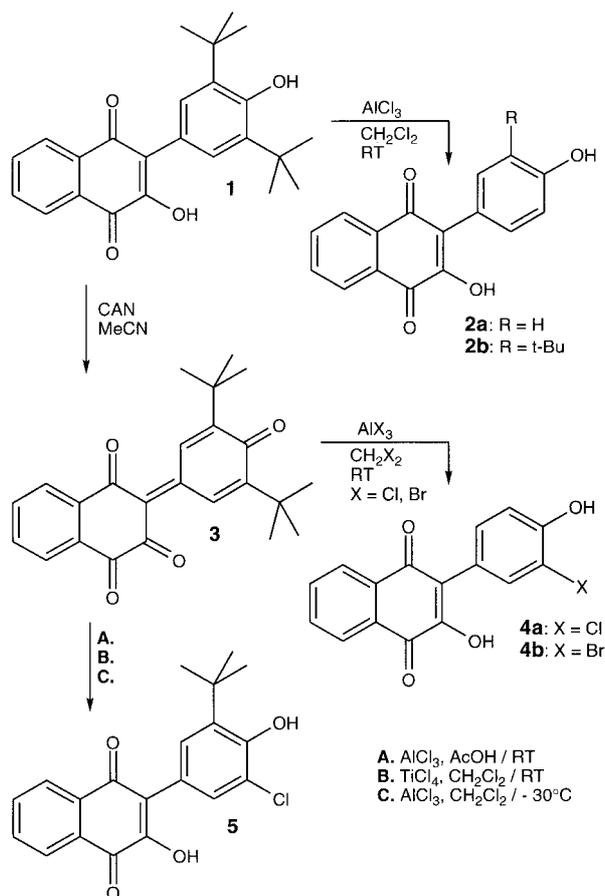
Mit Überraschung wurde festgestellt, daß beim Einsatz von **3** [2], dem Oxidationsprodukt des potenten 5-Lipoxygenase-(LOX)-Inhibitors **1** [3], in dieser Reaktion nicht

nur Debutylierung, sondern gleichzeitig Halogenierung vicinal zur Hydroxyfunktion eintrat (Schema 1). Setzt man allerdings AlBr_3 in die Reaktion mit CH_2Cl_2 als Standardlösemittel ein, so werden Gemische aus **4a** und **4b** gebildet, so daß für die Synthese von reinem **4b** auch das Medium gegen CH_2Br_2 ausgewechselt werden muß. Wird die Reaktion in Eisessig durchgeführt, so tritt bei RT (A, Schema 1) auch nach längerer Reaktionsdauer ausschließlich Monodebutylierung zu **5** ein. Das gleiche Ergebnis wird in CH_2Cl_2 bei RT auch mit TiCl_4 (B, Schema 1), mit AlCl_3 allerdings erst bei Temperaturen $< -10^\circ\text{C}$ (C, Schema 1) erzielt.

Bei Untersuchungen mit weiteren Lewis-Säuren (TiCl_4 und BBr_3) wurde beobachtet, daß auch Verbindungen ohne Enon-Struktur im Seitenring, also Verbindungen des Typs **1**, debutyliert und halogeniert werden können. Als Modellverbindung wurde 2-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon (**6**) eingesetzt (Schema 2) [2].

6 reagiert mit TiCl_4 bei RT mit hoher Selektivität, die mit AlCl_3 nur bei tiefer Temperatur erreichbar war, zu **7a**. Daneben entsteht mit steigender Reagenzkonzentration bis zu 50% der Gesamtausbeute das neue Dibenzofuranderivat **8a**. Die analoge Bromverbindung **8b** entsteht auch mit BBr_3 , allerdings nur in geringer Menge als unbedeutendes Nebenprodukt. Hauptprodukt neben **7b** ist das Brom-*tert*-butyl-derivat **7c**.

Schema 1



5 und **7c** sind nicht Zwischenprodukte für **8a** bzw. **8b**. Setzt man nämlich diese Verbindungen mit TiCl_4 in CH_2Cl_2 um, so können weder **8a** noch **8b** nachgewiesen werden.

