

Institut für Pharmazie¹, Institut für Pharmakologie und Toxikologie² der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany

In-vitro-Untersuchungen zum Phase-I-Metabolismus des Fomocain-Derivats Oe 9000 mit Schweineleberhomogenaten

T. DAHSE¹, J. WENNEK-KLOSE¹, M. LISTING¹, C. FLECK², H. OELSCHLÄGER (†)¹

Herrn Dr. Peter Hösel, Leiter der pharmazeutisch-chemischen Entwicklung der Jenapharm-AG, Jena, gewidmet, der dem Institut für Pharmazie der FSU Jena seit seiner Wiedergründung stets hilfreich zur Seite gestanden hat.

Eingegangen 13. Dezember 2005, angenommen 23. Januar 2006

Thomas Dahse, Institut für Pharmazie, Philosophenweg 14, D-07743 Jena
thomasdahse@web.de

Pharmazie 61: 943–951 (2006)

2,2'-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylimino]diethanol (Oe 9000) ist eine neues hochwirksames Lokalanästhetikum aus der Gruppe der Fomocaine. Es zeichnet sich durch eine lange oberflächenanästhetische und lokalanästhetische Wirkung bei geringer Toxizität aus und ist dem Fomocain in Wasserlöslichkeit und Wirkstärke deutlich überlegen. Im Hinblick auf die Entwicklung systemischer Applikationsformen, z.B. zur Kupierung postoperativer Schmerzen, wurde die Biotransformation von Oe 9000 untersucht. Wir führten dazu Versuche mit Leberhomogenaten vom Schwein durch und identifizierten sechs Phase-I-Metaboliten mittels LC-MS unter Verwendung erstmalig synthetisierter Referenzsubstanzen. In Versuchen mit 10000 × g-Überständen und Mikrosomen wurden neben hauptsächlich auftretender oxidativer Desaminierung, die nach Redoxreaktionen zum Buttersäure- und Butanolderivat führte, auch Oxygenierung am Exoring, oxidative N-Desalkylierung und N-Oxidbildung beobachtet. Damit entstehen mit Ausnahme einer Substanz nur Metaboliten, denen aufgrund ihrer verminderten Basizität keine lokalanästhetische Wirkung mehr zukommen dürfte.

In vitro investigations of phase I metabolism of the fomocaine derivative Oe 9000 with pig liver homogenates

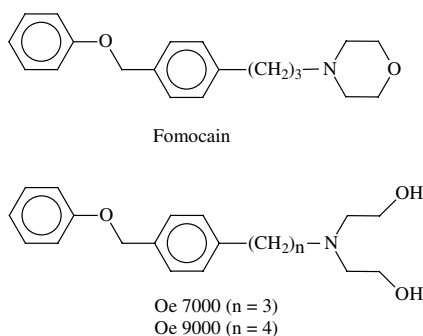
2,2'-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylimino]diethanol (Oe 9000) is a new, highly potent local anaesthetic related to fomocaine. It displays a long duration of action, low toxicity and is superior to fomocaine with regard to aqueous solubility and efficacy. In view of the development of new application forms, e.g. for the treatment of postoperative pain, the elucidation of the biotransformation of the drug is required. Therefore, experiments with 10000 × g supernatants and microsomes from pig liver homogenates were conducted. Using specifically synthesized reference compounds six phase I metabolites could be identified by LC-MS. Apart from the predominating oxidative desamination of the compound, that led after redox reactions to the corresponding butyric acid and butanol derivatives, oxygenation of the exocycle, oxidative N-desalkylation, and N-oxidation were observed. Thus, with the exception of one compound only metabolites are generated, that are expected to have no local anaesthetic activity due to their reduced basicity.

1. Einleitung

In der Gruppe der Lokalanästhetika dominieren von der Struktur her gesehen basische Ester und die jüngeren basischen Säureanilide. Das untersuchte 2,2'-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylimino]diethanol (Oe 9000, Formelschema) hingegen gehört wie die Leitsubstanz Fomocain (DAC seit 1979) zu den basisch substituierten Benzylphenylethern. Aufgrund dieser Struktur sind Vertreter dieser Gruppe nicht dem Angriff mikrosomaler Amidasen oder rasch inaktivierender Esterasen ausgesetzt, sondern werden überwiegend durch oxidative Cytochrom P450 (CYP)-abhängige Biotransformationswege umgesetzt, was neben ihrer

hohen Lipophilie die von verschiedenen Autoren (Nieschulz 1958; Oelschläger et al. 2001; Seeling et al. 2001; Fleck et al. 2003; Fleck et al. 2004) charakterisierte, lang anhaltende lokalanästhetische Wirkung erklärt.

Fomocain bindet intrazellulär an spannungsabhängige Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle und blockiert so die Reizleitung (Zamponi et al. 1996). Therapeutisch blieb der Einsatz des Fomocainhydrochlorids wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit bisher vornehmlich auf die Oberflächenanästhesie beschränkt. Die Wasserlöslichkeit ließ sich einerseits durch den Austausch des Morpholinrests durch hydrophilere Basen steigern, andererseits ermöglichte auch der Einschluss von Fomocain in 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin



unter Beibehaltung seiner vollen Wirkstärke bei nur minimaler Latenzzeit die Herstellung stabiler konzentrierter Lösungen (Fleck et al. 2004).

Die Variation der Basenkomponente hat weitreichende Auswirkungen auf die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften der Substanzen. Während Fomocain als Morpholinderivat nach intravenöser Applikation bei der Maus eine LD_{50} von 175 mg/kg zeigt (vgl. Tetracain: $LD_{50} = 10$ mg/kg), ist das lipophilere Diethylaminderivat etwa sechsmal toxischer. Die Einführung von Hydroxylgruppen in die zweite Verbindung zum Diethanolaminderivat Oe 7000 senkt die Toxizität (LD_{50} : 125 mg/kg). Gleichzeitig steigt die leitungsanästhetische Wirksamkeit von Fomocain zu Oe 7000 dosisabhängig um etwa den Faktor 5, während die oberflächenanästhetische Wirkstärke nicht verändert wird.

