

Institut für Pharmazeutische Chemie¹ und Institut für Anorganische Chemie² der Technischen Universität Braunschweig, Institut für Chemie³, Universität Magdeburg, Germany

Farbreaktionen zur Identitätsprüfung von Nalidixinsäure

K. GÖRLITZER¹, G. BADIA¹, P. G. JONES² und A. K. FISCHER³

Nalidixinsäure (**1**) gibt mit 2-Naphthol einen gelben Charge-Transfer-Komplex. Die 7-Methyl-Gruppe von **1** kondensiert mit Vanillin (**2**) und Ehrlich's Reagenz (**4**) zu den farbigen (*E*)-Benzyliden-Verbindungen **3** und **5**. Behandlung von **1** mit Thionylchlorid und anschließende Reaktion mit Aminopyrazolon (**6**) und Natriumacetat führt zu einem Gemisch aus Trichlornalidixinsäure (**7**) und deren 3-Carbonsäureamid **8**. Die Trichlormethyl-Gruppe von **7** setzt sich mit **6** in Pyridin zum Amid **9** um. **1** reagiert mit 1,3-Dimethylbarbitursäure (**10**) in Acetanhydrid/Eisessig zu den Polymethinfarbstoffen **11–13**, deren Strukturen durch Röntgenkristallanalysen bewiesen werden. Die Farbstoffe **3** und **12** hemmen das Wachstum von *Staphylococcus aureus* bzw. *Escherichia coli*.

Identification tests of nalidixic acid by colour reactions

Nalidixic acid (**1**) gives with 2-naphthol a yellow charge-transfer complex. The 7-methyl group of **1** condenses with vanillin (**2**) and Ehrlich's reagent (**4**) to the coloured (*E*)-benzylidene compounds **3** and **5**. Treating **1** with thionyl chloride and subsequent reaction with aminopyrazolone (**6**) and sodium acetate leads to a mixture of trichloronalidixic acid (**7**) and its 3-carboxamide **8**. The trichloromethyl group of **7** is converted with **6** in pyridine to form the amide **9**. Nalidixic acid reacts with 1,3-dimethylbarbituric acid (**10**) in acetanhydride/acetic acid to yield the polymethine dyes **11–13**, whose structures are confirmed by X-ray crystal structure analyses. The dyes **3** and **12** inhibit the growth of *staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively.

1. Einleitung

Ph. Eur. 1997 [1] lässt zur Prüfung des ersten Gyrasehemmers Nalidixinsäure auf Identität als Alternative zum IR-Spektrum die Bestimmung der UV-Absorptionsmaxima in alkalischer Lösung, die Anfertigung eines DC und eine Farbreaktion zu. Letztere besteht darin, dass mit 2-Naphthol in salzsaurer Lösung eine orangerote Färbung auftritt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist unbekannt. Über die Strukturklärung des Farbproduktes, die Spezifität der Farbreaktion sowie alternative Nachweise von Nalidixinsäure wird hier berichtet.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

2.1. Chemie

1966 beschrieben italienische Autoren [2] eine Reaktion von Nalidixinsäure (**1**) mit 2-Naphthol, die sich auch zur quantitativen Bestimmung eignet. Das Reaktionsprodukt zeigte im Elektronenspektrum ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 351$ nm. Bei den Untersuchungen konnten jedoch nur die Ausgangssubstanzen detektiert werden, so dass auf das Vorliegen eines Charge-Transfer-Komplexes geschlossen werden muß.

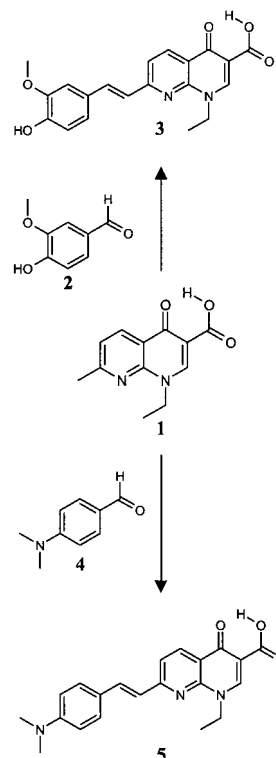
Zur Prüfung auf Selektivität wurde als Vertreter der modernen Gyraseinhibitoren das Fluorochinolon Ciprofloxacin Ph. Eur. 1997 herangezogen. Ciprofloxacin ging jedoch mit 2-Naphthol keine Farbreaktion ein.

Nach Jap. XIII [3] wird Nalidixinsäure mit Vanillin (**2**) in schwefelsaurer Lösung erhitzt, wobei eine orangerote Färbung auftritt und sich beim Abkühlen ein orange-gelber Niederschlag bildet. Bei dem präparativ dargestellten Reaktionsprodukt handelte es sich um die durch Kondensation der CH-aciden Methyl-Gruppe des 1,8-Naphthyridins mit dem Aldehyd **2** entstandene (*E*)-Benzyliden-Verbindung **3**. In gleicher Weise gelang die Umsetzung von **1** mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd (**4**, Ehrlich's Reagenz) in verd. Schwefelsäure zum orange-gelb gefärbten Cyanin **5**. Die (*E*)-Konfiguration bei **3** und **5** wird durch die große

Kopplungskonstante ($J = 16$ Hz) der olefinischen Protonen im ¹H-NMR-Spektrum bewiesen. Da die als Gyrasehemmer eingesetzten Fluorochinolone wie Ciprofloxacin keine CH-acide Methyl-Gruppe aufweisen, sind auch diese Farbreaktionen für Nalidixinsäure spezifisch.

