

Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany

Synthese und pharmakologische Wirkung chiraler Fomocaine ($\{4\text{-}[2\text{-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether und $\{4\text{-}[1\text{-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether)

13. Mitteilung zur Synthese neuer Verbindungen mit lokalanästhetischer Wirkung

H. OELSCHLÄGER, P. GLASSL, A. SEELING, J. WANGE, M. LISTING und B. JUNG

Herrn Prof. Dr. E.-G. Jäger, Friedrich-Schiller-Universität Jena, zum 65. Geburtstag gewidmet

Im Rahmen eines neuen Forschungsprogrammes wurden erstmalig zwei chirale Fomocaine, nämlich *rac* ($\{4\text{-}[2\text{-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether (O/G 3) und *rac* ($\{4\text{-}[1\text{-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether) (O/G 5) dargestellt. Die achirale Synthese von O/G 3 verläuft ebenso wie die von O/G 5 über fünf Stufen. Die Ausbeute über alle Stufen beträgt für O/G 3 9% und für O/G 5 19,2% d. Th. Die präparative Trennung der Racemate erfolgt über die diastereomeren Salze mit (+)- bzw. (-)-Camphersulfonsäure. Analytisch lassen sich die Racemate auch an Daicel OD-Säulen trennen. Die Enantiomere sind stabil. Sowohl die Racemate als auch die Enantiomere wirken schwächer als Fomocain bei stärkerer Gewebeerregung. Die LD₅₀-Werte (Maus i. v.) liegen im Bereich zwischen 290 und 390 mg/kg, während Fomocain eine LD₅₀ von 175 mg/kg besitzt.

Syntheses and pharmacological activities of chiral fomocaines

The syntheses of two chiral fomocaines namely *rac* ($\{4\text{-}[2\text{-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether (O/G 3) and *rac* ($\{4\text{-}[1\text{-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether) (O/G 5) are reported. These compounds are part of a new research program concerning the relation between chirality and local anaesthetic activity in the group of fomocaines. The yield over five steps is in the range of 9% (O/G 3) up to 19,2% (O/G 5). The racemates were resolved via the diastereomeric salts formed with (+)- or (-)-camphersulfonic acid. The chromatographic resolution in analytical scale is successful using a Daicel OD-column. The enantiomers are stable. The surface anaesthesia of the racemates as well as of the enantiomers is weaker in comparison with fomocaine. The rate of tissue irritation is higher. The LD₅₀ (mouse i. v.) is in the range between 290–390 mg/kg, while fomocaine shows a LD₅₀ value of 175 mg/kg.

1. Einleitung

Die in die Therapie eingeführten basischen Lokalanästhetika unterbinden reversibel die Reizleitung durch Blockade der Fortleitung eines Aktionspotentials der Nervenfasern, vornehmlich über dünne C-Fasern, und schalten damit ohne Bewusstseinsverlust die Schmerzempfindung im lateralen Kerngebiet des Thalamus sowie in den sensorischen Projektionsfeldern der Großhirnrinde (Gyrus postcentralis) aus. Dieser Effekt wird durch die Hemmung des Na⁺-Eintransports durch spannungsabhängige Natriumkanäle mit der Konsequenz einer Änderung des Membranpotentials von -70 auf +40 mV bewirkt. Der Durchtritt der Natriumionen erfolgt durch eine im Ruhezustand geschlossene hydrophile Pore, die durch ein den gesamten Zellwanddurchmesser einnehmendes Protein geformt und durch ein Trauma geöffnet wird [1]. Die α -Untereinheit Mr = 260 kD dieses aus etwa 1900 Aminosäuren bestehenden Glycoproteins (Mr = 330 kD) ist dabei für die „gate function“ und die Natriumionenselektivität verantwortlich. Die Untereinheiten β -1 (Mr = 36 kD) und β -2 (Mr = 33 kD) bestimmen die räumliche Orientierung in der Membran. Die Untereinheiten α -1 und β -1 sind durch Nebervalenzkräfte miteinander verbunden, während die β -2-Untereinheit durch Disulfidbrücken kovalent an α gekoppelt ist. Das Proteinsegment 6 aus Teilstruktur IV trägt das Lokalanästhetika-Bindungsareal mit der Aminosäure L-Phe in Position 1764 und L-Tyr in 1771.

Die in die Therapie eingeführten Lokalanästhetika sind zum Teil achiral (wie Benzocain, Procain, Tetracain, Lidocain und Fomocain), während die chiralen (wie Prilocain,

Mepivacain, Bupivacain und Articain) nur als Racemate verfügbar sind. Mit dem Ropivacain (Naropin[®]) wurde 1997 erstmalig ein basisches Säureanilid als reines Enantiomer in die Therapie eingeführt, weil das S-Enantiomer länger wirkt und eine bessere kardiale und ZNS-Verträglichkeit als das R-Enantiomer besitzt. Brauchbare Daten zur Pharmakologie und Toxikologie der Enantiomeren der chiralen Säureanilide sind vor allem für deren Vertreter Mepivacain, Bupivacain und Prilocain verfügbar (vgl. Tabelle). Die Daten deuten im wesentlichen darauf hin, dass mit Ausnahme der s.c. Toxizität zwischen den Enantiomeren keine prinzipiellen Unterschiede existieren, wohl aber zwischen den einzelnen Verbindungen. Damit dürfte die Frage nach einem stereospezifischen Bindungsareal bzw. Rezeptor im Natriumkanal unverändert offen sein.

In der großen Gruppe der Fomocaine [2] mit bisher über 300 Vertretern, die überwiegend lokalanästhesierend, aber bei oraler Gabe auch antiarrhythmisch, muskulär spasmolytisch und antihistaminisch wirken, sind chirale Derivate bisher nicht synthetisiert und tierexperimentell überprüft worden. Über die ersten Ergebnisse der neuen Forschungsrichtung in dieser Gruppe soll nachfolgend berichtet werden.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

2.1. Synthesen

Im Rahmen eines größeren Programms wurden zunächst die Racemate des $\{4\text{-}[2\text{-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ethers (O/G 3), **6** und des $\{4\text{-}[1\text{-Methyl-3-$