Anästhetische Potenz und Toxizität werden außer durch den basischen Rest entscheidend durch die Kettenlänge zwischen der Benzylphenylether-Komponente und dem basischen Molekülteil bestimmt, denn sie steigen bei Kettenverlängerung sukzessive an.

Beim Vergleich der molaren effektiven Konzentrationen (EC), die zur Aufrechterhaltung der Anästhesie über 20 min erforderlich sind, ergibt sich damit folgendes Bild für die Oberflächenanästhesie (Cornea der Ratte): $EC_{\text{Fomocain}} = EC_{\text{Tetracain}} = EC_{\text{Oe 7000}} > EC_{\text{Oe 9000}}$ und für die Leitungsanästhesie (N. ischiadicus der Ratte): $EC_{\text{Fomocain}} > EC_{\text{Procain}} = EC_{\text{Oe 7000}} > EC_{\text{Oe 9000}}$ (Fleck et al. 2003).

Damit zählt Oe 9000 zu den hochwirksamen Oberflächenanästhetika und zu den potentesten aller bisher synthetisierten Fomocaine.

Fomocain wurde hinsichtlich seines Metabolismus sowie der lokalanästhetischen Wirksamkeit und Toxizität der Metaboliten bereits eingehend untersucht. Nach i.v. Gabe von Fomocain bzw. ^{14}C -markiertem Fomocain bei Ratte und Beagle-Hund (Oelschläger et al. 1975; Ewald 1985) konnten 14 Metaboliten nachgewiesen werden, die sich mit einer Ausnahme als pharmakologisch inaktiv und wenig toxisch erwiesen. Die Richtung der Biotransformation hängt von der Tierart ab. Bei Ratten dominiert die oxidative Dearylierung, beim Beagle die Oxygenierung in 4-Stellung des Exorings. N-Oxidation tritt bei beiden Spezies auf. Nach großflächiger Auftragung von Fomocain-haltigen Dermatika auf die menschliche Rückenhaul wurde im Harn das Glucuronid des 4-Hydroxyfomocain in geringer Menge gefunden (Oelschläger und Rothley 1979).

Praktisch unbekannt war hingegen das pharmakokinetische Verhalten von Oe 9000, insbesondere seine Biotransformation. Lediglich Lupp (Lupp et al. 2003) hatte festgestellt, dass die Interaktionen mit einigen CYP-Isoenzymen aus den Unterfamilien 1A, 2A, 2B, 2C, 2E und 3A qualitativ ähnlich, aber in geringerem Ausmaß als bei Fomocain stattfinden. Metaboliten wurden nicht identifiziert. Zur Klärung dieser offenen Frage wurden Inkubationen mit

10000 \times g-Überständen und Mikrosomen aus Leberhomogenaten vom Schwein vorgenommen.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Zur Identifizierung der Metaboliten wurden Referenzsubstanzen synthetisiert, deren Strukturen unter Zugrundelegung von im Arbeitskreis gesammelten Erfahrungen geplant wurden.

2.1. Synthesen von Oe 9000 und den stickstoffhaltigen Metaboliten

Ausgehend von (4-Chlorbutyl)benzen (**1**) (Schema 1) ergab die von Oelschläger et al. (1991) modifizierte Blanc-Chlormethylierung ein Stoffgemisch, welches neben dem angestrebten 1-(4-Chlorbutyl)-4-(chloromethyl)benzen (**2**) auch die in 2- und 3-Stellung substituierten Produkte (**2a**, **2b**) enthielt (Verhältnisse o/m/p = 38/7/55). Die Reaktionstemperatur von 50 °C bei der Chlormethylierung stellt einen Kompromiss dar, da schon bei geringfügiger Unterschreitung vermehrt die ortho-Verbindung auftritt, während durch Temperaturerhöhung die Bildung zweifach chlormethylierter Produkte begünstigt wird, wie GC-MS-Daten zeigten.

Die sich anschließende Reaktion mit *in situ* gebildetem Kaliumphenolat in Aceton ergab ein öliges Stoffgemisch aus 1-(4-Chlorbutyl)-4-(phenoxymethyl)benzen (**3**) und den analogen ortho- und meta-Regiomeren, das durch SC von einem weiteren Nebenprodukt, dem Diether 1-(4-Phenoxybutyl)-4-(phenoxymethyl)benzen separiert wurde.

Die analoge Umsetzung des nach der Fraktionierung im Hochvakuum erhaltenen Regiomerengemisches (**2**, **2a**, **2b**) mit *p*-Hydrochinon und Kaliumcarbonat führte statt zum 4-[4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy]phenol durch zweifache Veretherung zum 1,4-Bis[4-(4-chlorbutyl)benzyloxy]benzen als Hauptprodukt. Durch Einsatz des *p*-Hydrochinon-monobenzoats wurde die Nebenreaktion unterbunden. Die Estergruppe konnte während der sich anschließenden nukleophilen Substitution leicht abgespalten werden.