Ph. Eur. 1997 lässt bei der Prüfung von Natriumcromoglicat auf Identität mit Aminopyrazolon (**6**) und Salzsäure erhitzen, wobei Gelbfärbung auftritt. Im Gegensatz zur 4-Chromon-Partialstruktur der Cromoglicinsäure reagiert Nalidixinsäure jedoch nicht mit der Carbonyl-Funktion des

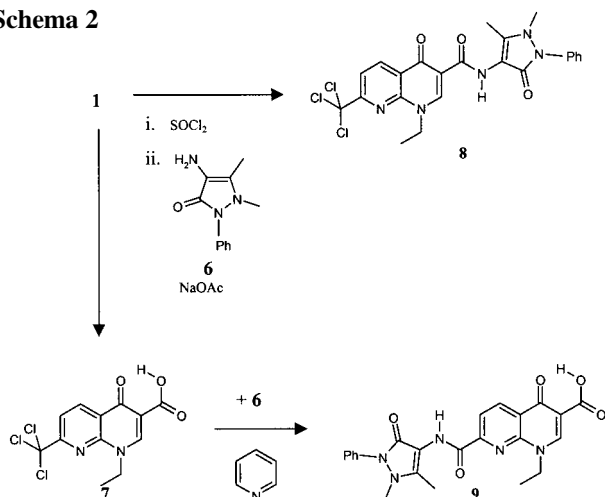
Schema 1



4-Pyridons. Kürzlich wurde aber berichtet, daß 4-Chinolon-3-carbonsäuren nach Behandlung mit Thionylchlorid und anschließender Reaktion mit primären Aminen neben der Aminolyse des gebildeten Carbonsäurechlorids auch zu vinylogen Amidinen führen [4].

Wurde **1** zuerst mit Thionylchlorid und dann mit **6** und Natriumacetat-Lösung umgesetzt, so resultierte ein Gemisch, welches sich durch FC in die Trichloralidixinsäure **7** [5] und deren 3-Carbonsäureamid **8** trennen ließ. **7** reagierte mit **6** in Pyridin zum 7-Carbonsäureamid **9**. Kondensationsprodukte an der 4-Pyridon-Gruppe waren in keinem Fall nachweisbar.

Schema 2



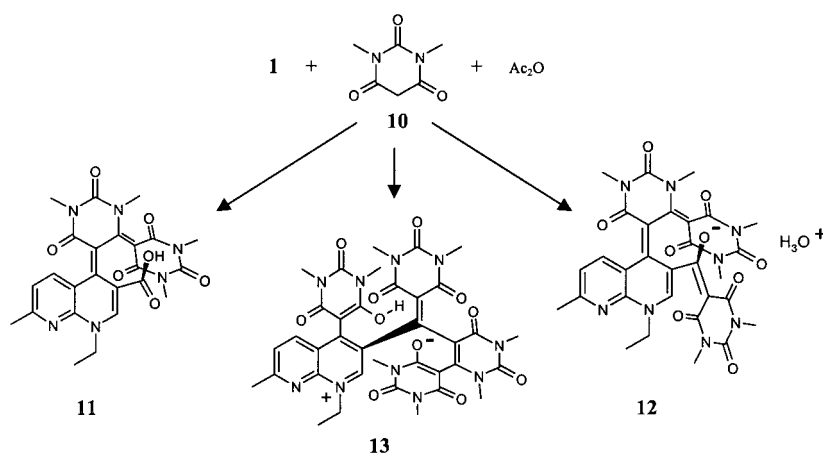
Nach Eiden lassen sich 4-Pyridone durch Erhitzen mit C,H-aciden Komponenten in einem Gemisch aus Acetanhydrid und Eisessig zu gelben 1,4-Dihydropyridin-4-yliden-Derivaten [6] kondensieren. In analoger Weise wurden aus 4-Chinolonen orange bis rot gefärbte 1,4-Dihydrochinolin-4-yliden-Derivate [7] dargestellt. Wurden äquimolare Mengen von **1** und 1,3-Dimethylbarbitursäure (DMBS) (**10**) in Acetanhydrid/Eisessig erhitzt, so trat allmählich Rotfärbung auf. Im DC ließen sich drei rote Substanzen nachweisen. Bei der präparativen Aufarbeitung des Ansatzes konnten nach Entfernen unumgesetzten Eduktes **1** durch fraktionierende Kristallisation nacheinander die Substanzen **11–13** isoliert werden. Aus ethanolischer Lösung kristallisierte **11** aus, das nach MS und Elementaranalyse aus 1 mol **1** und 2 mol **10** unter Eliminierung von 2 mol Wasser entstanden sein musste. Die Substanz ist in Natriumhydrogencarbonat-Lösung löslich, was für eine un-