Die Positionen der Substituenten 1-Chlor/1-Brom-3-tert-butyl in den Dibenzofuran-Verbindungen **8a/8b** wurden folgendermaßen gesichert: **8a** wurde mit AlCl_3 in CH_2Cl_2 20 Stunden bei RT gerührt und das komplexe Produktgemisch so getrennt. Hierbei konnte eine sehr geringe Menge des Debutylderivats **9** isoliert werden, dessen Struktur NMR spektroskopisch durch die ortho-gekoppelten Protonen in 3- und 4-Stellung bewiesen wurde.

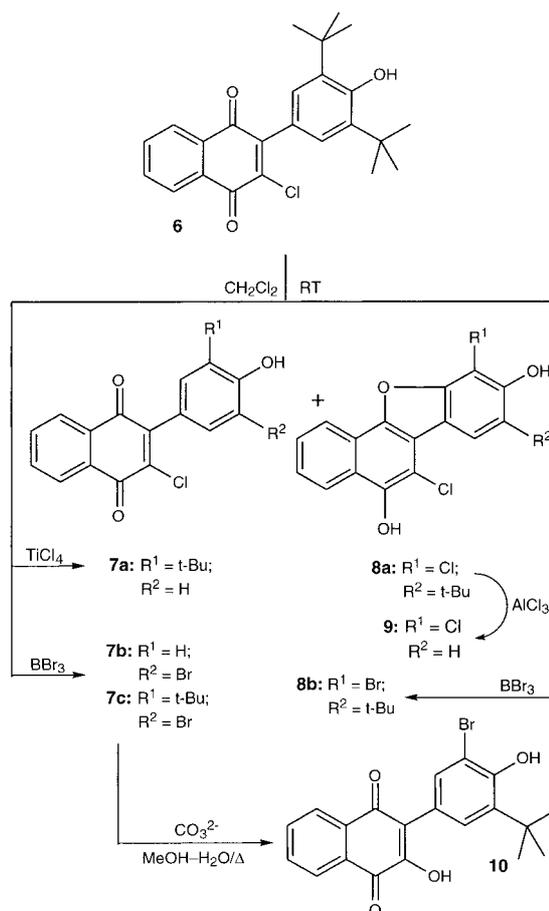
2.2. 5-Lipoxygenase-Hemmung und antioxidative Aktivität

In der Tabelle sind ausgewählte Verbindungen nach steigender 5-LOX-Inhibition und korreliert mit ihrer antioxidativen Aktivität im Vergleich mit dem Standard-5-LOX-Inhibitor **1** gelistet.

Die 5-LOX-Hemmung wurde an stimulierten humanen Granulozyten durch Quantifizierung der LTB_4 -Synthese bestimmt. Durch Löschung der Chemolumineszenz aus der Reaktion von Luminol mit photochemisch generiertem Superoxid (O_2^-) wurde die antioxidative Aktivität der Testverbindungen gemessen. Bei der eingesetzten Methodik werden Lag-Phasen registriert. Positive Lag-Phasen gegenüber der Kontrolle zeigen antioxidative Potenz an, negative Lag-Phasen bedeuten prooxidative Aktivität.

Sowohl für starke 5-LOX-Hemmung als auch ausgeprägte antioxidative Aktivität (O_2^- quenching) sind eine OH-Funktion in 3-Position des Naphthochinonsystems und

Schema 2



wenigstens eine *tert*-Butylgruppe am 2-Phenylring vicinal zur 4'-OH-Funktion erforderlich (**2b**).

Wird die zweite *tert*-Butylgruppe durch Halogen ersetzt (**5** und **10**) fallen beide Aktivitäten gegenüber dem Vergleichsstandard **1** ab. Fehlen die *tert*-Butylgruppen vollständig (**2a**, **4a** und **4b**), so sind die Verbindungen prooxidativ wirksam und nur noch sehr schwache LOX-Inhibitoren. Bemerkenswert ist die starke Hemmung der 5-Lipoxygenase bei nur mäßiger bis schwacher antioxidativer Aktivität durch das Dibenzofuranderivat **8a** und das 3-Chlornaphthochinonderivat **6** (3-Cl), hier müssen andere Hemm-Mechanismen ver-

Tabelle: 5-LOX-Hemmung (LTB_4 -Synthese stimulierter Granulozyten) und antioxidative Aktivität ausgewählter Verbindungen