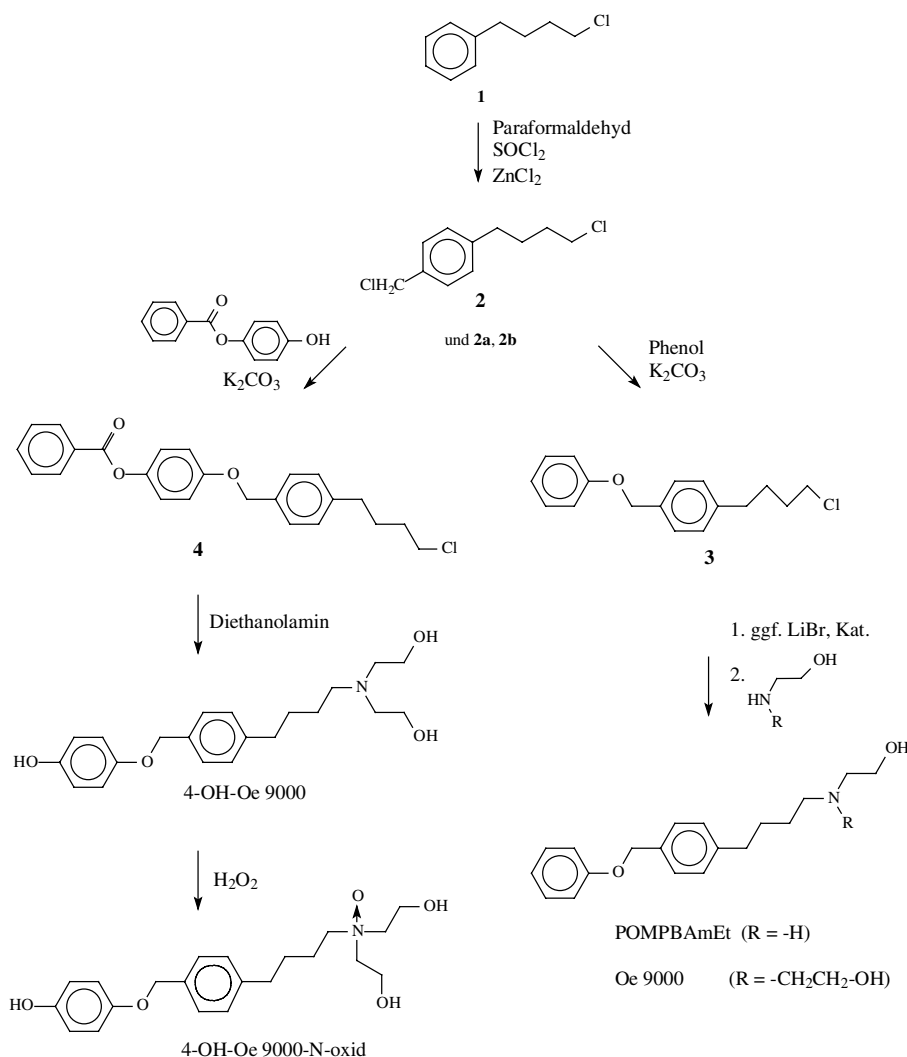
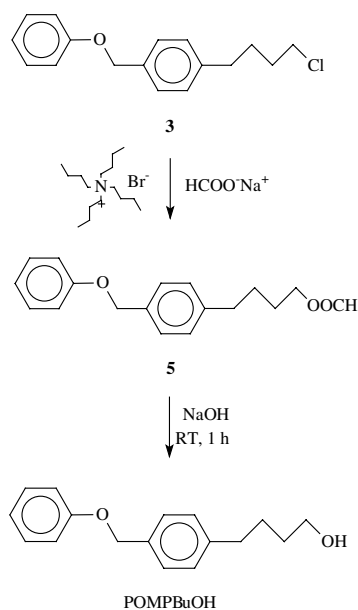
Die Umsetzung der Alkylhalogenide (**3** und **4**) mit dem 3–4fachen Überschuss Diethanolamin bzw. 2-Aminoethanol führte damit direkt zu Oe 9000, 4-OH-Oe 9000 bzw. 2-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylamino]ethanol (POMPBAmeT). Im späteren Verlauf der Versuche wurde erkannt, dass sich eine bemerkenswerte Ausbeutesteigerung erzielen lässt, wenn vor der Aminzugabe mit Lithiumbromid und dem Phasentransferkatalysator Methyltriocetylammmoniumchlorid nach Kobayashi (Kobayashi et al. 1998) in der Schmelze zum Alkylbromid umhalogeniert wird.

Die N-Oxide ließen sich nach Seeling (1996) durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid in Methanol gewinnen. 4-OH-Oe 9000-N-oxid fiel zudem als Nebenprodukt bei der Synthese des 4-OH-Oe 9000 an.

2.2. Synthese der stickstofffreien Metaboliten

2.2.1. 4-(4-Phenoxyethylphenyl)butanol (POMPBUOH)

Die Eintopf-Synthese nach Zahalka und Sasson (1986) ausgehend von **3** (Schema 2) erwies sich als einfach, schnell und ertragreich (Gesamtausbeute über beide Teilschritte >90 % d. Th.). Bei der Reaktion werden die einfache Überführbarkeit des Alkylhalogenids zum Formiat mit einem Phasentransferkatalysator in der Schmelze (Lele et al. 1983) und die hohe Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ausgenutzt.

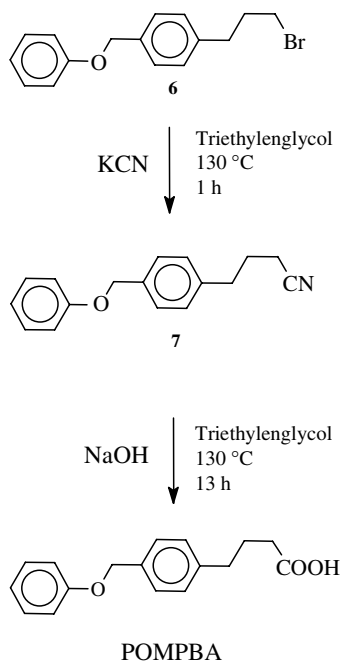
Schema 1 Syntheschema zur Darstellung der Referenzsubstanzen 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, POMPBAmEt und Oe 9000**Schema 2** Synthese der Referenzsubstanz POMPBuOH

2.2.2. 4-(4-Phenoxyethylphenyl)buttersäure (POMPBA)

Durch Umsetzung von 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**6**) (Schema 3) – einem Zwischenprodukt aus der Synthese von Fomocainderivaten mit Propylkette – in einer Kolbe-Nitrilsynthese und sich anschließender alkalischer Nitrilhydrolyse ließ sich POMPBA in hoher Ausbeute (80 % d. Th.) gewinnen.