Tabelle: Wirkungsunterschiede der Enantiomeren von drei Säureaniliden

	Mepivacain		Bupivacain		Prilocain	
	L(+)-Isomer	D(-)-Isomer	L(+)-Isomer	D(-)-Isomer	L(+)-Isomer	D(-)-Isomer
s.c. Toxizität (Maus/DL ₅₀)	330 mg/kg	175 mg/kg	100 mg/kg	30 mg/kg	380 mg/kg	60 mg/kg
i.v. Toxizität (Maus/DL ₅₀) langsame Injektion	48 mg/kg	38 mg/kg	9,7 mg/kg	5,5 mg/kg	252 mg/kg	357 mg/kg
Nervenblockade (Dauer) N. ischiad. (Ratte, Meersch.)						
in vitro	keine Unterschiede		keine Unterschiede		keine Unterschiede	
in vivo	40 min (1%ig)	75 min (1%ig)	keine Unterschiede		37 min	26 min
Dauer einer IA (Meersch.) ohne Vasokonstriktor	63 min (1%ig)	48 min (1%ig)	50 min (0,1% ig)		nicht untersucht	
mit Vasokonstriktor	180 min (0,5%ig)	120 min (0,5%ig)	28 min (0,1% ig)		nicht untersucht	
Vasokonstriktion	stärker	schwächer	keine		keine	

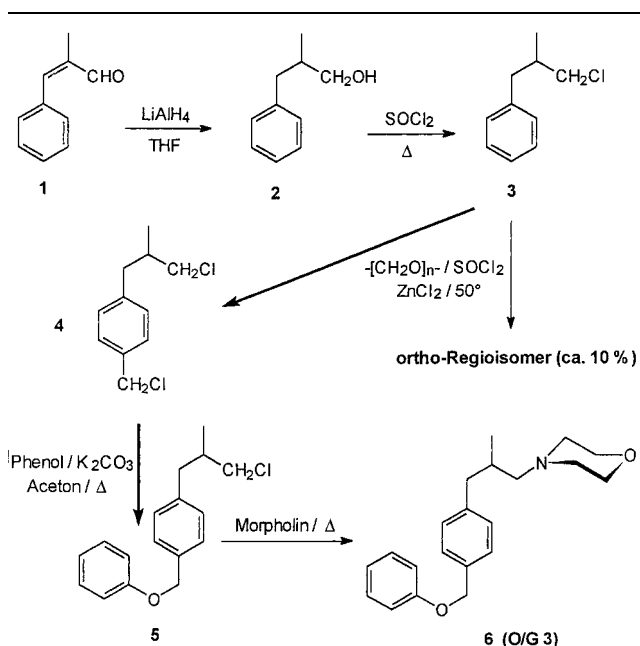
(für die Ropivacain-Enantiomeren waren keine vergleichbaren Daten erhältlich)

(morpholin-4-yl)propyl]benzyl]-phenyl-ethers (O/G 5), **13** dargestellt und über die diastereomeren Salze in ihre Enantiomere getrennt. Auf die Entwicklung aufwendiger stereospezifischer Synthesen wurde im Hinblick auf eventuelle spätere technische Synthesen bewusst verzichtet. Die präparative Trennung der Racemate an chiralen OD-Säulen befindet sich in der Entwicklung.

2.1.1. Darstellung von *rac* {4-[2-Methyl-3-(morpholin-4-yl)-propyl]benzyl]-phenyl-ether (O/G 3)}

Der Reaktionsablauf ist in Schema 1 formuliert. Im ersten Schritt wird α -Methylzimaldehyd (**1**) zu *rac* 2-Methyl-3-phenylpropan-1-ol (**2**) mittels LiAlH₄ reduziert. Nach Hochstein und Brown [3] wird der Aldehyd rasch zum Alkohol reduziert, an dessen Doppelbindung sich LiAlH₄ addiert. Der gebildete zyklische Komplex mit vierfach gebundenem Al konnte jedoch nicht kristallin erhalten wer-

Schema 1



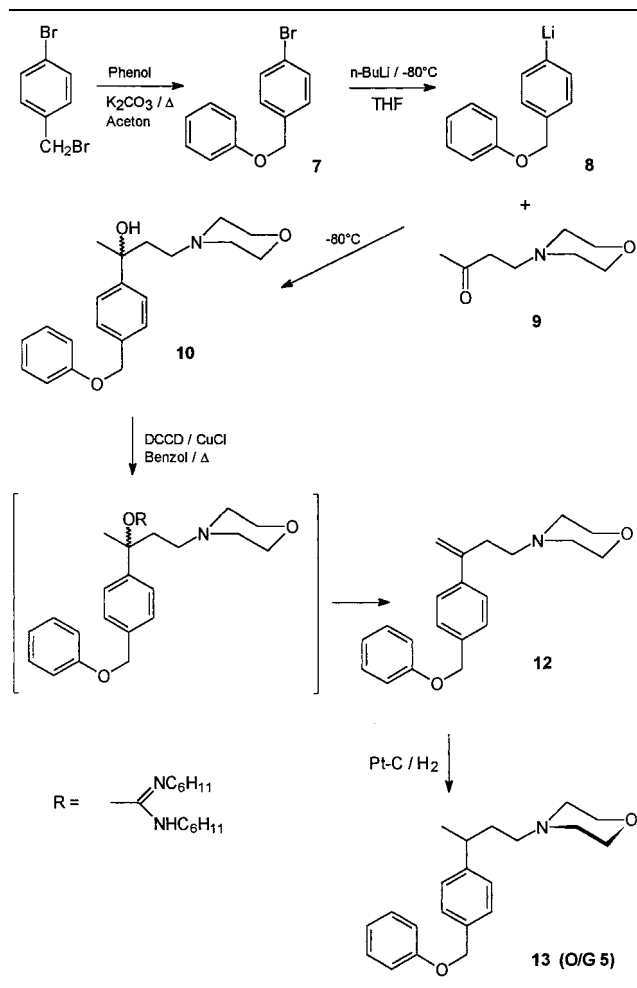
den. Durch Zugabe von Wasser wird der Komplex zerlegt, und es fällt das reduzierte Produkt an. Führt man die Reaktion in Diethylether aus, so bleibt die Reaktion auf der Stufe des ungesättigten Alkohols stehen, während **2** in THF in praktisch quantitativer Ausbeute entsteht. **2** wird mit Thionylchlorid zu *rac*-**3** chloriert. Dabei muss eine Temperatur von 50 °C strikt eingehalten werden, weil bei höherer Temperatur sowohl Polymerisation als auch die Bildung von regiomerer Chlorverbindungen eintritt. Die nachfolgende Chlormethylierung nach Oelschläger et al. [4] führt mit 60%iger Ausbeute zu dem p-Chlormethylderivat *rac*-**4**, das sich in Anlehnung an die klassische Formocainsynthese leicht zu *rac*-**5** verethern und danach zu *rac*-**6** aminieren lässt (**6** = O/G 3).

