

Bereich Forschung und Entwicklung, Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, Germany

Zur Synthese von 4-[17β-Methoxy-17α-(methoxymethyl)-estra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd-1(E)-oxim

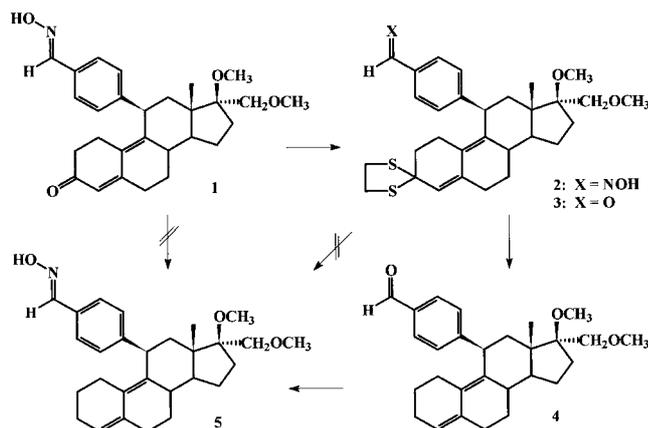
G. SCHUBERT, E. MENZER und B. UNDEUTSCH

Desogestrel (13-Ethyl-11-methylen-18,19-dinor-17α-pregn-4-en-20-yn-17-ol) ist ein oral wirksames Gestagen, das als Bestandteil von oralen Kontrazeptiva vielfach verwendet wird. Ein besonderes Merkmal der Verbindung ist die fehlende Sauerstofffunktion am C-3 [1–3].

Kürzlich wurden neue 11β-Benzaloxim-estra-4,9-dien-3-one gefunden, die sowohl antigestagene als auch gestagene Eigenschaften besitzen [4, 5]. Wir versuchten eine entsprechende 3-Desoxyverbindungen herzustellen, um deren Einfluss auf die biologische Aktivität zu ermitteln. Bei der Wolff-Kishner-Reduktion von **1** entstanden zahlreiche Zersetzungsprodukte. Deshalb entschieden wir uns für einen Weg über eine reduktive Entschwefelung eines 3-Thioketals [3].

Das Oxim **1** kann mit Ethandithiol in MeOH mit BF₃-Etherat glatt in das 3-Thioketal **2** überführt werden. Die reduktive Spaltung von **2** mit Raney-Ni und auch unter Birch-Bedingungen führte jedoch zu zahlreichen unpolaren Produkten, die keine Oximgruppierung enthielten. Alternativ wurde aus **2** zunächst der Aldehyd **3** regeneriert. Bei Versuchen mit NaHSO₃ in DMSO/H₂O [6] erhielten wir keine Reaktion, mit 2N HCl in EtOH entstand eine ganze Palette von Verbindungen, wobei das gewünschte Produkt nur zu ca.15% enthalten war und mit CuSO₄ × 5 H₂O in THF/MeOH [7] wurde auch nach 3 Tagen nur ca. 25% **3** gebildet. Die Umoximierung mit Formaldehyd und 2N HCl bei Raumtemperatur [8] ergab nach 20 h in einer weitgehend einheitlichen Reaktion den gewünschten Aldehyd **3**. Dieser konnte in einer sehr glatten Reaktion mit Raney-Ni in EtOH zur C-3 Desoxyverbindung **4** umgesetzt werden. Die Verbindung ist unbeständig und zersetzt sich zum Teil bei der DC. **4** wurde als Rohprodukt der Oximierung mit (NH₂OH) HCl in Pyridin unterworfen. Die dabei entstehende 3-Desoxo-11β-benzaloximverbindung **5** wurde durch präparative DC gereinigt. Im ¹H-NMR-Spektrum ist bei **5** das 4-Protonensignal gegenüber **1** um 0,3 ppm nach höherem Feld verschoben, im IR fehlt die Bande für das konjugierte Keton.