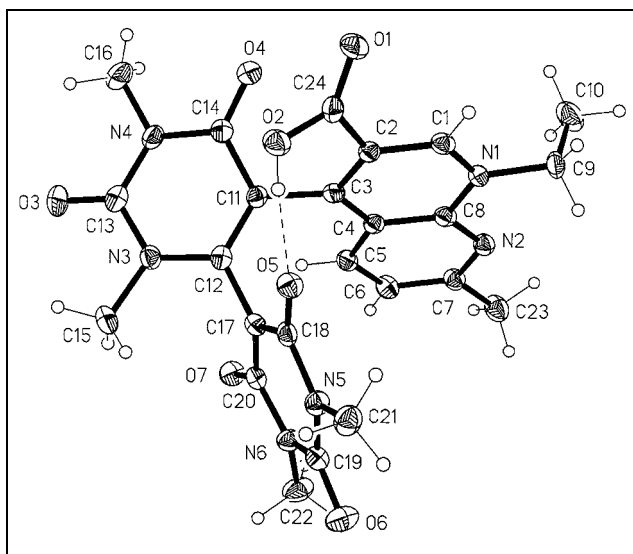
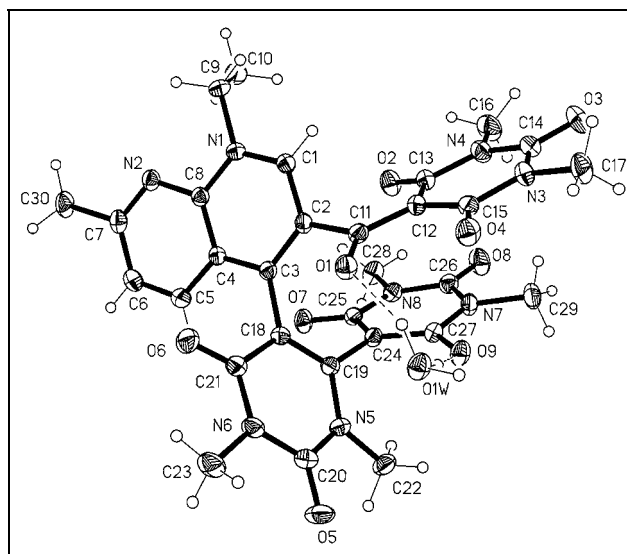
veränderte Carbonsäure-Funktion spricht. Nach dem ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum sind die *N*-Ethyl- und die *C*-Methyl-Gruppe im 1,8-Naphthyridin-Ring erhalten geblieben; für die *N*-Methyl-Gruppen der Barbitursäure-Komponente werden jeweils vier Signale registriert. Auch das Vis-Spektrum mit dem langwelligen Maximum bei $\lambda = 450$ nm paßt zu dem unsymmetrisch substituierten Merocyanin **11**. Kristallisiert man den Rückstand der Mutterlauge von **11** aus Ethylacetat um, so fällt **12** an. Bei **12** liegt nach dem MS ein Kondensationsprodukt von 1 mol **1** und 3 mol **10** unter Verlust von 3 mol Wasser vor. Aufgrund der NMR-Daten sind die *N*-Ethyl- und die *C*-Methyl-Gruppe vorhanden, und es werden 6 separierte Resonanzsignale für die *N*-Methyl-Gruppen aufgezeichnet. Die Alkalilöslichkeit und die Lichtabsorption mit $\lambda_{\text{max}} = 433$ nm machen die gleiche Partialstruktur wie bei **11** wahrscheinlich. Die Stellung des dritten DMBS-Substituenten bleibt zunächst unbekannt. Aus der Mutterlauge von **12** wird **13** gewonnen. Nach dem MS ist **13** aus 1 mol **1** und 4 mol DMBS unter Abspaltung von 4 mol Wasser gebildet worden. Laut NMR-Spektren liegt ebenfalls ein unsymmetrisches Molekül vor, da jeweils 8 voneinander getrennte Singulets für *N*-Methyl-Gruppen auftreten. Auch hier sind die *N*-Ethyl- und die *C*-Methyl-Gruppe unversehrt geblieben, und die Substanz ist alkalilöslich. Das langwellige Maximum im Elektronenspektrum ist gegenüber **11** und **12** bathochrom verschoben; **13** absorbiert bei $\lambda_{\text{max}} = 473$ nm. Strukturüberlegungen haben hier nur noch spekulativen Charakter.

2.2. Röntgenstrukturanalysen

Für den sicheren Strukturbeweis der drei Farbstoffe **11–13** waren Röntgenkristallstrukturanalysen zwingend erforderlich. Von allen drei Verbindungen gelang die Herstellung von Einkristallen ausreichender Reinheit, Größe und Stabilität. Die für **11** vermutete Struktur wurde durch Röntgenbeugung bestätigt. Danach gibt die Hydroxyl-Gruppe der Carboxyl-Funktion mit der DMBS-4''-Oxo-Gruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung [O(2)...O(5) in der Abb.]. Die Struktur enthält drei Moleküle Essigsäure (nicht abgebildet), von denen eines ein konventionelles Carbonsäure-Dimer bildet, die anderen beiden geben H-Brücken zu den Atomen O(4) und O(7). Das aus der Elementaranalyse ermittelte Vorliegen von **12** als Monohydrat erwies sich durch die Kristallanalyse als Oxonium-olat. O(1) trägt die negative Ladung, da die Bindung C(11)–C(12) kürzer ist als die Bindungen C(12)–C(13) und C(12)–C(15). Außerdem ist die Bindung

Schema 3



Abb. 1: Röntgenstruktur von **11** (ohne Solvensmoleküle)Abb. 2: Röntgenstruktur von **12**

C(11)–O(1) länger als die Bindungen C(13)–O(2) und C(15)–O(4) (Abb.2). Das Oxonium-Ion bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen aus; eine davon mit der DMBS-4''-Oxo-Gruppe, die zweite mit dem negativ geladenen Sauerstoff des vinylogenen Carboxylats, das nach Dissoziation aus dem Kondensationsprodukt der 3-Carbonsäure-Funktion mit DMBS resultiert, und die dritte zu O(7) eines Nachbarmoleküls in x -Richtung. Somit bilden die Ionen Ketten parallel zur x -Achse (Abb. 3; die H-Brücken sind fett gezeichnet). **13** liegt als Zwitter-Ion vor. Die Bindungslängen sind konsistent mit der Annahme, dass das Atom N(1) des 1,8-Naphthyridins die positive Ladung trägt, die durch die negative Ladung am Sauerstoff O(3) des am weitesten entfernten DMBS-Substituenten kompensiert wird. Dieses Olat wird durch eine intramolekulare H-Brücke mit einer enolischen Hydroxyl-Gruppe am O(11) des 4-DMBS-Substituenten stabilisiert. **13** repräsentiert einen Polymethin-Farbstoff, bei dem ein Cyanin-Element (1,8-Naphthyridin mit 4-Substituent) mit einem Pentamethin-Oxonol über eine Einfach-Bindung (ausgehend von C-3 des 1,8-Naphthyridins) gekoppelt ist [8]. Diese Wechselwirkung der π -Elektronensysteme ist für die bathochrome Verschiebung gegenüber den Merocyaninen **11** und **12** verantwortlich.