Die Trennung des anfallenden Racemats gelingt mit (+)- und (-)-Camphersulfonsäure in Essigester, die primär ausgefallenen diastereomeren Salze werden zwei bis dreimal umkristallisiert und dann aus den Salzen die Basen mit Alkalien in Freiheit gesetzt. Die mittels HPLC durchgeführte Enantiomerenbestimmung ergab eine Enantiomerenreinheit von 99% ee. Das (+)-Enantiomer dreht 19° (MeOH, c=1) und das (-)-Enantiomer -18,4°. Sie sind stabil und racemisieren nicht (pH 2–10, 28 d, 20 °C). Der pK_a-Wert von O/G 3 beträgt 7,35 und der Partition Coefficient P 15844.

2.1.2 Darstellung von *rac* {4-[1-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl]-phenyl-ether}

Die Synthese von O/G 5 (Schema 2) verläuft über fünf Stufen. Der Phenolether **7** wird in Anlehnung an eine Arbeitsvorschrift von Wittig [5] mit n-BuLi bei -70 °C zum Phenyllithiumderivat **8** metalliert und anschließend das Metallion elektrophil durch die Mannich-Base **9** substituiert. Die glatt verlaufende Umsetzung ergibt in hoher Ausbeute **10**, das dann unter Cu-Katalyse mittels DCC dehydratisiert werden sollte. Es entsteht aber unter den gewählten Bedingungen statt des erwarteten Hofmann-Produktes (4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]but-2-enyl}morpholin, **11**, das Eliminationsprodukt **12**. Dieses Olefin kann mit einem Platin-Kohle-Katalysator zu **13** (= O/G 5) mit einer Ausbeute von 70% d. Th. hydriert werden, während bei Verwendung eines Palladium-Kohle-Katalysators als Nebenreaktion eine Hydrogenolyse des Phenolethers eintritt.

Schema 2



Die Trennung des anfallenden Racemats gelingt wiederum durch Verwendung von (+)- bzw. (-)-Camphersulfonsäure. Die durch HPLC bestimmte Reinheit lag für beide Enantiomere bei ca. 98% ee. Das (+)-Enantiomer dreht $5,4^\circ$ (MeOH, $c = 1$) und das (-)-Enantiomer $-5,7^\circ$. Sie sind stabil und racemisieren nicht (pH 2–10, 28d, 20°C). Der pK_a -Wert von O/G 5 beträgt 7,30 und der Partition Coefficient P 8317.

2.2. Pharmakologische Prüfungen

Sowohl die Racemate von O/G 3 und O/G 5 als auch deren Enantiomere wurden umfangreich pharmakologisch geprüft [6]. Die Leitungsanästhesie wurde am Nervus ischiadicus der Ratte (nach Lembeck), am Rattenschwanz (Wärmestrahler), die Infiltrationsanästhesie ebenfalls am Rattenschwanz und die Oberflächenanästhesie an der Cornea der Ratte getestet. Die Toxizität wurde durch die approximative LD_{50} (nach Miller und Tainter) und durch die lokale Gewebeerregung charakterisiert. Als Referenzsubstanzen dienten Fomocain und Procain. Jede Konzentration wurde an einer Gruppe von mindestens sechs Tieren getestet.

Im Zusammenhang mit der hier anliegenden Fragestellung seien nur die Ergebnisse in der Oberflächenanästhesie und in der toxikologischen Prüfung kurz skizziert. Abb. 1 zeigt deutlich, dass sowohl die Racemate als auch die Enantiomere der beiden chiralen Fomocaine der Referenzsubstanz Fomocain unterlegen sind. Fomocain besitzt mit einer ef-

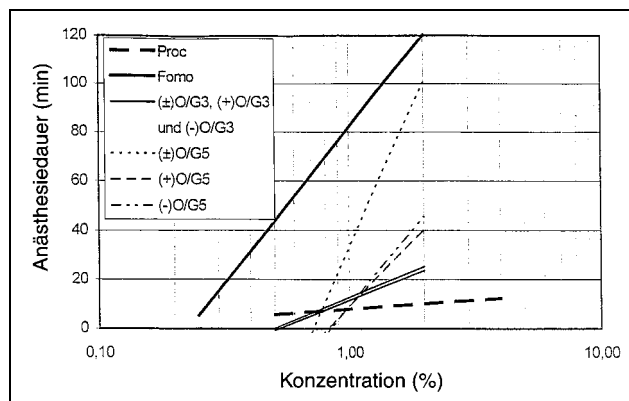


Abb. 1: Dosis-Wirkungs-Beziehung (Regressionsgeraden) bei der Oberflächenanästhesie an der Cornea für die Referenzsubstanzen Procain (Proc) und Fomocain (Fomo) sowie die Fomocain-Derivate (\pm) O/G 3, (\pm) O/G 5 und deren Enantiomere ($n = 6$ –8 pro Gruppe). Aufgrund sehr ähnlicher Dosis-Wirkungs-Beziehungen können die Regressionsgeraden von (\pm) O/G 3 und dessen Enantiomeren nicht getrennt dargestellt werden.

fektiven Konzentration von 0,99% die signifikant stärkste Wirksamkeit. Dagegen benötigt das Racemat von O/G 5 für eine effektive Anästhesie von 30 min fast die doppelte Konzentration. Überraschender Weise haben die Enantiomere (+)-O/G 5 und (-)-O/G 5 im Vergleich mit dem Racemat eine signifikant geringere Wirksamkeit ($\text{EC}_{30 \text{ min}} = 1,29$ und $1,141\%$). Noch geringer ist die Wirksamkeit des Racemats von O/G 3 und dessen Enantiomeren. Die $\text{EC}_{30 \text{ min}}$ -Werte liegen zwischen 2,73 bis 3,45%. Sehr deutlich bestätigen die Versuche erneut die Unwirksamkeit von Procain als Oberflächenanästhetikum, obwohl dieses gelegentlich noch in pharmazeutischen Zubereitungen anzutreffen ist. Die Toxizitätsuntersuchungen nach i. p. Injektion an der Ratte veranschaulicht die Abb. 2. Die Regressionsgeraden von *rac* O/G 5 und Fomocain verlaufen deutlich flacher und sind im Vergleich mit den anderen Substanzen nach links verschoben. *rac* O/G 5 und Fomocain weisen die höchste Toxizität auf und haben eine fast identische LD_{50} (ca. 190 mg/kg). Die Regressionsgeraden von O/G 3 und dessen Enantiomeren haben einen ähnlichen Verlauf. Die LD_{50} -Werte liegen im Bereich zwischen 290 und 390 mg/kg.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Racemat von O/G 3 und seine Enantiomere im Vergleich zu Fomocain eine deutlich geringere pharmakologische Aktivität