Schema



In ersten tierexperimentellen Untersuchungen zur antigestagenen Aktivität von Verbindung **5** wurde an der Ratte bei einer Dosierung von 1 mg/Tier/Tag (5.–7. Graviditätstag, s.c.) keine abortive Wirkung beobachtet.

Experimenteller Teil

¹H-NMR-Spektren wurden am Varian Gemini 300 (300 MHz, δ, ppm, TMS) in CDCl₃, die Drehwerte am Polamat A (Carl Zeiss Jena) in CHCl₃, die UV-Spektren am Zeiss Specord M 40 in MeOH und die IR-Spektren am Nicolet 205 in KBr (cm⁻¹) gemessen. Die Aufnahme der MS-Spektren erfolgte mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer AMD (AMD-Intectra, Harpstedt/Bremen) bei 70 eV. Die Ergebnisse der Elementaranalyse liegen in den üblichen analytischen Grenzen, der Schmelzpunkt wurde auf einem Büchi B 545 gemessen und ist unkorrigiert.

1. 4-[3,3-Ethylendithio-17β-methoxy-17α-(methoxymethyl)-estra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd-(1E)-oxim (2)

4,49 g (10 mmol) 4-[17β-Methoxy-17α-(methoxymethyl)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd-1(E)-oxim **1** [4] wird in 20 ml MeOH gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 1,3 ml (15,5 mmol) 1,2-Ethandithiol und 1,8 ml BF₃-Etherat versetzt. Man rührt 1 h bei Raumtemperatur, gießt in 200 ml verdünnte wässrige NaHCO₃-Lösung ein, saugt ab und wäscht neutral. Das Rohprodukt wird durch SC an Kieselgel 0.063–0,2 mm mit einem Toluol/Aceton Gradienten gereinigt. Ausbeute: 3,44 g (65,4% d. Th.) **2** amorph aus EtOH/H₂O.

α_D = + 214°, UV: 262 nm, log ε = 4.52, ¹H-NMR: 0,49 (s, 3 H, H-18); 3,24 (s, 3 H, OCH₃); 3,41 (s, 3 H, OCH₃); 3,38 und 3,59 (2d, 2 H, J = 10,5 Hz, 17α-CH₂OCH₃); 4,13 (d, 1 H, J = 7,2 Hz, H-11α); 5,61 (s, 1 H, H-4); 7,23 (s, 1 H, OH); 7,24 und 7,47 (2d, je 2 H, J = 8,4 Hz, CH-arom.); 8,10 (s, 1 H CH=NOH).

2. 4-[3,3-Ethylendithio-17β-methoxy-17α-(methoxymethyl)-estra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd (3)

3 g (5,7 mmol) **2** werden bei Raumtemperatur in 80 ml Aceton gelöst, mit 50 ml 35-prozentigem Formaldehyd und 4,2 ml 2N HCl versetzt. Man rührt 20 h, saugt den Niederschlag ab, wäscht neutral und kristallisiert aus Aceton um. Ausbeute: 2,17 g (74,5% d. Th.) **3**.

Schmp.: 168–172 °C, α_D = + 226°, UV: 261 nm, log ε = 4.55, IR: 1598 (C=O); HPLC: 99,1% F bei 263 nm, ¹H-NMR: 0,46 (s, 3 H, H-18); 3,24 (s, 3 H, OCH₃); 3,41 (s, 3 H, OCH₃); 3,38 und 3,59 (2d, 2 H, J = 10,5 Hz, 17α-CH₂OCH₃); 4,31 (d, 1 H, J = 7,2 Hz, H-11α); 5,61 (s, 1 H, H-4); 7,23 (s, 1 H, OH); 7,40 und 7,78 (2d, je 2 H, J = 8,4 Hz, CH-arom.); 9,96 (s, 1 H CH=O). MS: m/z = 510,22540 (M⁺) C₃₀H₃₈O₃S₂, 478.20150 (M⁺-CH₄, 100%), 465.19339 (M⁺-C₂H₅O⁻), 433.16571 (478-C₂H₅O⁻), 385.16299 (465-C₂H₄S₂), 353 (385-CH₃OH).