2.3. Antimikrobielle Aktivität

Die Substanzen **3**, **5**, **7**, **9**, **11**, **12** und **13** wurden in einem Agar-Diffusionstest in Konzentrationen von 10 mg/ml gegen den Schimmelpilz *Aspergillus niger*, den Hefepilz *Candida albicans*, das gramnegative Bakterium *Escherichia coli*, den gramnegativen „Problemkeim“ *Pseudomonas aeruginosa* und das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* getestet. Die zu untersuchenden Reinsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid gelöst. 50 μ l der Lösung wurden auf ein Antibiotikatestplättchen (Fa. Oxoid, \varnothing 6 mm) aufgetragen. Pro Testkeimserie wurde ein Referenzplättchen mit Nalidixinsäure (Nx) für die Bakterien und ein Referenzplättchen mit Clotrimazol (Ct) für die Pilze aufgelegt. Die Kulturen wurden auf Müller-Hinton-Agar 24 h bei 37 °C bebrütet. Zur Auswertung wurde der Radius der Hemmhofringe um das Testplättchen gemessen. Dabei bedeutet ein Radius <1 mm keine Wuchshemmung, von 1–3 mm schwache Wuchshemmung, von 3–9 mm starke Wuchshemmung und ein Radius >9 mm sehr starke Wuchshemmung (Tabelle 1). Die Trichloralidixinsäure (**7**) [5] ist gegen alle geprüften Mikroorganismen wirksam. Von den Farbstoffen ist **3** ge-

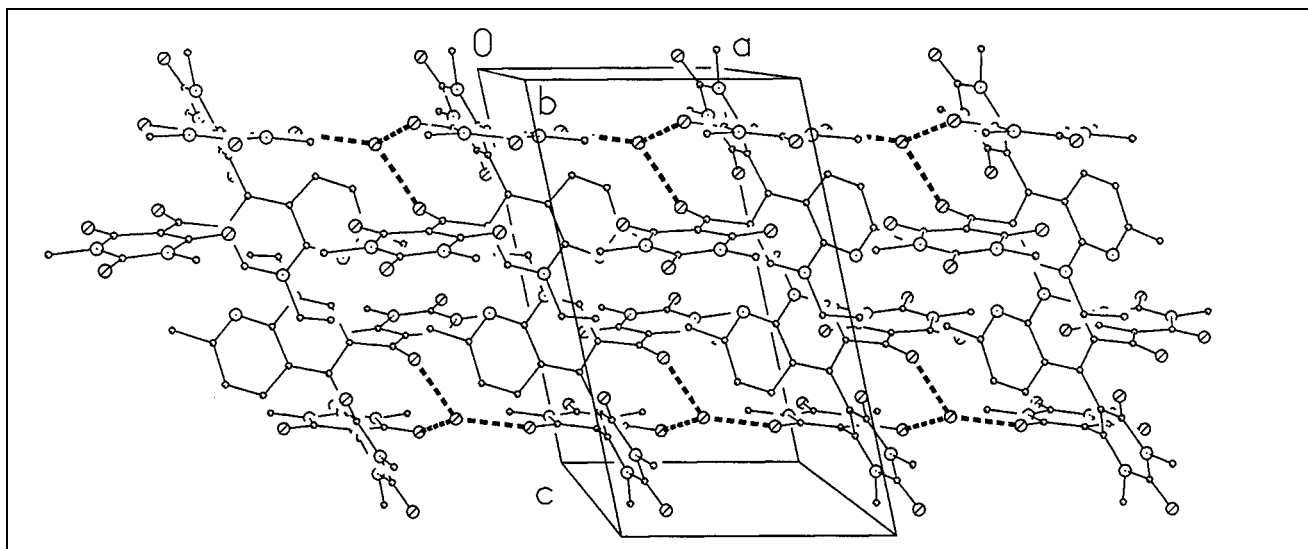
Abb. 3: Packungsbild von **12**

Tabelle 1: Antimikrobielle Aktivität der Testsubstanzen

Substanz	Wirkung auf				
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	–	–	–	–	++
5	–	–	–	–	–
7	+	++	++	+++	+
9	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–
12	–	–	++	–	–
13	–	–	+	–	–
Nx	–	–	+++	++	++
Ct	+++	+++	–	–	–