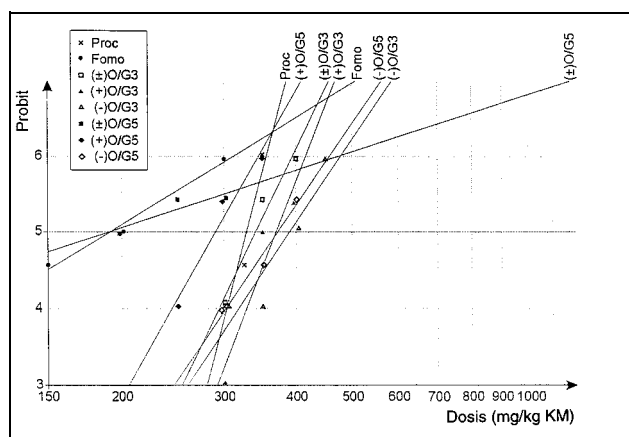


Abb. 2: Dosis-Letalitäts-Beziehung zur Bestimmung der LD_{50} nach i.p. Injektion an der Ratte für die Referenzsubstanzen Procain (Proc) und Fomocain (Fomo) sowie die Fomocain-Derivate (\pm) O/G 3, (\pm) O/G 5 und deren Enantiomere ($n = 6$ pro Gruppe)

besitzen. Die Gewebeerirritation war wesentlich stärker als bei Fomocain. Bei den Enantiomeren (+)-O/G 5 und (-)-O/G 5 wurde eine agonistische Wirkung beobachtet, d. h. das Racemat war stärker wirksam als die Enantiomere.

2.3. Biopharmazeutische Untersuchungen

Die Proteinbindung der Racemate und deren Enantiomere wurde direkt durch Ultrafiltration bestimmt, wobei die Substratkonzentrationen so gewählt wurden, dass sie etwa der doppelten Wasserlöslichkeit der Basen entsprachen, um eine Präzipitation der zu prüfenden Basen in der Serumlösung auszuschließen. Sowohl *rac* O/G 3 als auch *rac* O/G 5 zeigten eine hohe Eiweißbindung an humanes Serumalbumin (HSA) von 99,6%. Eine so hohe Eiweißbindung war zu erwarten, da bereits Fomocain als Muttersubstanz eine Bindung an HSA von 90% aufweist [7]. Die Enantiomere von O/G 3 zeigten eine gleich starke Eiweißbindung, während das (+)-Enantiomer von O/G 5 im Verhältnis 1,3 : 1 stärker gebunden wurde.

Um einen Einblick in das metabolische Verhalten von O/G 3 und O/G 5 zu gewinnen, wurden sowohl die Enantiomere als auch das Racemat bei 37 °C in den 10000 × g Überstand einer homogenisierten frischen Schweineleber inkubiert und die Konzentrationsabnahme der eingesetzten Substanzen gegen die Zeit gemessen. Die Konzentrationen