3. 4-[17β-Methoxy-17α-(methoxymethyl)-estra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd-(1E)-oxim (5)

Zu 766 mg (1,5 mmol) **3** in 3 ml CH₂Cl₂ und 100 ml EtOH werden 500 mg einer wässrigen Raney-Ni-Suspension (MERCK 820876, Lot 62119774) gegeben. Man rührt 24 h bei Raumtemperatur, filtriert ab, wäscht mit EtOH nach und engt im Vakuum ein. Das Rohprodukt (625 mg) wird durch SC mit einem Toluol/Aceton-Gradienten gereinigt. Man erhält 230 mg 4-[17β-Methoxy-17α-(methoxymethyl)-estra-4,9-dien-11β-yl]benzaldehyd (**4**) als Schaum.

¹H-NMR: 0,46 (s, 3 H, H-18); 3,24 (s, 3 H, OCH₃); 3,40 (s, 3 H, OCH₃); 3,39 und 3,58 (2d, 2 H, J = 10,5 Hz, 17α-CH₂OCH₃); 4,30 (d, 1 H, J = 7,5 Hz, H-11α); 5,53 (s, 1 H, H-4); 7,44 und 7,76 (2d, je 2 H, J = 8,1 Hz, CH-arom.); 9,96 (s, 1 H, CH=O).

Zu 210 mg (0,5 mmol) **4** in 3 ml Pyridin werden 35 mg (0,5 mmol) (NH₂OH) HCl gegeben und die Mischung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Man tropft in Wasser ein, saugt ab, wäscht neutral und reinigt das Rohprodukt durch präparative DC an Kieselgel PF₂₅₄+366nm (Merck AG) mit dem Fließmittel Toluol/Aceton 9 : 1. Man erhält 149 mg (68,3% d.Th.) **5** als farblosen Schaum aus *tert*-Butylmethylether/*n*-Hexan

α_D = + 109°, UV: 256 nm, log ε = 4.46, ¹H-NMR: 0,49 (s, 3 H, H-18); 3,24 (s, 3 H, OCH₃); 3,38 (d, 2 H, J = 10,8 Hz, 17α-CH₂OCH₃); 3,40 (s, 3 H, OCH₃); 3,61 (d, 2 H, J = 10,5 Hz, 17α-CH₂OCH₃); 4,24 (d, 1 H, J = 7,2 Hz, H-11α); 5,51 (s, 1 H, H-4); 7,27 und 7,46 (2d, je 2 H, J = 8,4 Hz, CH-arom.); 7,55 (s, 1 H, OH); 8,11 (s, 1 H CH=NOH). MS: m/z [rel. Inten. (%)] = 435.27939 (M⁺, 31) C₂₈H₃₇NO₃, 417.26620 (M⁺-H₂O, 17), 390.24399 (M⁺-C₂H₅O⁻, 41), 372.23519 (390-H₂O, 65); 358.21740 (390-CH₃OH, 62); 340,20721 (358-H₂O, 14).

Wir danken Dr. Elger (EnTec GmbH) für die tierexperimentellen Untersuchungen.

Literatur

- 1 Pinkerton S. M.: *Drugs Today* **19**, 569 (1983)
- 2 Van den Heuvel, M. J.; van Bokhoven, C. W.; de Jong, H.P.; Zeelen, J. F.: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **107**, 331 (1988)
- 3 Schwarz, S.; Ring, S.; Weber, Gisela; Teichmüller, G.; Palme, H.-J.; Pfeiffer, C.; Undeutsch, B.; Erhart, B.; Grawe, D.: *Tetrahedron* **50**, 10709 (1994)
- 4 Schubert, G.; Kaufmann, G.; Sobek, L.; Oettel, M.; Elger, W.; Kurischko, A.: *DE 43 32 283 (C)*. 07 J 1/00 Appl. 20.Sep. 1993; 13. Apr. 1995; *C.A.* **123** (1), 56389j (1995)
- 5 Elger, W.; Chwalisz, K.: *Reproduktionsmedizin* **15**, 318 (1999)
- 6 Eicher, T.; Pielartzik, H. in; Falbe, J. (Ed.): *Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, Aldehyde*, Bd. E3, 391, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1983
- 7 Attanasi, O.; Gasperoni, S.; Carletti, C.: *J. Prakt. Chem.* **322**, 1063 (1980)
- 8 Bartrop, J. A.; Johnson, A. J.; Meskins, G. D.: *J. Chem. Soc.* 181 (1951)