– keine Hemmung, + schwache Hemmung, ++ starke Hemmung, +++ sehr starke Hemmung

Tabelle 2: Röntgenographische Daten

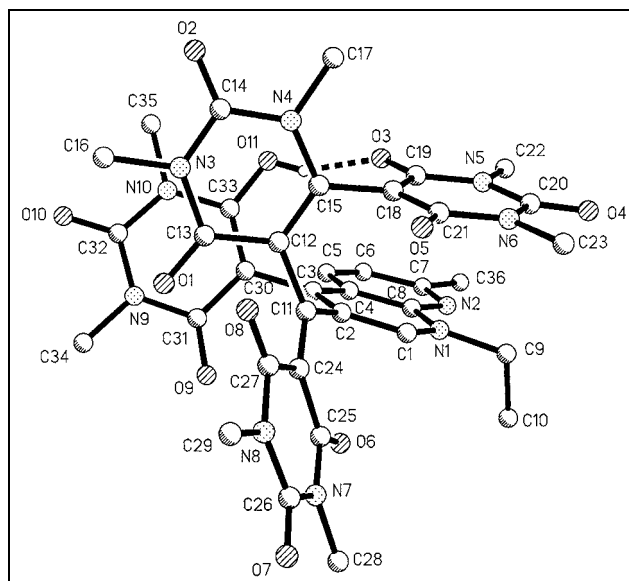
Verbindung	11 × 3CH ₃ COOH	12	13 × 3CHCl ₃
Formel	C ₃₀ H ₃₆ N ₆ O ₁₃	C ₃₀ H ₃₂ N ₈ O ₁₀	C ₃₉ H ₃₉ Cl ₉ N ₁₀ O ₁₁
M _r	688.65	664.64	1142.85
Habitus	gelbe Tafel	roter Block	roter Block
Kristallgröße (mm)	0.31 × 0.24 × 0.08	0.4 × 0.35 × 0.25	0.8 × 0.5 × 0.2
Kristallsystem	triklin	triklin	monoklin
Raumgruppe	P(–1)	P(–1)	P2 ₁ /n
Gitterkonstanten:			
a (Å)	11.093(2)	8.447(2)	15.069(3)
b (Å)	11.892(2)	12.865(3)	17.463(3)
c (Å)	13.842(3)	14.260(4)	18.633(2)
α (°)	103.525(5)	81.744(10)	90
β (°)	97.345(6)	78.525(10)	93.406(10)
γ (°)	111.165(6)	79.404(10)	90
V (Å ³)	1609.5	1483.5	4894.8
Z	2	2	4
D _x (Mg m ^{–3})	1.421	1.488	1.551
μ (mm ^{–1})	0.11	0.11	0.58
F(000)	724	696	2336
T (°C)	–130	–100	–100
2θ _{max}	55	56	50
Zahl der Reflexe:			
gemessen	8011	9875	25487
unabhängig	6777	6960	8581
R _{int}	0.021	0.016	0.021
Parameter	455	453	654
Restraints	0	0	739
wR(F ² , alle Refl.)	0.139	0.127	0.227
R(F, >4σ(F))	0.052	0.048	0.075
S	0.89	1.03	1.05
max. Δσ	0.002	0.02	0.014
max. Δρ (e Å ^{–3})	0.60	0.30	1.00

gen *Staphylococcus aureus* und **12** gegen *Escherichia coli* aktiv. Alle anderen Verbindungen erwiesen sich als unwirksam.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

Schmp.: Linström-Gerät (SPA-1, Fa. Bühler), nicht korrigiert. Elementaranalysen: C–H–N–O Elemental Analyzer 1106, Carlo Erba; die Ergebnisse lagen bei den verschiedenen Verbindungen innerhalb der üblichen analytischen Grenzen. IR-Spektren: Philips PU 9800 FT-IR und ATI Mattson Genesis Series FT-IR. UV-Spektren: Philips PU 8730 UV/VIS-Spektrometer. MS: Finnigan-MAT 8430 (Institut für Organische Chemie der TU-Braunschweig); Elektronenstoßionisation: Ionisierungsenergie 70 eV. ¹H-NMR (400,13 MHz)- und ¹³C-NMR (100,61 MHz)-Spektren: Bruker AM 400, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU-Braunschweig. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm nach der δ_{TMS}-Skala angegeben. ¹³C-NMR: die Abkürzung C-q bezeichnet die quartären Kohlenstoffatome. Hochleistungs-Säulen-Flüssig-Chromatographie (HPLC): LiChrograph® L-6200 Gradientenpumpe, DAD L-4500 Diode Array Detector, LiChroCART® Auto-fix, PC 486 DX, D-6500 Chromatography Data Station Software, DAD System Manager. (1) Säule: LiChroCART® 125-4

Abb. 4: Röntgenstruktur von **13** (ohne Solvensmoleküle)

LiChrospher® 100 RP-8 (5 m) mit Vorsäule 50963 select B. Eluent: CH₃CN = 100; Fluß: 1.000 ml · min^{–1}, isokratisch, Injektionsvolumen: 20 µl; Detektion (UV): 250 nm; Totzeit t_M = 1.29 min ermittelt mit Thioharnstoff. (2) Säule: LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 m) mit Vorsäule 50963 select B. Eluent: Phosphatpuffer pH 2.3 = 100; Fluß: 1.000 ml · min^{–1}, isokratisch, Injektionsvolumen: 20 µl; Detektion (UV): 250 nm; Totzeit t_M = 1.15 min ermittelt mit Thioharnstoff. Nettoerhaltungszeit (t_s) in Minuten.

3.2. 1-Ethyl-7-[(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-ethenyl]-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-carbonsäure (**3**)

0,20 g (0,86 mmol) Nalidixinsäure (**1**) und 0,20 g (1,3 mmol) Vanillin (**2**) werden in 20 ml H₂O und 10 ml konz. H₂SO₄ gelöst und 5 min unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der orangefarbene Niederschlag abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Gelbe Kristalle, Schmp.: 302 °C (EtOH). Ausbeute: 0,09 g (1,4%). IR (KBr): ν̄ = 3450 cm^{–1} (OH), 1741 (C=O, COOH), 1616 (C=O), 1581 (C=C), 1553 (C=N). UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 275 nm (3,93), 299 (3,95), 390 (4,18). UV (1N–NaOH): λ_{max} (lg ε) = 274 nm (4,24), 318 (4,00), 430 (4,47). UV (H₂SO₄ 64%): λ_{max} (lg ε) = 243 nm (4,17), 269 (4,18), 302 (3,88), 401 (3,84), 526 (4,57). ¹H-NMR ([D₆] DMSO): δ (ppm) = 1,48 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 4,70 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂CH₃), 6,83 (d, J = 8 Hz, 5''-H), 7,18 (d, J = 8 Hz, 6''-H), 7,33 (d, J = 16 Hz, 2'-H), 7,38 (s, 2''-H), 7,81 (d, J = 8 Hz, 6-H), 7,88 (d, J = 16 Hz, 1'-H), 8,63 (d, J = 8 Hz, 5-H), 9,18 (s, 2-H), 9,56 (s, OH), 15,00 (s, COOH). ¹³C-NMR ([D₆] DMSO): δ (ppm) = 15,00 (CH₃), 46,66 (CH₂), 55,63 (OCH₃), 108,45 (C-3), 110,74 (C-2''), 115,58 (C-5''), 118,41 (C-4a), 120,51 (C-6), 122,51 (C-6''), 123,45 (C-5), 127,05 (C-1''), 135,83 (C-2'), 138,44 (C-1'), 147,92 (C-4''), 148,69 (C-3''), 149,63 (C-2), 160,23 (C-7, C-8a), 165,58 (COOH), 177,70 (C-4). MS (EI): m/z (%) = 366 (100) [M]⁺. HPLC (1): t_s = 0,20. C₂₀H₁₈N₂O₅ (366,4)