Verbindung	5-LOX-Hemmung		Anti/prooxidative Kapazität	
	IC_{50} (μM)	% Hemmung $c = 10 \mu\text{M}$	Lag-Phasen $c = 10^{-6} \text{ M}$	Lag-Phasen $c = 10^{-7} \text{ M}$
6 (3-Br)		<15 ^a	56 ± 3	
2a		26	-11 ± 3	-1 ± 2
6 (3-H)		32	64 ± 3	
4a		44	-13 ± 1	-1 ± 2
4b		44	-14 ± 1	-4 ± 4
2b	6.3			74 ± 1
10	6.3			98 ± 5
5	5.3			90 ± 13
6 (3-Cl)	4.4		45 ± 7	
1	3.9			152 ± 10
8a	3.5			35 ± 8

Chemolumineszenz-Löschung: + Lag-Phasen bzw. -Generierung: - Lag-Phasen
^a nicht signifikant gegenüber der Kontrolle; n = 3-4.

mutet werden. Darüber hinaus sind die großen Unterschiede zwischen **6** (3-Cl) und **6** (3-Br) [2] sowie **6** (3-H) [2] bezüglich Enzymbeeinflussung bei gleicher aber schwacher antioxidativer Aktivität besonders auffällig.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

Schmp.: Linström-Gerät, nicht korrigiert. Elementaranalysen: Elemental Analyzer 140 B, Perkin-Elmer. Die Ergebnisse der C-H-Werte entsprachen in den Grenzen von $\pm 0.4\%$ absolut den berechneten Werten. MS: Finnigan MAT CH 7 A. EI-MS: Ionisierungsenergie 70 eV. IR-Spektren: Gitterspektrophotometer 421, Perkin-Elmer. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: Bruker AC 300 (300 MHz, TMS als innerer Standard. Die Auswertung der Spektren erfolgte nach den Regeln 1. Ordnung, hieraus resultieren die teilweise nicht identischen J-Werte [4]. SC: Kieselgel 60 Merck, 0.063–0.2 mm. HPLC: Merck Hitachi (L-6200 Intelligent Pump, D-4250 UV-Vis Detector, D-2500 Chromato-Integrator), Säule (ET 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈, Macherey-Nagel). Festphasenextraktion: RP-18 Säulen (Baker). Zellisolierung: Polymorphprep Nycomed (Lieferfirma Life Technologies GmbH, 76131 Karlsruhe). Photochemoluminometer PHOTOCHEM und ACW-Kit (F. A. T. GmbH, 10559 Berlin).

3.2. Durchführung der Debutylierung

Die Lösungen von 1 mmol der Ausgangsstoffe in 15 ml CH₂Cl₂ oder CH₂Br₂ werden unter Eiskühlung mit der dreifachen Gewichtsmenge der entsprechenden Lewisäure versetzt und 6 h bei RT unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Für die Reaktion von **5** mit AlBr₃ muß CH₂Br₂ als Lösemittel eingesetzt werden. Nach abgeschlossener Reaktion werden die Ansätze in 200 ml Eiswasser gegossen, mit 50 ml CH₂Cl₂ und 5 g EDTA versetzt und 1 h intensiv gerührt. Die CH₂Cl₂-Phasen werden dreimal mit 100 ml H₂O gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und die Produkte entweder direkt durch Konzentration der Lösungen kristallisiert oder nach Einengung zur Trockne sc gereinigt.

3.2.1. 2-(3-Chlor-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon (**4a**)

Aus **3** [2] in CH₂Cl₂ mit AlCl₃. Nach Konzentration der CH₂Cl₂-Lösung orange-rote Nadeln, Ausbeute 63%. Schmp. 210–211 °C (Toluol). IR (KBr, cm⁻¹): 3374 (OH), 1655 (CO). $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]DMSO, ppm): δ = 7.01 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.09 (dd, J = 8.4/2.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2'-H), 7.80–7.88 (m, 2H, 6, 7-H), 7.91 (m, 2H, 5, 8-H), 10.38 (s, 1H, 4'-OH), 11.16 (s, 1H, 3-OH). MS: m/z (%) = 300 (³⁵Cl, M⁺, 52), 265 [(M-Cl)⁺, 100]. C₁₆H₉ClO₄ (300.5)

3.2.2. 2-(3-Brom-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon (**4b**)