2.3. Biopharmazeutische Untersuchungen

Die Biotransformation von Oe 9000 wurde an aus drei Schweinelebern gewonnenen Homogenaten geprüft. Für die Inkubationen der 10000 × g-Überstände und Mikrosomen vom Schwein wurden die Oe 9000-Konzentrationen mit 150–335 μmol/l so gewählt, dass während des Versuchs jederzeit ein Substratüberschuss zur Umsetzung zur Verfügung stand. Da die Nachweisgrenzen der Metaboliten im oberen nanomolaren Bereich liegen, durfte die Ausgangskonzentration an Oe 9000 zur Aufklärung von Biotransformationsnebenwegen auch nicht wesentlich niedriger gewählt werden. Die Substratkonzentration wurde damit oberhalb des Bereichs therapeutischer Plasmakonzentrationen vergleichbarer Lokalanästhetika angesetzt. Lange Inkubationszeiten sollten die Bildung von Sekundärmetaboliten ermöglichen. Die Enzymaktivität der CYPs

Schema 3 Synthese der Referenzsubstanz POMPBA

ist unter diesen Versuchsbedingungen nach etwa 40 min erschöpft (Oelschläger et al. 2001).

2.4. Ergebnisse

Für die Identitätsbeweise der Metaboliten wurden die folgenden analytischen Kenndaten mit denen der Referenzsubstanzen verglichen, nämlich die Retentionszeiten der Substanzen in mindestens zwei HPLC-Systemen sowie die UV- und Massenspektren der im HPLC aufgetrennten Metaboliten. Nicht von jedem Metaboliten ließen sich all diese Daten erfassen. So fanden beispielsweise für POMPBA und POMPBuOH keine ausreichenden Ionisierungen unter den gewählten HPLC-MS-Bedingungen statt. Die Identifizierung gelang trotzdem zweifelsfrei anhand der übrigen Charakteristika und konnte im Fall von POMPBA zusätzlich in ersten GC-MS-Untersuchungen nach Silylierung mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoacetamid (BSTFA) in Pyridin bestätigt werden.

2.4.1. HPLC

Die Identitätssicherung der Metaboliten erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeiten zweier aufeinanderfolgender Chromatographieläufe von Probe und Referenz oder durch Spiken von Referenzsubstanz zur bereits analysierten Probe und erneuter chromatographischer Analyse.

Auf diese Weise konnte beispielsweise die Identität der stickstofffreien Metaboliten gesichert (Abb. 1 u. 2), aber auch die Entstehung von Phenol während der Inkubation ausgeschlossen werden.

2.4.2. ESI-Massenspektren

Unter den im Versuchsteil bezeichneten ESI-MS-Bedingungen fragmentierten Oe 9000 und die stickstoffhaltigen Metaboliten kaum, so dass POMPBA_mEt, Oe 9000, Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid anhand ihrer $[M + H]^+$ -Linien bei m/z 300, 344, 360 und 376 erkannt werden konnten. Zusätzlich trat jeweils ein um 94 (Phenol) bzw. bei den in 4-Stellung oxygenierten Derivaten ein um 110 m/z -Einheiten (*p*-Hydrochinon) verringertes Fragment auf, das aus der Etherspaltung resultierte (Abb. 3).

2.4.3. Online-UV-Spektren

Aus der Kenntnis der Molmasse war noch kein sicherer Schluss über den Ort der metabolischen Veränderung im Molekül zu ziehen. Hier leisteten die mit dem System 2 aufgenommenen UV-Spektren außerordentlich nützliche Dienste, um Anwesenheit, Art und Position der Substituenten an den chromophoren Zentren des Oe 9000-Moleküls zu erkennen bzw. auszuschließen (Abb. 4). Oe 9000 weist unter diesen Bedingungen ein globales Maximum bei 222 nm und ein lokales Maximum bei 271 nm auf. Präsenz und Lage des 1. Maximums geben Aufschluss über die Unversehrtheit der Benzylphenyletherstruktur. Mithilfe der bathochromen Verschiebung des 2. Maximums von 271 nm auf 292 nm ließ sich die 4-Stellung der durch CYP eingeführten Hydroxylgruppe bei den 4-OH-Oe 9000-Derivaten am Exoring bestimmen. Im Gegensatz dazu würde eine Substitution in 2-Stellung eine Verschiebung des Maximums auf 276 nm bewirken (Oelschläger et al. 1975).

2.4.4. Nachweis von N-Oxiden durch Reduktion

N-Oxide lassen sich leicht durch $TiCl_3$, Natriumdithionit und andere starke Reduktionsmittel reduzieren, was für ihre Identifizierung genutzt werden kann.