3.3. 7-[(E)-2-[4-(Dimethylamino)phenyl]-1-ethenyl]-1-ethyl-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-carbonsäure (**5**)

0,40 g (1,7 mmol) **1** und 0,40 g (2,7 mmol) N,N-Dimethylaminobenzaldehyd (**4**) werden in 20 ml H₂O und 20 ml konz. H₂SO₄ gelöst und 45 min unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die gelbe Lösung mit 40 ml H₂O verdünnt und mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und i. V. abdestilliert. Rote Kristalle, Schmp.: 295 °C. Ausbeute: 0,39 g (62%). IR (KBr): ν̄ = 1719 cm^{–1} (C=O, COOH), 1611 (C=O), 1578 (C=C), 1554 (C=N). UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 225 nm (3,68), 278 (3,72), 316 (3,55), 440 (3,95). UV (H₂SO₄ 32%): λ_{max} (lg ε) = 242 nm (4,02), 286 (4,18), 372 (4,18). ¹H-NMR (F₃CCOOD): δ (ppm) = 1,84 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3,54 (s, 6H, NCH₃), 5,20 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂CH₃), 7,63 (d, J = 16 Hz, 2'-H), 7,75 („d“, N = 9 Hz, 2H, 3''-H, 5''-H), 8,02 („d“, N = 9 Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 8,16 (d, J = 9 Hz, 6-H), 8,28 (d, J = 16 Hz, 1'-H), 9,04 (d, J = 9 Hz, 5-H), 9,61 (s, 2-H). ¹³C-NMR (F₃CCOOD): δ (ppm) = 16,03 (CH₃), 49,28 (2NCH₃), 53,25 (CH₂), 107,01 (C-3), 117,68 (C-4a), 122,57 (C-3''), C-5''), 126,82 (C-6), 130,55 (C-5), 132,54 (C-2''), C-6''), 137,93 (C-2'), 140,56 (C-1''), 141,70 (C-1'), 144,59 (C-7), 151,22 (C-4''), 152,57 (C-2), 166,47 (C-8a), 171,66 (COOH), 174,90 (C-4). MS (EI): m/z (%) = 363 (100) [M]⁺. HPLC (1): t_s = 3,42. C₂₁H₂₁N₃O₃ (363,4)

3.4. *N*-(1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1*H*-4-pyrazolyl)-1-ethyl-4-oxo-7-trichlormethyl-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-carbonsäureamid (8)

0,50 g (2 mmol) **1** werden in 10 ml redestilliertem SOCl₂ gelöst und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wird i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wird mit C₆H₆ gewaschen und i. Vak. über KOH-Plättchen getrocknet. Anschließend wird mit 5 ml eiskaltem H₂O, 1 g NaOAc und 0,82 g (4 mmol) Aminopyrazolon (**6**) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit H₂O gewaschen und fe aufgearbeitet (Fließmittel: Petroläther/EtOAc/AcOH, 45:45:10). Dabei wird die Trichlormethylalidindixinsäure (**7**) als erste, das Produkt als zweite Fraktion isoliert. Farblose Nadeln, Schmp.: 213 °C. Ausbeute: 0,035 g (3,1%). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1671 cm⁻¹ (C=O, CONH), 1601 (C=O), 1561 (C=C), 1538 (C=N). UV (Dioxan): λ_{max} (lg ϵ) = 240 nm (4,36), 265 (4,38), 310 (4,20), 338 (4,05). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,56 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, 5'-CH₃), 3,11 (s, 3H, NCH₃), 4,57 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂CH₃), 7,26-7,29 (m, 4''-H), 7,43-7,50 (m, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 8,10 (d, J = 8 Hz, 6-H), 8,96 (d, J = 8 Hz, 5-H), 9,02 (s, 2-H), 10,97 (s, CONH). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 12,22 (CH₃), 15,01 (5'-CH₃), 36,48 (NCH₃), 47,87 (CH₂), 90,62 (CCl₃), 109,26 (C-3), 113,81 (C-4'), 116,71 (C-2), 122,97 (C-4a), 123,78 (C-2''), C-6''), 126,38 (C-4''), 129,10 (C-3''), C-5''), 135,14 (C-1''), 139,42 (C-6), 147,29 (C-7), 148,85 (C-5), 150,19 (C-5'), 160,40 (CONH), 161,82 (C-8a), 163,82 (C-3'), 175,92 (C-4). MS (EI): m/z (%) = 519 (42) [M]⁺ (³⁵Cl), 317 (100). HPLC (1): t_s = 0,63. C₂₃H₂₀Cl₃N₅O₃ (520,8)

3.5. 7-[[1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1*H*-4-pyrazolyl]amino] = carbonyl]-1-ethyl-4-oxo-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-carbonsäure (9)