Aus **3** in CH₂Br₂ mit AlBr₃. Nach Konzentration der CH₂Br₂-Lösung dunkelrote Nadeln, Ausbeute 51%. Schmp. 233 °C (Toluol). IR (KBr, cm⁻¹): 3348, 3296 (OH), 1660, 1638 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 5.69 (s, 1H, 4'-OH), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 5'-H), 7.45 (dd, J = 8.5/2.0 Hz, 1H, 6'-H), 7.64 (s, 1H, 3-OH), 7.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2'-H), 7.75–7.85 (m, 2H, 6, 7-H), 8.14–8.21 (m, 2H, 5, 8-H). MS: m/z (%) = 344, 346 (1:1, ^{79/81}Br, M⁺, 66), 265 [(M-Br)⁺, 100]. C₁₆H₉BrO₄ (345.2)

3.2.3. 2-(3-tert-Butyl-5-chlor-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon (**5**)

a) Aus **3** mit AlCl₃ in CH₂Cl₂ bei –30 °C und 12 h Reaktionsdauer, Ausbeute nach SC mit CH₂Cl₂ 92%.
b) Aus **3** mit TiCl₄ in CH₂Cl₂ bei RT, Ausbeute nach SC mit CH₂Cl₂ 89%.
c) 15 ml AcOH werden unter Eiskühlung mit 2 g AlCl₃ (fünffache Gewichtsmenge bezogen auf **3**) versetzt. Diesem Ansatz wird 1 mmol (0.38 g) **3** hinzugefügt und 6 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt in Analogie zur allgemeinen Vorschrift. Ausbeute nach SC mit CH₂Cl₂ 74%, Schmp. 159–160 °C (Ligroin). IR (KBr, cm⁻¹): 3460, 3354 (OH), 2961, 2913, 2868 (CH), 1658 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 1.43 (s, 9H, t-Bu), 6.04 (s, 1H, 4'-OH), 7.40 (d, J = 2 Hz, 1H, 6'-H), 7.45 (d, J = 2 Hz, 1H, 2'-H), 7.63 (s, 1H, 3-OH), 7.71–7.85 (m, 2H, 6, 7-H), 8.13–8.22 (m, 2H, 5, 8-H). MS: m/z (%) = 356 (³⁵Cl, M⁺, 65), 341 [(M-Me)⁺, 100]. C₂₀H₁₇ClO₄ (356.8)

3.2.4. 2-(3-tert-Butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon (**7a**)

Siehe 3.2.8.

3.2.5. 2-(3-Brom-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon (**7b**)

Aus **6** [2] mit BBr₃ in CH₂Cl₂ bei RT nach 12 h. Das Rohprodukt wird sc mit Toluol getrennt, die 3. Fraktion (1. Fraktion **8b**, 2. Fraktion **7c**) ent-

hält **7b**, Ausbeute 11%, orange-rote Nadeln, Schmp. 211 °C (Toluol). IR (KBr, cm⁻¹): 3423 (OH), 1670, 1647 (CO). $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]DMSO, ppm): δ = 7.06 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.25 (d, J = 8.4 Hz, 1H, 6'-H), 7.53 (s, 1H, 2'-H), 7.90–7.93 (m, 2H, 6, 7-H), 8.04–8.07 (m, 1H, 8-H), 8.10–8.13 (m, 1H, 5-H), 10.72 (s, 1H, 4'-OH). MS: m/z (%) = 364 (⁸¹Br, M⁺, 24), 283 [³⁵Cl, (M-Br)⁺, 100]. C₁₆H₈BrClO₃ (363.7)

3.2.6. 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon (**7c**)

7c entspricht der 2. Fraktion aus der Reaktion unter 3.2.4., Ausbeute 57%, orangefarbene Nadeln, Schmp. 146–147 °C (Cyclohexan). IR (KBr, cm⁻¹): 3441 (OH), 2952, 2915 (CH), 1671, 1659 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 1.43 (s, 9H, t-Bu), 6.07 (s, 1H, 4'-OH), 7.15–7.18 (m, 1H, 8-H), 7.27 (d, J = 2 Hz, 1H, 6-H), 7.42 (d, J = 2 Hz, 1H, 2'-H), 7.77–7.83 (m, 2H, 6, 7-H), 8.21–8.24 (m, 1H, 5-H). MS: m/z (%) = 420 (⁸¹Br, M⁺, 27), 405 [(M-Me)⁺, 61], 56 (t-Bu⁺, 100). C₂₀H₁₆BrClO₃ (419.7)