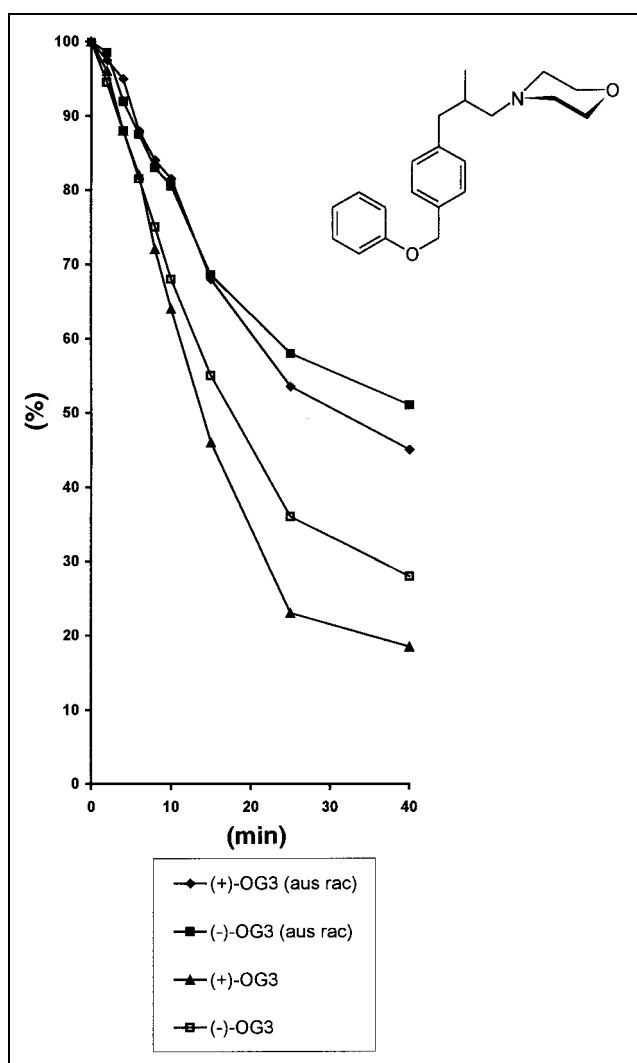


Abb. 3: Verlauf des enzymatischen Abbaus von *rac* O/G 3 und dessen Enantiomere

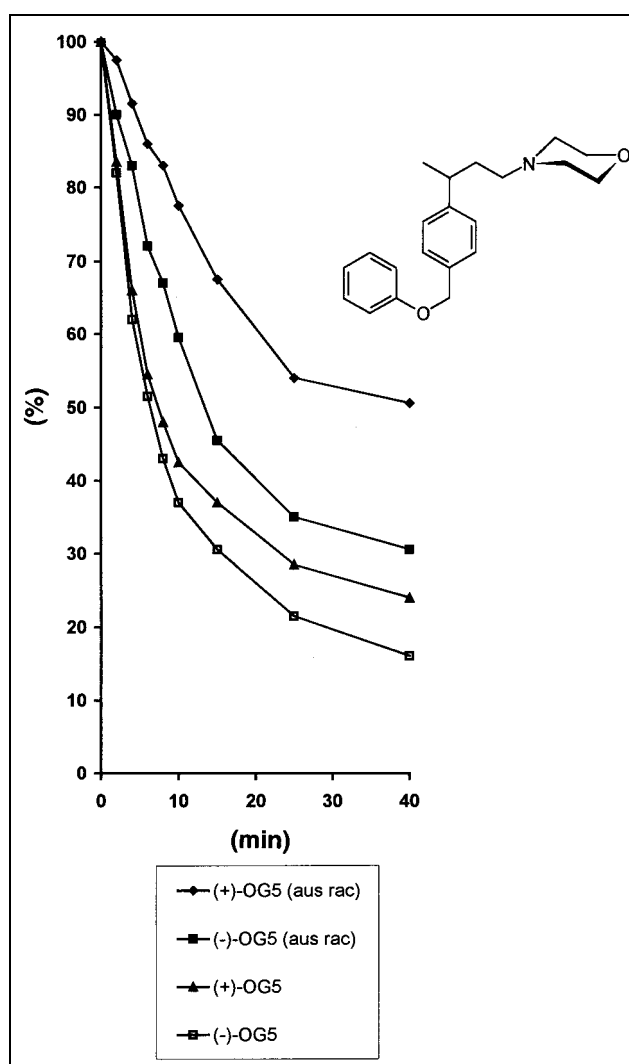


Abb. 4: Verlauf des enzymatischen Abbaus von *rac* O/G 5 und dessen Enantiomere

der Racemate lagen bei 17 µg/ml und die der Enantiomere bei 8,5 µg/ml. Um nichtenzymatische Vorgänge beim Abbau auszuschließen, wurden mit den betreffenden Verbindungen auch Inkubationen in einem durch 15 minütiges Erhitzen auf 90 °C inaktivierten 10000 × g Überstand vorgenommen. Wie die Abb. 3 und 4 veranschaulichen, verändern sich die Substanzkonzentrationen schon nach 10 min deutlich. Bei O/G 3 (Abb. 3) liegen die Konzentrationen der Enantiomere des Racemates und auch der eingesetzten Enantiomere zunächst sehr nah beieinander. Nach 40 min ist die Enzymaktivität erschöpft. Die Endkonzentrationen der beiden Enantiomere im Racemat liegen für das (-)-Enantiomer um 50% und für das (+)-Enantiomer bei ca. 45%. Überraschenderweise sind die Endkonzentrationen der eingesetzten Enantiomere erheblich geringer. Sie liegen für das (-)-Enantiomer bei ca. 29%, während vom (+)-Enantiomer nur noch ca. 19% vorhanden sind. Die Metabolisierung des Racemates erfolgt vermutlich wegen der höheren Gesamtinkubation langsamer als die der Enantiomere, wobei die (-)-Form deutlich schneller dem enzymatischen Abbau unterliegt. Noch deutlicher wird diese Gesetzmäßigkeit beim Abbau von *rac* O/G 5 (Abb. 4) erkennbar. Das (-)-Enantiomer wird deutlich schneller abgebaut als sein optischer (+)-Antipode. Das zeigen die Endkonzentrationen und der Kurvenverlauf der beiden Enantiomere des Racemates,

nach 40 min sind nur noch 30% der (–)-Form und 50% der (+)-Form nachweisbar. Werden die Enantiomere isoliert untersucht, so nivelliert sich die stereoselektive Diskriminierung, da das Enzymgemisch jetzt keine Auswahl mehr treffen kann, also die Konkurrenz um die Bindungsstellen weitgehend unterbleibt. Für die (–)-Form beträgt die Endkonzentration 16% und für die (+)-Form 24%. Dass der Abbau nur durch Enzyme erfolgt, geht aus dem Versuch mit dem durch Erhitzen auf 90 °C inaktivierten Enzymgemisch hervor. Bei analoger Versuchsdurchführung sowohl mit dem Racemat als auch mit den Enantiomere der beiden chiralen Fomocaine ergab sich keine Minderung der Ausgangskonzentration.

Eine Analyse der Abbauprodukte wurde nicht durchgeführt. Auf Grund unserer früheren Untersuchungen [8] zum Metabolismus des Fomocain mit *In-vitro*- und *In-vivo*-Methoden dürfte aber die Annahme berechtigt sein, dass primär die Etherbindung gespalten und/oder der exo-Ring in 4-Stellung hydroxyliert wird.

3. Experimenteller Teil

3.1. Synthesen

3.1.1. *rac* {4-[2-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}phenyl-ether (O/G 3)

3.1.1.1. *rac* 2-Methyl-3-phenylpropan-1-ol (**2**) (Stufe 1)

Zu einer eiskühlten Suspension von 9 g (0,236 mol) LiAlH₄ in 150 ml abs. THF wird unter ständigem Rühren langsam eine Lösung von 50 g (0,342 mol) α -Methylzimtaldehyd in 50 ml abs. THF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird das Eisbad durch ein Ölbad ersetzt und dieses zum Sieden erhitzt. Nach 15 min lässt das starke Aufschäumen nach, und man rührt noch 8 h weiter. Dann wird das Reaktionsgemisch unter Eiskühlung vorsichtig mit Wasser versetzt, mit HCl angesäuert und mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, vom THF befreit und i. Vak. fraktioniert destilliert. Es resultieren 48 g (93,3% d. Th.) eines farblosen, dc-reinen Öls (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: Petrolether/Ether 3+1), n_D²² 1,5213, vom Sdp.₁₅ 118 °C (Lit. [9]: Sdp.₇ 96-96,5 °C).

3.1.1.2. *rac* 1-Chlor-2-methyl-3-phenylpropan (**3**) (Stufe 2)

Unter Eisbadkühlung fügt man zu 48 g (0,319 mol) **2** in 250 ml CHCl₃ tropfenweise 60 g (0,504 mol) SOCl₂ und verdünnt mit 100 ml CHCl₃. Nach beendeter Zugabe wird das Eisbad durch ein Ölbad ersetzt und der Ansatz langsam zum Sieden (140 °C) erhitzt. Die am Anfang starke Gasentwicklung klingt allmählich ab. Nach ca. 3 h ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle, KG 60 F₂₅₄ Fertigfolie, Fließmittel: Petrolether/Ether 3 + 1). Das Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid werden abdestilliert. Der verbleibende dunkelrote bis braune Rückstand wird fraktioniert destilliert. Es resultieren 40 g (74,3% d. Th.) eines farblosen, dc-reinen Öls, n_D²² 1,5160, vom Sdp.₁₄ 99 °C (Lit. [10]: Sdp.₁₇ 109–110 °C).