0,25 g (0,75 mmol) Trichlormethylalidindixinsäure (**7**) [2] und 0,30 g (1,5 mmol) Aminopyrazolon (**6**) werden in 7 ml Pyridin bei 80 °C 9 h gerührt. Die Lösung wird mit 3N-H₂SO₄ angesäuert und mit CHCl₃ ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. abdestilliert. Orangefarbene Kristalle, Schmp.: 316 °C. Ausbeute: 0,14 g (42%). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3441, 3304 cm⁻¹ (NH), 1720 (C=O, COOH), 1685, 1646 (C=O), 1617, 1551 (C=C, C=N). UV (EtOH): λ_{max} (lg ϵ) = 232 nm (4,18), 267 (4,25), 346 (3,79). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,61 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,47 (s, 3H, 5'-CH₃), 3,19 (s, 3H, NCH₃), 4,68 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂CH₃), 7,36 (t, J = 7 Hz, 4''-H), 7,42 (dd, ³J = 7 Hz, ⁴J = 1 Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 7,51 (t, J = 8 Hz, 2H, 3''-H, 5''-H), 8,39 (d, J = 8 Hz, 6-H), 8,99 (s, 2-H), 9,01 (d, J = 8 Hz, 5-H), 9,40 (s, CONH), 14,21 (s, COOH). ¹³C-NMR (F₃CCOOH): δ (ppm) = 10,87 (CH₃), 16,04 (5'-CH₃), 34,91 (NCH₃), 53,60 (CH₂), 103,55 (C-3), 109,06 (C-4a), 121,96 (C-4'), 126,03 (C-4''), 130,30 (C-2''), C-6''), 130,94 (C-1''), 132,87 (C-3''), C-5''), 135,23 (C-6), 141,37 (C-5), 147,62 (C-5'), 149,85 (C-7), 154,59 (C-8a), 154,66 (C-2), 156,27 (CONH), 166,25 (COOH), 171,02 (C-3'), 176,47 (C-4). MS (EI): m/z (%) = 447 (47) [M]⁺, 57 (100). HPLC (1): t_s = 0,39. C₂₃H₂₁N₅O₅ (447,4)

3.6. 1-Ethyl-7-methyl-4-[1,3-dimethyl-2,6-dioxo-4-(1,3-dimethyl-2,4,6-trioxohexahydropyrimidin-5-yliden)hexahydropyrimidin-5-yliden]-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-carbonsäure (11)

1,16 g (5 mmol) **1** und 0,78 g (5 mmol) 1,3-Dimethylbarbitursäure (**10**) werden in 40 ml einer Mischung aus Ac₂O und AcOH (2 + 1) 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die überschüssige **1** abfiltriert und mit AcOH gewaschen. Das Lösemittel wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand unter Erhitzen in EtOH gelöst. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt aus. Das Filtrat wird zur Isolierung von **12** verwendet. Orangefarbene Kristalle, Schmp.: 270 °C (EtOH). Ausbeute: 0,046 g (1,8%). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1726 cm⁻¹ (C=O, COOH), 1701, 1684, 1640 (C=O), 1609 (C=C). UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 253 nm (4,29), 323 (4,21), 450 (3,22). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,76 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,89 (s, 3H, 7-CH₃), 2,93, 3,15, 3,38, 3,50 (4s, 12H, NCH₃), 5,16-5,31 (m, 2H, CH₂), 7,60 (d, J = 9 Hz, 6-H), 8,69 (d, J = 9 Hz, 5-H), 9,47 (s, 2-H). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 15,85 (CH₃), 26,09 (7-CH₃), 27,39, 27,95, 28,71, 33,75 (4 NCH₃), 51,80 (CH₂), 85,35, 106,60, 122,99 (3 C-q.), 126,52 (C-6), 131,55 (C-q.), 138,83 (C-2), 146,00 (C-q.), 148,30 (C-5), 152,06, 152,43, 153,10, 153,89, 160,45, 161,12, 161,76, 165,19, 169,14 (9 C-q.). MS (EI): m/z (%) = 508 (0,6) [M]⁺, 464 (100). HPLC (1): t_s = 0,61. C₂₄H₂₄N₆O₇ (508,5)

3.7. Oxonium(1,3-dimethyl-2,4,6-trioxohexahydropyrimidin-5-yliden) {4-[1,3-dimethyl-2,6-dioxo-4-(1,3-dimethyl-2,4,6-trioxohexahydropyrimidin-5-yliden)hexahydropyrimidin-5-yliden]-1-ethyl-7-methyl-1,4-dihydro[1,8]naphthyridin-3-yl}methanolat (12)

Das Filtrat aus der Darstellung von **11** wird i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird unter Erhitzen in EtOAc gelöst. Beim Abkühlen kristallisiert das Produkt aus. Das Filtrat wird zur Darstellung von **13** verwendet. Rote Kristalle, Schmp.: 245 °C (DMSO/H₂O). Ausbeute: 0,030 g (0,9%). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 1700, 1640 cm⁻¹ (C=O), 1619 (C=C, C=N). UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 251 nm (4,39), 314 (4,33), 433 (3,35). ¹H-NMR ([D₆] DMSO): δ (ppm) = 1,53 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,53, 2,73 (2s, 6H,

NCH₃), 2,88 (s, 3H, 7-CH₃), 3,03, 3,21, 3,24, 3,30 (4s, 12H, NCH₃), 4,83 (m, 1H, CH₂CH₃), 5,15 (m, 1H, CH₂CH₃), 7,82 (d, J = 8 Hz, 6-H), 8,61 (d, J = 8 Hz, 5-H), 9,57 (s, 2-H). ¹³C-NMR ([D₆] DMSO): δ (ppm) = 15,25 (CH₃), 25,40 (7-CH₃), 25,94, 26,77 (2 NCH₃), 27,65 (2 NCH₃), 27,79, 33,72 (2 NCH₃), 49,88 (CH₂), 82,31 (2 C-q.), 95,31, 105,41, 124,62 (3 C-q.), 125,00 (C-6), 143,70 (C-2), 143,85 (C-q.), 149,89 (C-5), 150,76 (C-q.), 152,13 (3 C-q.), 153,08, 159,13 (2 C-q.), 160,24 (2 C-q.), 160,53 (2 C-q.), 166,85, 183,08 (2 C-q.). MS (EI): m/z (%) = 646 (4) [M]⁺, 463 (28), 156 (100). HPLC (2): t_s = 0,18. C₃₀H₃₀N₈O₉ · H₂O (664,6)