3.2.7. 3-tert-Butyl-1-brom-5-chlorbenzo[b]naphtho[2,1-d]furan-2,6-diol (**8b**)

8b entspricht der farblosen Substanz in der 1. Fraktion aus der unter 3.2.4. beschriebenen Reaktion, Ausbeute 3.5%, farblose Nadeln, Schmp. 217–219 °C (Ligroin). IR (KBr, cm⁻¹): 3487 (OH), 2959, 2911, 2870 (CH), 1640, 1625 (C = C:Ar). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 1.54 (s, 9H, t-Bu), 5.58 (s, 1H, 2-OH), 6.06 (s, 1H, 6-OH), 7.57, 7.65 (2dd, J = 7.0/8.2 Hz, J = 7.2/7.7 Hz, 2H, 8, 9-H), 8.17 (s, 1H, 4-H), 8.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 7-H), 8.37 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 10-H). MS: m/z (%) = 420 (⁸¹Br, M⁺, 100), 405 [(M-Me)⁺, 82]. C₂₀H₁₆BrClO₃ (419.7)

3.2.8. 3-tert-Butyl-1,5-dichlorbenzo[b]naphtho[2,1-d]furan-2,6-diol (**8a**)

Aus **6** mit TiCl₄ in CH₂Cl₂ bei RT nach 12 h. Das Rohprodukt wird sc mit Toluol getrennt, die 1. Fraktion enthält **8a**, Ausbeute 46% (die 2. Fraktion **7a** [1], Ausbeute 28%): Farblose Nadeln, Schmp. 231–233 °C (Ligroin). IR (KBr, cm⁻¹): 3507, 3454 (OH), 2952, 2905, 2860 (CH), 1640, 1625 (C = C:Ar). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 1.54 (s, 9H, t-Bu), 5.97 (s, 1H, 2-OH), 6.08 (s, 1H, 6-OH), 7.55–7.68 (m, 2H, 8, 9-H), 8.13 (s, 1H, 4-H), 8.31 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 7-H), 8.36 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 10-H). MS: m/z (%) = 374 (³⁵Cl, M⁺, 100), 359 [(M-Me)⁺, 93]. C₂₀H₁₆Cl₂O₃ (375.3)

3.2.9. 1,5-Dichlorbenzo[b]naphtho[2,1-d]furan-2,6-diol (**9**)

Die Lösung von 0.15 g **8a** in 10 ml CH₂Cl₂ wurde mit 1 g AlCl₃ versetzt und 20 h bei RT gerührt. Danach wurde der Ansatz wie in der allgemeinen Vorschrift (3.2) beschrieben behandelt und der schwarze Rückstand sc mit CH₂Cl₂ gereinigt und getrennt. Es wurden 7 mg einer nahezu farblosen Verbindung gewonnen, Schmp. 215–216 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3433 (stark, OH) 1626 (mittelstark, C = C:Ar). $^1\text{H-NMR}$ ([D₆]Aceton, ppm): δ = 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 3-H), 7.66, 7.76 (2 dd, J = 7.2/8.0 Hz, J = 7.5/7.4 Hz, 2H, 8-/9-H), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 4-H), 8.38 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 7-H), 8.41 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 10-H), 8.89 (s, 1H, 2-OH), 9.39 (s, 1H, 6-OH). MS: m/z (%) = 318 (³⁵Cl, M⁺, 100). C₁₆H₈Cl₂O₃ (319.2)

3.2.10. 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon (**10**)