3.1.1.3. *rac* 1-Chlor-3-[4-(chloromethyl)phenyl]-2-methylpropan (**4**) (Stufe 3)

40 g (0,25 mol) **3**, 30 g (0,98 mol) Paraformaldehyd und 11 g (0,08 mol) ZnCl₂ werden 30 min bei 50 °C gerührt. Dann werden 40 g (0,336 mol) SOCl₂ so langsam zugetropft, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Nach beendeter Zugabe wird noch 2 h bei 50 °C belassen (KG 60 F₂₅₄ Fertigfolie, Fließmittel: Petrolether/CH₂Cl₂ 9 + 1). Überschüssiges SOCl₂ wird unter Eisbadkühlung mit Wasser zersetzt. Nach dem Abkühlen wird mit CH₂Cl₂ aufgenommen, die organische Phase mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird im Hochvakuum fraktioniert. Bei 90 °C (0,001 Torr) gehen 22 g (42,5% d. Th.) eines gelblichen Öls über, das nach Ausweis des ¹H-NMR-Spektrums 12% des regioisomeren *rac.* ortho-Chlormethylderivats enthält. EI-MS (90 eV): 216 (20%, M⁺), 181 (17%), 174 (20%), 145 (15%), 141 (40%), 139 (100%), 131 (11%), 105 (24%), 104 (38%), 103 (45%), 91 (22%), 78 (14%), 77 (22%), 51 (19%)

3.1.1.4. *rac* [4-(3-Chlor-2-methylpropyl)benzyl]-phenyl-ether (**5**) (Stufe 4)

In 200 ml Aceton werden 22 g (0,1 mol) des Isomerengemisches **4** und 9,5 g (0,1 mol) frisch destillierten Phenols gelöst und dann 14 g (0,1 mol) K₂CO₃ zugefügt. Der Ansatz wird 24 h unter Rückfluss erhitzt. Man filtriert den noch warmen Reaktionsansatz und wäscht das Salzmisch mit wenig Aceton nach, das dem Filtrat zugefügt wird. Nach Abdestillieren des Solvens wird der

Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und diese Phase zunächst mit 10%iger Na₂CO₃-Lösung, danach mit Wasser gewaschen. Man trocknet über Na₂SO₄ und verjagt das CH₂Cl₂ am RV. Die anfallenden Kristalle werden aus CH₃OH umkristallisiert. Man erhält 15 g (54,4% d. Th.) farbloser, dc-reiner Kristalle (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: Petrolether/CH₂Cl₂ 9+1) vom Schmp. 52 °C.

EI-MS (90 eV): 274 (7%, M⁺), 216 (2%), 183 (36%), 181 (100%), 174 (3%), 145 (6%), 139 (14%), 117 (5%), 105 (22%), 104 (22%), 103 (12%), 91 (20%), 86 (6%), 78 (6%), 77 (11%), 72 (5%), 65 (5%), 51 (4%)

3.1.1.5. *rac* {4-[2-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}phenyl-ether (**7**) (Stufe 5)

15 g (0,05 mol) **5**, 100 ml Morpholin und 250 ml Methanol werden ca. 4 h unter Rühren am Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) werden das Solvens und das überschüssige Morpholin am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit H₂O neutral gewaschen. Man trocknet über Na₂CO₃ und engt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ein. Je nach Reinheitsgrad (DC) wird der kristallin anfallende Rückstand entweder aus CH₃OH umkristallisiert oder zunächst über eine Kieselgelsäule gereinigt (Fließmittel: Hexan/Ethylacetat 3+1). Ausbeute 10 g (56,3% d. Th.) weißer Kristalle vom Schmp. 48 °C, dc rein (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: Hexan/Ethylacetat 3 + 1).

EA C₂₁H₂₈ClNO₂ (361,5): ber. C 69,7; H 7,80; Cl 9,8; N 3,9; O 8,9 gef. C 69,6; H 7,84; Cl 9,7; N 3,9; O 8,8

EI-MS (90 eV): 325 (12%, M⁺), 232 (2%), 181 (4%), 161 (2%), 149 (3%), 145 (7%), 131 (2%), 117 (4%), 115 (3%), 105 (6%), 100 (100%), 91 (4%), 77 (2%), 70 (3%), 56 (6%)

Die Ausbeute über fünf Stufen, berechnet auf eingesetzten α -Methylzimtaldehyd, beträgt 9% d. Th.

3.1.2 {4-[1-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}phenyl-ether (O/G 5)

3.1.2.1. (4-Brombenzyl)-phenyl-ether (**7**) (Stufe 1)

25,4 g (0,1 mol) 4-Brombenzylbromid werden in 400 ml getrocknetem Aceton mit 9,6 g (0,1 mol) Phenol und 14 g (0,1 mol) K₂CO₃ 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird der noch warme Ansatz filtriert und das Salzmisch mit wenig Aceton nachgewaschen. Beim Abziehen des Gesamtacetons am RV scheidet sich das Produkt im Kolben ab. Durch Umkristallisieren aus abs. Ethanol erhält man 26 g (95% d. Th.) farbloser dc-reiner Plättchen (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: Petrolether/Toluol 3 + 1) vom Schmp. 93,9–95 °C (Lit. [11]: 92,5–93,5 °C aus EtOH)

3.1.2.2. 4-(Morpholin-4-yl)-butan-2-on-Hydrochlorid (**9**) (Stufe 2)

42 g (0,34 mol) Morpholinhydrochlorid und 16,8 g (0,56 mol) Paraformaldehyd werden in einem Gemisch von 15 ml abs. C₂H₅OH und 80 ml getr. Aceton 24 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen bildet sich eine kristalline, feste Masse. Diese wird mit Aceton aufgeschlämmt, abfiltriert und aus abs. Ethanol umkristallisiert. Man erhält 60,9 g (91% d. Th.) feiner weißer Plättchen vom Schmp. 159–160 °C (Lit. [12]: 149 °C aus EtOH)

3.1.2.3. *rac* 4-(Morpholin-4-yl)-2-(4-(phenoxyethyl)phenyl)butan-2-ol (**10**) (Stufe 3)