Die Reduktion mit Natriumdithionit erwies sich als hilfreich beim Nachweis von Oe 9000-N-oxid, da mit keiner der beschriebenen HPLC-Methoden eine Basislinientrennung der Oe 9000- und Oe 9000-N-oxid-Peaks erreicht wurde. Neben relativ großen Mengen Oe 9000 wurden kleine Mengen Oe 9000-N-oxid nachgewiesen, indem letztere aus saurem Milieu durch Extraktion selektiv aufkonzentriert und anschließend mittels LC-MS untersucht wurden (Methode 2a). Im ESI-MS traten mit m/z 344 und 360 die $[M + H]^+$ -Signale der Mutterverbindung und des N-Oxids auf, doch erst die nachfolgende Reduktion des N-Oxids zum Amin mit Natriumdithionit, wodurch das

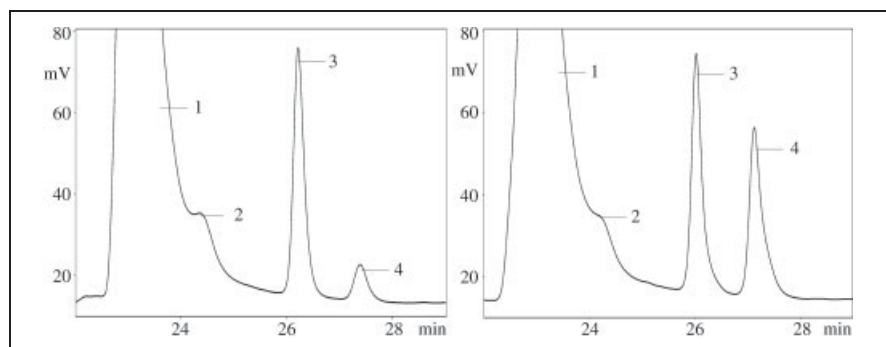


Abb. 1:
Identitätsnachweis von POMPBuOH nach Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen mit Oe 9000, HPLC-System 1 und Methode 1. Links: Probe. Rechts: mit synthetisiertem POMPBuOH versetzte Probe. 1 = Oe 9000 und Oe 9000-N-oxid (übereinander), 2 = POMPBA_mEt, 3 = POMPBA, 4 = POMPBuOH

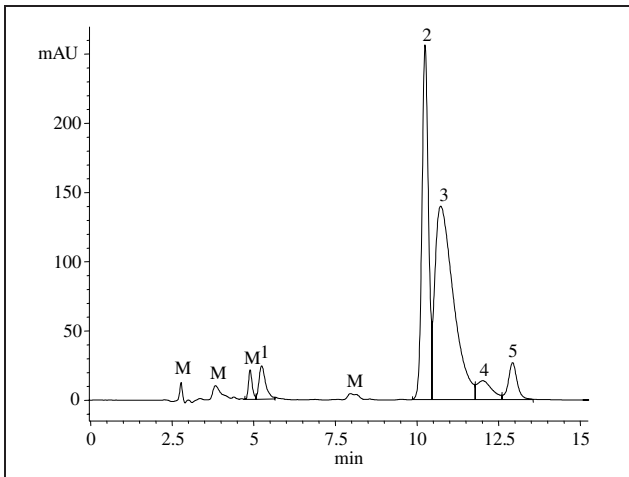


Abb. 2: Chromatogramm nach Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen mit Oe 9000, HPLC-System 2 und Fließmittel 2 nach Aufarbeitung mit Methode 2b, M = Matrix, 1 = 4-OH-Metaboliten (übereinander), 2 = Oe 9000-N-oxid, 3 = Oe 9000 und POMPBAmEt (übereinander), 4 = POMPBUOH, 5 = POMPBA

zweite Signal unterdrückt und das erste Signal verstärkt wurde, verrät den genauen Ort der Oxygenierung.

2.4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Mithilfe der Referenzsubstanzen wurde die Identität von sechs Phase-I-Metaboliten nach Inkubationen von Oe 9000 mit Schweineleberhomogenaten nachgewiesen. Außerdem wurde nicht umgesetztes Oe 9000 wiedergefunden. Das Metabolitenmuster nach Mikrosomeninkubation unterschied sich qualitativ nicht von dem, welches aus den Inkubationen mit dem $10000 \times g$ -Überstand resultierte, was den Schluss nahelegt, dass die metabolisierenden Enzyme überwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

In beiden *In-vitro*-Modellen trat vordergründig oxidative Desaminierung auf, was nach Oxidation des als Intermediat anzunehmenden Aldehyds 4-(4-Phenoxymethylphenyl)butanal (POMPBAld) zu dem Hauptmetaboliten POMPBA und nach Reduktion zu POMPBUOH führte. Der Aldehyd selbst entzog sich dem Nachweis. Es überraschte, dass POMPBA und POMPBUOH auch mit der Fraktion der gewaschenen Mikrosomen auftraten. Hierfür dürften Restaktivitäten nicht vollständig abgetrennter Al-

koholdehydrogenase bzw. Aldehyddehydrogenase in der Mikrosomenfraktion verantwortlich sein.

Daneben wurde Oxygenierung in 4-Stellung des Exorings sowie N-Oxidbildung anhand des Auftretens der Verbindungen 4-OH-Oe 9000, Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000-N-oxid beobachtet. In vergleichsweise geringen Mengen entstand durch oxidative N-Desalkylierung POMPBAmEt.