Eingegangen am 22. Dezember 1999
 Angenommen am 20. Januar 2000

Dr. G. Schubert
 Jenapharm GmbH & Co. KG
 Otto-Schott-Str. 15
 D-07745 Jena

Department of Analytical Chemistry¹ and Department of Pharmaceutical Botany and Ecology², Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

HPLC determination of caffeine in a multicomponent preparation

R. SLADKOVSKÝ¹, P. SOLICH¹ and L. OPLETAL²

Nutraceuticals (Functional foods, Pharmafoods), are a group of commercial products which stand in an growing interest of pharmacists; nutraceuticals play a very important role in practical pharmacy [1, 2].

Caffeine is a very frequent component of nutraceuticals. It is similar to alcohol and nicotine, a socially tolerated toxic substance, but in sports its use is very strongly limited. Therefore, the exact amount of caffeine in nutraceuticals should be known. A large variety of HPLC methods have been described for the determination of caffeine in pharmaceutical preparations [3–6]. The procedure is usually very simple because of the limited number of other compounds presented in the formulation. More complications occur when caffeine is presented in more complex multicomponent preparations containing vitamins, aminoacids and plant extracts, common components of many nutraceuticals.

The aim of this study was to develop a simple, rapid and accurate method for analysis of caffeine in a multicomponent preparation (Carnitol[®] plus). One ampoule (22 ml) contains: L-Carnithine 1000 mg, L-arginine 1000 mg, extract of *Guarana* 1000 mg, L-ornithine 500 mg, ascorbic acid 180 mg, myo-inositol 500 mg, α -tocopherol 50 μ g, β -caroten 50 μ g, selenium 25 μ g (*organic bound*), extract of *Garcinia* 250 mg, chromium-picolinate 400 μ g and peptide FM 100 mg. The amount of caffeine is not declared, but relatively high concentration occurs in extract of *Guarana*.

The UV spectrum of a caffeine solution (6 μ g/ml) showed two absorption maximum one at 206 nm and at 273 nm. Because of the better selectivity in higher wavelengths, all analyses were done at 273 nm.

A HPLC procedure described by Waters [6] was optimised (composition of mobile phase, pH, flow rate, separation column and sample preparation). Quantification of caffeine was based on the least-squares linear regression analysis. The calibration curve displayed very good linearity over the range 20–120 μ g/ml for caffeine. The linear regression was:

$$y = 0.21916 (\pm 0.00107) \cdot x + 0.00548 (\pm 0.00417); \\ r^2 = 0.99995$$

This showed that the described mobile phase and chromatographic conditions, for linearity and sensitivity, were sufficient for a selective elution of caffeine.

The chromatographic method also provided satisfactory precision and accuracy. The relative standard deviations (R.S.D.) were always less than 2%. Under the chromatographic conditions used, caffeine and the internal standard paracetamol gave sharp and symmetrical peaks with retention times of 4.1 and 6.7 min, respectively.

The limit of quantification as the lowest standard concentration which could be determined with acceptable accuracy and precision (the R.S.D. was less than 1,2%) was 20 ng/ml.

Experimental

1. Chemicals and reagents

Pure samples of caffeine and paracetamol (IS) were purchased from SIGMA (St. Louis, Missouri, USA), acetonitrile (isocratic grade) and methanol