12,5 g (47,5 mmol) **7** werden in 250 ml abs. THF gelöst und auf –78 °C (CO₂/Ethanol) gekühlt. Der Ansatz trübt sich leicht. Unter ständigem Rühren unter Stickstoff werden während einer Stunde 35 ml n-BuLi-Lösung (1,6 molar) zugetropft. Die Temperatur darf dabei nicht über –70 °C ansteigen. Um einen vollständigen Umsatz zu erreichen, wird noch 2–3 h weiter bei –78 °C gerührt. Dann werden 7,5 g (39,1 mmol) **9**, suspendiert in 60 ml abs. THF, unter obenstehenden Bedingungen innerhalb von 30–40 min zugetropft. Dabei entsteht eine klare Lösung. Man rührt noch 2 h bei –78 °C und lässt dann langsam auf RT ansteigen. Die Lösung wird vom THF befreit und der gelbe ölige Rückstand mit verd. HCl versetzt. Man ethert 2–3 mal mit Diethylether aus. Die von Neutralstoffen befreite salzsaure Phase wird mit verd. NaOH-Lösung alkalisiert und mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert. Man wäscht die vereinigten organischen Phasen mit H₂O neutral und trocknet über Na₂SO₄. Danach wird das Lösungsmittel abgezogen, und es fallen 12,5 g (77,3% d. Th.) weißer Kristalle (**10**), dc-rein, vom Schmp. 97–98 °C an (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: Ether/CH₃OH 19 + 1).

EI-MS (90 eV): 341 (16%, M⁺), 326 (2%), 248 (6%), 184 (18%), 147 (11%), 133 (5%), 115 (26%), 114 (26%), 100 (100%), 91 (88%), 87 (19%), 78 (7%), 75 (7%), 65 (13%), 56 (8%)

3.1.2.4. (4-[1-[2-(Morpholin-4-yl)ethyl]vinyl]benzyl)-phenyl-ether (**12**) (Stufe 4)

In 30 ml Toluol werden 2,2 g (6,8 mmol) **10**, 1,4 g (6,8 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid und 5 mg CuCl bei 80 °C gerührt. Der Ansatz verfärbt sich sehr rasch von farblos über gelb nach braun. Nach 24–30 h ist die Reaktion beendet (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolien, Fließmittel: Ether/CH₃OH 19:1). Das noch heiße Gemisch wird vom Toluol befreit und der Rück-

stand in 30 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Die CH₂Cl₂-Phase wird filtriert und durch Ausschütteln mit Ammoniaklösung vom Katalysator befreit. Man wäscht anschließend noch dreimal mit H₂O und trocknet die Lösung über Na₂SO₄. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird in verd. HCl aufgenommen und mit Diethylether extrahiert. Die HCl-Pase wird danach mit NaOH alkalisiert und die alkalische Phase mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Nach dem Waschen bis zur Neutralität wird diese über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels erhält man 1,5 g **12** als farbloses Öl (72% d. Th.); n_D^{20} 1,687
EI-MS (90 eV): 323 (6%, M⁺), 230 (0,8%), 145 (2,4%), 143 (1%), 129 (2,6%), 128 (1,9%), 116 (1%), 100 (100%), 56 (9%)

3.1.2.5. *rac* {4-[1-Methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}-phenyl-ether (**13**) (Stufe 5)

1 g (3,1 mmol) **12** werden in 20 ml Toluol gelöst und mit 120 mg PtO₂ bei 20 °C unter Normaldruck hydriert. Nach beendeter H₂-Aufnahme wird der Katalysator abfiltriert und das Solvens am RV abgezogen. Man erhält 0,8 g (79,5% d. Th.) **13** als farbloses bis gelbes Öl, das über eine kurze Kieselgel-Säule gereinigt wird (Fließmittel: Hexan/Ethylacetat 3+1). Dieses Öl ist dc-rein, n_D^{20} 1,682, (KG 60 F₂₅₄-Fertigfolie, Fließmittel: MeOH/Ether 95 + 5)

Sein farbloses Hydrochlorid lässt sich unter Verlusten aus CH₃OH/Ether umkristallisieren und schmilzt bei 175 °C, Ausbeute 0,35 g (39,6% d. Th.)
EA C₂₁H₂₈ClNO₂ (361,5): ber. C 69,7; H 7,80; Cl 9,8; N 3,9; O 8,8
gef. C 69,7; H 7,78; Cl 9,9; N 4,0; O 8,7

EI-MS (90 eV): 325 (6%, M⁺), 232 (5,4%), 145 (10%), 117 (5%), 100 (100%), 91 (2%), 56 (8%)

Die Ausbeute über fünf Stufen, berechnet auf eingesetztes 4-Brombenzylbromid, beträgt 19,2% d. Th.

3.2. Präparative Racemattrennung über die diastereomeren Salze von O/G 3 und O/G 5

6,3 g (17,4 mmol) *rac* O/G 3-HCl und 2,02 g (8,7 mmol) 1*R*(-)-Campher-10-sulfonsäure werden in 250 ml Ethylacetat zum Sieden erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Zur Vervollständigung der Fällung wird der Ansatz 24 h bei 4 °C gehalten. Der abfiltrierte Niederschlag wird anschließend erneut in 250 ml Ethylacetat gelöst und wie vorstehend behandelt. Nach der dritten Fällung wird das Diastereomerensalz in H₂O gelöst, mit NaOH auf pH 11 alkalisiert und die Base mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Aus dem Filtrat wird durch Einleiten von HCl-Gas das Hydrochlorid von (-)-O/G 3 ausgefällt (chromatographische Reinheit 98,9% ee; Schmp. 143 °C; α_D^{24} -5,6° (1% in MeOH).

Die vereinigten Ethylacetat-Mutterlaugen der o. g. Fällungen werden vom Solvens befreit, der Rückstand in H₂O gelöst, und die freie Base wird mit verd. NaOH gefällt. Diese wird, wie oben beschrieben, mit 1*S*(+)-Campher-10-sulfonsäure behandelt. Nach der dritten Fällung erhält man (+)-O/G 3 mit einer chromatographischen Reinheit von 99,0% ee; Schmp. 143–144 °C; α_D^{24} +5,4° (1% in MeOH).