3. Diskussion

Nach umfangreichen Prüfungen der physikochemischen, pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften von weit über 100 Fomocain-Derivaten, in denen sich im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz Oe 9000 als vielversprechender Kandidat abhob, galt es, den Metabolismus dieser neuen Substanz zu untersuchen. Während in früheren Arbeiten überwiegend Rattenleberhomogenate als *In-vitro*-Biotransformationsmodelle genutzt worden waren, entschieden wir uns in dieser Studie für Homogenate vom Schwein, da dessen Biotransformationsreaktionen häufig mit denen des Menschen konform gehen (Desille et al. 1999). So erkannten Jurima-Romet et al. (2000) anhand der Kreuzreaktivitäten humaner CYPs mit Antikörpern vom Schwein die große Strukturähnlichkeit für die metabolisch bedeutenden Cytochrome CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Soucek et al. (2001), die zusätzlich auch Ähnlichkeiten in den Enzymaktivitäten für CYP3A4, CYP2A6, CYP2D6, CYP2E1, CYP2C9 gefunden haben. Soweit untersucht, interagiert Oe 9000 (bei der Ratte) vorwiegend mit CYP1A und CYP2B, während die Wechselwirkung mit CYP3A nur geringfügig ausgeprägt ist. Seeling et al. (2001) hatten am Fomocain gezeigt, dass Oxygenierung des Exorings, N-Oxidation und oxidative Desaminierung zu einem drastischen bis vollständigen Verlust der lokalanästhetischen Wirksamkeit führen. Diese Ergebnisse gelten mit hoher Wahrscheinlichkeit für die gesamte Fomocaingruppe. Damit muss lediglich für den aufgetretenen Oe 9000-Metaboliten POMPBAmEt im Hinblick auf seine hohe Basizität und Lipophilie die Frage offen bleiben, ob diese Substanz nicht lokalanästhetisch wirksam ist und damit einen Beitrag für das Gesamtwirkungsspektrum liefert.

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen dürfte mit Oe 9000 eine Verbindung gefunden worden sein, die so-

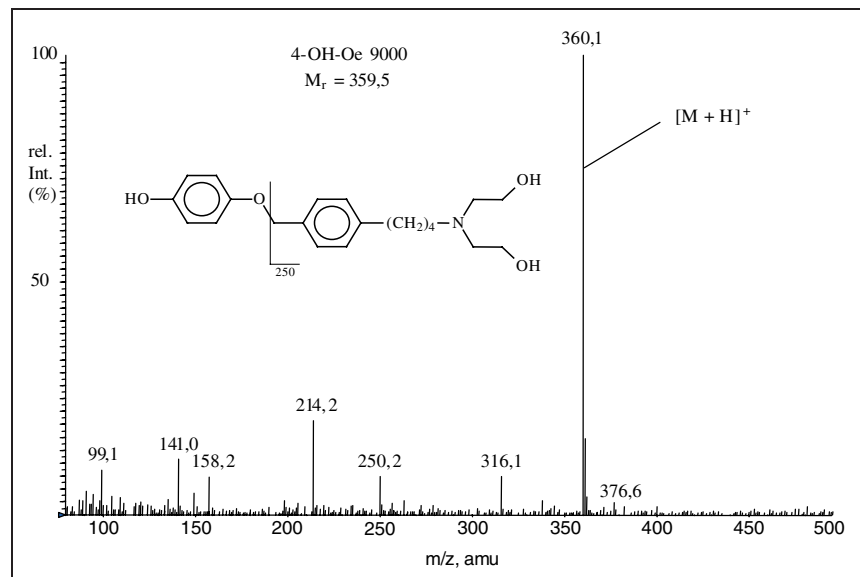


Abb. 3: ESI-MS von 4-OH-Oe 9000 nach Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen mit Oe 9000, System 2, Fließmittel 3

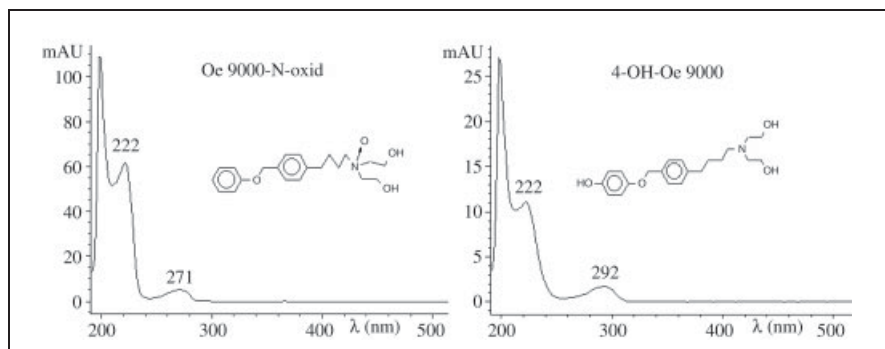


Abb. 4:
Online-UV-Spektrum: Bathochrome Verschiebung des lokalen Maximums von 271 auf 292 nm durch Oxygenierung von Oe 9000 in 4-Stellung des Exorings, System 2, Fließmittel 3

wohl für die Oberflächen- als auch für die Leitungsanästhesie geeignet ist. Seine lang anhaltende Wirkung macht es aber vor allem für die Erschließung neuer Indikationsgebiete in der Schmerztherapie interessant. So gilt zu klären, ob Oe 9000 zur Kupierung postoperativer Schmerzen in Form einer epiduralen Bolusinjektion oder einer kontinuierlichen epiduralen Infusion in Frage käme. Im Vergleich mit dem für diese Indikation zugelassenen Levobupivacain ist Oe 9000 weniger toxisch und zeigt kaum Wechselwirkungen mit CYP3A4, wodurch das therapeutische Risiko gesenkt werden könnte.

4. Experimenteller Teil

4.1. Synthesen

4.1.1. Synthese von Oe 9000 und dessen Hydrochlorid

4.1.1.1. 1-(4-Chlorbutyl)-4-(chloromethyl)benzen (2)

34,0 g (0,20 mol) (4-Chlorbutyl)benzen (**1**), 15,0 g Paraformaldehyd und 9,0 g (0,066 mol) frisch geschmolzenes ZnCl_2 werden 30 min bei 40 °C gerührt. Dann werden unter intensivem Rühren 35 g (0,29 mol) SOCl_2 so zugetropt, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Nach beendeter Zugabe wird noch 2 h bei 50 °C weiter gerührt (DC-Kontrolle, Fließmittel: Petrolether + $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 75 + 25$, V/V). Überschüssiges SOCl_2 wird unter Eisbadkühlung mit Wasser zersetzt. Nach dem Abkühlen wird mit CH_2Cl_2 aufgenommen, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird im Hochvakuum destilliert.