Die Lösung von 0.8 g **7c** in 60 ml 1 M K₂CO₃-Lösung (MeOH-H₂O = 1 + 1) wird unter N₂ 5 h unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten mit HCl angesäuert, mit 300 mL H₂O versetzt und mit 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die CH₂Cl₂-Phase wird dreimal mit 100 ml CH₂Cl₂ gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach SC mit Toluol – Ausbeute 67% – kristallisiert das Produkt aus Cyclohexan als Solvat mit 0.5 mol C₆H₁₂ in großen orangefarbenen Würfeln, die zwischen 125–127 °C den Kohlenwasserstoff abgeben: Schmp. 139–140 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3494, 3359 (OH), 2956, 2924 (CH), 1661 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, ppm): δ = 1.43 (s, 9H, t-Bu), 5.98 (s, 1H, 4'-OH), 1.44 (d, J = 2 Hz, 6'-H), 7.58 (d, J = 2 Hz, 1H, 2'-H), 7.61 (s, 1H, 3-OH), 7.72–7.76 (m, 1H, 6-H), 7.79–7.83 (m, 1H, 7-H), 8.14 (dd, J = 7.5/1 Hz, 1H, 5-H), 8.20 (dd, J = 7.5/1 Hz, 1H, 8-H). MS: m/z (%) = 400, 402 (1:1, ^{79/81}Br, M⁺, 51), 385, 387 [1:1, (M-Me)⁺, 78], 57 (t-Bu⁺, 84). C₂₀H₁₇BrO₄ (485.4)

3.3. Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Hemmung

Das Literaturverfahren [5] wurde in folgender Weise modifiziert: Die Isolierung der humanen Granulozyten erfolgte aus Citratvollblut mittels Polymorphprep[®]. Die in DMSO gelösten Testsubstanzen wurden mit den in PBS suspendierten Granulozyten versetzt und nach 10 min weitere 5 min lang mit CaCl₂ vorinkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion mit Calciumionophor A 23187 gestartet und nach 5 min mit Nordihydroguaj-

retsäure (gelöst in MeOH/CH₃CN) abgebrochen. Nach Festphasenextraktion wurde der Entzündungsmediator LTB₄ mittels HPLC quantifiziert. Zur Bestimmung der Enzymhemmung wurden die Mittelwerte der LTB₄-Produktion in Anwesenheit (n = 4) und Abwesenheit (n = 4) der Testsubstanzen ins Verhältnis gesetzt. Die Hemmung war statistisch signifikant verglichen mit den Kontrollwerten (Student t-Test, P < 0.05).

3.4. Bestimmung der antioxidativen Kapazität (O₂⁻-Quenching)

Meßprinzip nach Popov et al. [6]: In das Gerät Photochem[®] sind zwei Kammern, die auf kurzem Weg miteinander in Verbindung stehen, eingebaut. In der ersten Kammer wird durch UV-Bestrahlung einer wäßrigen Luminollösung bei pH 10.8 (ACW-Kit) O₂⁻ generiert, das, in die zweite dunkle Kammer gepumpt, in chemischer Reaktion mit Luminol unter Aussendung von Chemolumineszenz reagiert. Das Chemolumineszenzsignal wird in einem Photomultiplier verstärkt und registriert. Befindet sich in dem System ein O₂⁻-Quencher, so kommt es zur Lumineszenzlöschung und Ausbildung von Lag-Phasen, die in Sekunden registriert werden. Schwache Hemmer wurden bei c = 10⁻⁶, starke bei 10⁻⁷ mol/l gemessen.

* 26. Mitt.: Wurm, G.; Gurka, H.-J.: Pharmazie **52**, 739 (1997)

Literatur

- 1 Wurm, G.; Gurka, H.-J.: Pharmazie **52**, 739 (1997)
- 2 Wurm, G.: Arch. Pharm. (Weinheim) **324**, 491 (1991)
- 3 Wurm, G.; v. Bruchhausen, F.; Kloth, W.: in: Hirschelmann, R. (Hrsg.): Beiträge des Joint Meeting 8. Hallesches Sommerkolloquium „Entzündung“/8. Symposium „Potentielle Arzneistoffe“ 1992, veröffentlicht durch Jenapharm GmbH, Jena 1993
- 4 Günther, H.: NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973
- 5 Dannhardt, G.; Lehr, M.: J. Pharm. Pharmacol. **44**, 419 (1992)
- 6 Popov, I.; Lewin, G. I.: Phys. Chem. Biol. and Med. **1**, 75 (1994)

Eingegangen am 20. Oktober 1998

Angenommen am 22. Dezember 1998

Prof. Dr. G. Wurm
Institut für Pharmazie
Königin-Luise-Str. 2 + 4
D-14195 Berlin-Dahlem