3.8. 5-[5-[(1,3-Dimethyl-2,4,6-trioxohexahydropyrimidin-5-yliden)(1-ethyl-4-(6-hydroxy-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-7-methyl[1,8]naphthyridin-1-ium-3-yl)methyl]-1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-yl]-1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat (13)

Das Filtrat aus der Darstellung von **12** wird i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird unter Erhitzen in EtOAc und Petroläther gelöst. Nach dem Abkühlen wird abgesaugt. Rote Kristalle, Schmp.: 327 °C (DMSO/H₂O). Ausbeute: 0,027 g (0,7%). IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3423 cm⁻¹ (OH), 1687, 1655 (C=O), 1620 (C=N, C=C). UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 250 nm (4,61), 300 (4,24), 359 (4,00), 473 (3,63). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,72 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,45 (s, 3H, NCH₃), 2,91 (s, 3H, 7-CH₃), 3,14, 3,18, 3,23, 3,24, 3,30, 3,38, 3,46 (7s, 21H, NCH₃), 4,31 (m, 1H, CH₂CH₃), 5,55 (m, 1H, CH₂CH₃), 7,69 (d, J = 9 Hz, 6-H), 8,25 (d, J = 9 Hz, 5-H), 9,21 (s, 2-H). ¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 15,17 (CH₃), 25,83 (7-CH₃), 27,30, 28,23, 28,74, 28,92, 29,11, 29,17, 29,25, 32,74 (8 NCH₃), 51,11 (CH₂), 84,93, 86,73, 118,83, 124,67, 125,24 (5 C-q.), 126,72 (C-6), 136,94 (C-5), 137,74, 144,02, 146,72, 147,17, 147,65, 150,92, 150,96, 151,41, 151,43 (9 C-q.), 152,25 (C-2), 158,13 (2 C-q.), 159,26, 160,35, 160,63, 161,23, 161,61, 166,64 (6 C-q.). MS (EI): m/z (%) = 784 (2) [M]⁺, 629 (6), 325 (3). HPLC (1): t_s = 0,37. C₃₆H₃₆N₁₀O₁₁ · DMSO (862,8)

3.9. Röntgenstrukturanalysen

Die Daten wurden auf Flächenzählern der Fa. Bruker (**11**) bzw. Siemens (**12**, **13**) mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung gemessen. Strukturlösung: direkte Methoden. Strukturverfeinerung: SHELXL-97 (G.M. Sheldrick, Univ. Göttingen). Wasserstoffatome wurden mit starren Methyl- und OH-Gruppen, sonst mit einem Riding-Modell berücksichtigt. Kristalldaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Besondere Einzelheiten: Verbindung **11** kristallisiert als Essigsäure-Trisolvat; die Methylgruppe an C-7 ist über zwei Lagen ungeordnet. Bei Verbindung **12** wurden die H-Atome des Kations frei verfeinert. Verbindung **13** kristallisiert als Chloroform-Trisolvat, bei dem zwei der Solvens-Moleküle über zwei Lagen ungeordnet sind; somit ist die Präzision beeinträchtigt. Abgesehen von den konventionellen Wasserstoffbrücken, die oben diskutiert wurden, gibt es (entsprechend dem Überschuss an H-Brücken-Akzeptoren) mehrere intermolekulare Brücken des Typs C—H...O. Die kürzesten (basiert auf H...O-Abständen) sind: **11**, C(1)—H(1)...O1 2,35; **12**, C(5)—H(5)...O(3) 2,23; **13**, C(1)—H(1)...O(7) 2,29 Å. Vollständige kristallographische Informationen (außer Strukturaktoren) wurden beim Cambridge Crystallographic Data Centre unter den Nummern CSD-118944 (**11**), -118945 (**12**), -118946 (**13**) deponiert. Kopien können kostenlos erhalten werden vom Direktor, CCDC, 12 Union Rd., Cambridge CB2 1EZ (Fax: +44-1223-336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

⁴ Bei der 4-Dimethylaminophenyl-Gruppe sind die beobachteten „Dubletts“ für 2,6-H einerseits und 3,5-H andererseits schlecht aufgelöste Hälften von AA'XX'-Spektren. Dabei entspricht der Abstand der intensiven Linien nicht J_{2,3} (= J_{5,6}), sondern der Summe von J_{2,3} und J_{2,5}(J_{AX} + J_{AX'}) und ist daher etwas größer als eine normale ortho-Kopplung. Dieser Abstand wird üblicherweise als N bezeichnet.

Literatur

- Europäisches Arzneibuch 1997 (3. Ausgabe), Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, S. 1330
- Dondi, G.; Di Marco, M.: Boll. Chim. Farm. **105**, 419 (1966); C.A. **65**, 20112c (1966)
- Pharmacopoea Japonica, 13. Ausgabe, S. 522
- van Es, T.; Stashun, B.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 3137 (1998)
- Nishigaki, S.; Ichiba, M.; Fukuzawa, S.; Kanahori, M.; Shinomura, K.; Yoneda, F.; Senga, K.: Chem. Pharm. Bull. **23**, 3170 (1975)
- Eiden, F.; Peter, P.: Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges. **297**, 1 (1964)
- Eiden, F.; Wendt, R.; Fenner, H.: Arch. Pharm. (Weinheim) **311**, 561 (1978)
- Görlitzer, K.: Pharm. Uns. Zeit **5**, 145 (1976)

Eingegangen am 18. Mai 1999
Angenommen am 15. Juli 1999

Prof. Dr. K. Görlitzer
Institut für Pharmazeutische Chemie
Beethovenstrasse 55
D-38106 Braunschweig
k.goerlitzer@tu-bs.de