Bei 115 °C und 1,3 Pa gehen 24 g (55 % d. Th.) **2** als schwach gelbes Öl über, das noch ca. 19 % des ortho- sowie 1 % des meta-Regiomerenproduktes enthält (GC-MS, Retentionsreihenfolge: 1. ortho, 2. meta, 3. para).

Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS): m/z [%] = 216 [23, M^+], 181 [100], 167 [5], 139 [91], 117 [13], 104 [34], 91 [29], 77 [13].

4.1.1.2. 1-(4-Chlorbutyl)-4-(phenoxy)methyl)benzen (3)

In 100 ml frisch destilliertem Aceton werden 6,0 g (0,028 mol) des vorstehenden Regiomeregemisches und 2,6 g (0,028 mol) Phenol gelöst und dann 7,7 g (0,056 mol) K_2CO_3 zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle, Fließmittel: Petrolether + $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 75 + 25$, V/V). Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zunächst mit 10%iger Na_2CO_3 -Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Man trocknet über wasserfreiem Na_2SO_4 , filtriert und destilliert das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (RV) ab. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt so über Kieselgel 60 (63–200 μm , Petrolether + Dichlormethan = 50 + 50, V/V, $R_{\text{f,Produkt}} = 0,8$) und durch anschließende dreimalige Umkristallisation bei 0 °C aus Methanol. Ausbeute: 3,5 g **3** (45 % d. Th.). Die farblosen Kristalle, die bei Raumtemperatur (RT) zerfließen, sind noch mit 4 % des entsprechenden ortho-Regiomeren verunreinigt (GC-MS).

EI-MS: m/z [%] = 274 [2, M^+], 181 [100], 145 [2], 117 [13], 104 [19], 91 [13], 77 [4], 65 [5].

^1H NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 7,07–7,38 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,83–6,94 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,95 [2 H, s, benzyll], 3,42–3,56 [2 H, t, $J = 6,3$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$], 2,52–2,74 [2 H, t, $J = 7,0$, $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$], 1,60–1,84 [4 H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$].

^{13}C NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 158,9, 141,7, 134,6, 129,5, 128,6, 127,8, 120,9, 114,8, 69,8, 44,9, 34,8, 32,1, 28,5.

4.1.1.3. 2,2'-[4-(4-Phenoxy)methylphenyl]butylimino]diethanol (Oe 9000)

3,0 g (0,011 mol) **3** werden mit 1,9 g (0,022 mol) LiBr und 0,22 g (0,55 mmol) Methyltriocetylammmoniumchlorid versetzt und auf 125 °C erhitzt. Die Umhalogenierung ist bei dieser Temperatur nach 1 h Rühren abgeschlossen. Es folgt die Zugabe von 5,0 g (0,048 mol) Diethanolamin bei 95 °C. Man setzt noch 48 h unter Rühren bei 95–100 °C um (DC-Kontrolle, Fließmittel: Hexan + Ethylacetat = 3 + 1, V/V). Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen, mit K_2CO_3 schwach alkalisch gestellt und viermal mit Dichlormethan extrahiert.

Die vereinten organischen Phasen werden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und am RV entfernt. Es verbleibt ein kristalliner Rückstand, der nach Umkristallisation aus heißem Methanol 2,80 g Oe 9000 (74,0 % d. Th.) als farblose Kristalle vom Schmp. 52 °C (HPLC-Reinheit >99,9 %) ergibt.

Die Ausbeute über 3 Stufen, berechnet auf eingesetztes **1**, beträgt 18 % d. Th. Elektrospray-Ionisation (ESI-MS): m/z [%] = 366 [2, ($\text{M} + \text{Na}$)⁺], 344 [100, ($\text{M} + \text{H}$)⁺], 250 [9].

^1H NMR (MeOD): δ [ppm] = 7,15–7,41 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,87–7,07 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,03 [2 H, s, benzyll], 3,54–3,70 [4 H, t, $J = 5,9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,50–2,75 [8 H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ + $\text{N}(\text{CH}_2-)_3$], 1,44–1,77 [4 H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$].

^{13}C NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 160,3, 143,5, 136,1, 130,5, 129,6, 128,8, 121,9, 115,9, 70,8, 60,7, 57,6, 56,1, 36,5, 30,4, 27,4.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1246, 754, 1030, 1009, 2940, 3382.

4.1.1.4. Oe 9000-Hydrochlorid

Man löst 1,0 g der erhaltenen Base in Ether und tropft unter Rühren HCl in Ether hinzu. Beim Stehenlassen bei 2 °C fällt das Hydrochlorid aus. Der Niederschlag wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,7 g Oe 9000-HCl (70 % d. Th.) vom Schmp. 140 °C.

4.1.2. Synthesen der stickstoffhaltigen Metaboliten

4.1.2.1. 2,2'-[4-(4-Phenoxy)methylphenyl]butylimino]diethanol-N-oxid (Oe 9000-N-oxid)

Es werden 138 mg (0,383 mmol) Oe 9000 in 2 ml Methanol gelöst und mit dem gleichen Volumen an wässriger Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzt. Dabei fällt ein Teil der Base wieder aus. Nach 48 h Rühren bei RT wird das dreifache Volumen Wasser zugesetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zentrifugation lässt sich der Niederschlag vom Solvens abtrennen und anschließend mit Wasser waschen. Es wird erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wird vom Waschwasser befreit und in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wird erst mit 0,1%iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung, dann mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und am RV vom Solvens befreit.

Ausbeute: 87 mg Oe 9000-N-oxid (60 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 105 °C.