Die Racemattrennung von O/G 5 verläuft in analoger Weise, wobei die Isolierung des (+)-Enantiomers mit 1*R*(-)-Campher-10-sulfonsäure und die des (-)-Enantiomers mit 1*S*(+)-Campher-10-sulfonsäure erfolgt. Die chromatographische Reinheit beträgt für das (+)-Enantiomer 97,9% ee; Schmp. 159–160 °C; α_D^{20} +18,8° (1% in MeOH) bzw. 98,5% ee für das (-)-Enantiomer; Schmp. 159–161 °C; α_D^{24} -18,2° (1% in MeOH).

3.3. Analytische Methoden

3.3.1. Dünnschichtchromatographie

Für die dc Untersuchungen werden DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Alle Lösungsmittel und Reagenzien zur Detektion sollen dem Reinheitsgrad p. a. entsprechen.

Die Detektion erfolgt, sofern nicht spezifische Sprühreagenzien verwendet werden, im UV-Licht mit dem Fluotest-Gerät „UVis“ (254/366 nm) der Fa. Desaga, Heidelberg.

3.3.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Alle für die Chromatographie verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien werden in der Qualität LiChrosolv[®] Gradient Grade bzw. purissimum p. a. von Merck/Darmstadt bezogen.

Die Chromatographie erfolgt an einer Chiralcel OD[®]-Säule (Daicel Chemical Industries, Ltd., Kyoto, Japan) [250 × 4 mm; 100 µm]; Fließmittel Hexan/EtOH 99+1 mit 0,1% (v/v) Triethylamin (für O/G 3) bzw. Hexan/2-Propanol 80+20 mit 0,1% (v/v) Triethylamin (für O/G 5); Flow 1,0 ml/min; Detektorwellenlänge 220 nm; Gerätekonfiguration: Pumpe LC-6A (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg), manueller Injektor 7125 (Fa. Rheodyne, Cotati, CA/USA) mit 20 µl Probeschleife, UV-Detektor SPD-6A

(Shimadzu Europa GmbH, Duisburg); Schreiber Waters 740, Data Module (Fa. Waters, Eschborn).

3.3.3. UV-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgt mit dem UV-Spektrophotometer DU-70 der Fa. Beckman, Fullerton, CA/USA in einer Schichtdicke von 1 cm. Als Lösungsmittel dient Methanol LiChrosolv[®] Gradient Grade (Merck/Darmstadt).

3.3.4. Massenspektroskopie

Die EI-Massenspektren wurden bei einer Anregungsenergie von 90 eV mit dem Massenspektrometer MAT 212 (Fa. Finnigan-Mat, Bremen) aufgenommen.

3.4. Biopharmazeutische Untersuchungen

Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. a.

Für die Inkubationsansätze mit Schweinelebermikrosomen werden als Cofaktoren NADH, NADP, G-6-P-DH und G-6-P der Fa. Boehringer, Mannheim eingesetzt. Tris-KCl-Puffer pH 7,4 wird aus 9,105 g Tris, 3,45 g KCl, 5,25 ml konz. HCl und H₂O ad 300 ml zubereitet.

Die Mikrosomenpräparation erfolgt aus frischer Schweineleber nach den üblichen Methoden. Der Proteingehalt wird nach der Biuret-Methode gegen eine 2%ige wäßrige BSA-Standardlösung bestimmt, der Gehalt an Cyt-P-450 durch Aufnahme eines Differenzspektrums zwischen 390 und 550 nm nach Reduktion mit Natriumdithionit und CO-Begasung.

Die Inkubationen werden unter Luftzutritt bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Köttermann, Häningsen) durchgeführt. Die Substratkonzentration der jeweiligen Hydrochloride in 0,1 M-Phosphatpuffer-pH 7,4 (Sörensen) beträgt 7 µg/ml. 1,0 ml dieser Lösung werden zuvor 2,0 ml Lebermikrosomenpräparation und 1,0 ml einer Cofaktorlösung, bestehend aus 77 mg NADP, 157 mg G-6-P, 50 ml G-6-P-DH, 5 ml 0,1 M-MgCl₂-Lösung und Phosphatpuffer, pH 7,4 ad 100 ml, zugesetzt.

Unter denselben Bedingungen werden jeweils Leerwerte (ohne Substratzusatz) und Blindwerte mit inaktivierten Mikrosomen („boiled microsomes“) inkubiert, um nichtenzymatische Reaktionen feststellen zu können.

Die Aufarbeitung erfolgt in der Weise, dass in festgelegten Intervallen (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 min) jeweils 0,3 ml aus dem Inkubationsansatz entnommen und mit 0,3 ml einer auf pH 11 gepufferten Lösung von 5 µg/ml Fomocain als innerem Standard versetzt wurden. Nach Zugabe von 1,0 ml n-Hexan wird gemischt, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und 0,1 ml des Extrakts hplc untersucht. Als Ergebnis dient die Abnahme der Substratkonzentration.

Wir danken dem Fonds der Chemie, Frankfurt a. M., für stetige finanzielle Förderung.

Literatur:

- Catterall, W. A.; Mackie, K.; in: Goodman, L. S.; Gilman, A. (Eds.): Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., p. 331, Mc Grow Hill-Health Professions Division, New York 1996
- Oelschläger, H.: Pharm. Unserer Zeit **29**, 358 (2000)
- Hochstein, F. A.; Brown, W. G.: J. Am. Chem. Soc. **70**, 3484 (1948)
- Oelschläger, H.; Hädrich, I.; Dannhardt, G.: PZ Wiss. **4/136**, 41 (1991)
- Wittig, G.: Angew. Chem. **53**, 241 (1940)
- Fleck, C.; Kämena, M.; Tschritter, L.; Seeling, A.; Glassl, P.; Oelschläger, H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), im Druck
- Nachev, P. K.: Diss. Univ. Frankfurt a. M. 1982
- Ewald, H.-W.: Diss. Univ. Frankfurt a. M. 1985
- Terashima, S. et al.: Chem. Pharm. Bull. **18**, 1124 (1970)
- Wiberg, K. B.; Hutton, T. W.: J. Am. Chem. Soc. **78**, 1640 (1956)
- Huston, R. C.; Neeley, A.; Fayerweather, B. L.; D'Arcy, H. M.; Maxfield, F. H.; Ballard, M. M.; Lewis, W. C.: J. Am. Chem. Soc. **55**, 2146 (1933)
- Patent FR 1347339 (1962); Metalsalts Corp.; C.A. **60**, 10693 (1964)

Eingegangen am 17. Dezember 2000 Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. Oelschläger
Angenommen am 15. Januar 2001 Institut für Pharmazie
Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
Philosophenweg 14
D-07743 Jena