ESI-MS: m/z [%] = 398 [0,5, ($\text{M} + \text{K}$)⁺], 382 [1, ($\text{M} + \text{Na}$)⁺], 360 [100, ($\text{M} + \text{H}$)⁺], 266 [0,5], 145 [2].

^1H NMR (MeOD): δ [ppm] = 7,00–7,30 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,73–6,91 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,92 [2 H, s, benzyll], 3,78–4,01 [4 H, t, $J = 4,7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 3,27–3,58 [6 H, m, $\text{N}(\text{CH}_2-)_3$], 2,46–2,72 [2 H, t, $J = 7,4$ Hz, $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$], 1,43–1,88 [4 H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$].

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1245, 761, 3331, 1012, 1077, 2928.

4.1.2.2. 2-[4-(4-Phenoxy)methylphenyl]butylamino]ethanol-Hydrochlorid (POMPBAmeHCl)

0,5 g (1,8 mmol) **3** in 6 ml frisch destilliertem Dioxan ergeben mit 0,44 g (7,3 mmol) 2-Aminoethanol unter Zusatz von 0,053 g (0,32 mmol) Kaliumiodid nach 72 h Rühren bei 90 °C ein orange gefärbtes Stoffgemisch. Nach Abziehen des Lösungsmittels am RV wird der Rückstand mit Dichlormethan

than aufgenommen. Man wäscht einmal mit Wasser und befreit die vereinten organischen Extrakte vom Solvens. Nach sc Aufreinigung (Kieselgel 60, 63–200 µm Dichlormethan + MeOH + konz. Ammoniaklösung = 50 + 50 + 1,25, V/V) wird das Eluens am RV entfernt. Man nimmt mit Ether auf, wäscht mit Wasser, trocknet über Na₂SO₄, filtriert, engt die Lösung ein, fällt nach Zugabe von Petrolether das Hydrochlorid mit HCl_g in Ether und kristallisiert aus Isopropanol um.

Ausbeute: 0,211 g POMPBA_{Me} (35 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 169–170 °C.

ESI-MS: *m/z* [%] = 338 [1, (M + K)⁺], 322 [4, (M + Na)⁺], 300 [100, (M + H)⁺], 282 [1], 206 [38], 145 [13].

¹H NMR der Base (CDCl₃): δ [ppm] = 7,13–7,41 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,88–7,05 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,01 [2 H, s, benzyll], 3,56–3,71 [2 H, t, J = 5,1, –CH₂OH], 2,56–2,80 [6 H, m, –Ph–CH₂–CH₂– + HN(CH₂)₂], 1,45–1,76 [4 H, m, –CH₂–CH₂–].

¹³C NMR der Base (CDCl₃): δ [ppm] = 158,9, 142,2, 134,5, 129,5, 128,6, 127,7, 120,9, 114,8, 69,8, 60,6, 51,3, 49,4, 35,5, 29,6, 29,1.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1245, 753, 2867, 2929, 1010, 1497, 2823, 3250, 1597.

4.1.2.3. 4-[4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy]phenyl-benzoat (4)

In 80 ml frisch destilliertem Aceton werden 5,2 g (0,025 mol) des Regio-merengemisches (2, 2a, 2b) gelöst, 5,4 g (0,025 mol) 4-Hydroxyphenylbenzoat suspendiert und dann 4,0 g (0,029 mol) K₂CO₃ zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss unter Stickstoff erhitzt (DC-Kontrolle, Fließmittel: Petrolether + CH₂Cl₂ = 10 + 90, V/V). Nach beendeter Reaktion wird mit 50 ml 0,2 M-HCl aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zunächst mit 10%iger NaHCO₃-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Man trocknet über Na₂SO₄, filtriert und destilliert das Lösungsmittel am RV bei 40 °C ab. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt sc über Kieselgel 60 (63–200 µm, Petrolether + Dichlormethan = 25 + 75, V/V, Rf_{Produkt} = 0,75) und durch anschließende zweimalige Umkristallisation bei 0 °C aus einer Methanol-Aceton-Mischung (50 + 50, V/V). Ausbeute: 3,2 g 4 (32 % d. Th.), farblose Kristalle. Sie sind noch mit 5 % des ortho- und 1 % des meta-Regioisomeren verunreinigt (GC-MS).

EI-MS: *m/z* [%] = 394 [2, M⁺], 181 [100], 145 [4], 117 [7], 105 [44], 91 [16], 77 [25], 51 [4].

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 8,08–8,14 [2 H, d, arom. H-2, H-6], 7,50–7,59 [1 H, t, arom. H-4], 7,38–7,46 [2 H, d, arom. H-3, H-5], 7,26–7,31 [2 H, d, J = 8,0 Hz, arom. H-2', H-6'], 7,10–7,16 [2 H, d, J = 8,0 Hz, arom. H-3', H-5'], 7,03–7,08 [2 H, d, J = 9,1 Hz, arom. H-2', H-6'], 6,92–6,95 [2 H, d, J = 9,1 Hz, H-3', H-5'], 4,89 [2 H, s, benzyll], 3,42–3,52 [2 H, t, J = 6,3, –CH₂–Cl], 2,54–2,62 [2 H, t, J = 7,5, –Ph–CH₂–CH₂–], 1,63–1,84 [4 H, m, –CH₂–CH₂–].

¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 165,5, 156,6, 144,6, 141,8, 134,4, 133,5, 130,2, 129,7, 128,6, 127,8, 122,5, 115,5, 70,4, 44,9, 34,8, 32,1, 28,5.

4.1.2.4. 2,2'-[4-[4-(4-Hydroxy-phenoxymethyl)phenyl]butylimino]-diethanol (4-OH-Oe 9000)

Die Umsetzung von 1,0 g (2,53 mmol) 4 in 7,5 ml absolutem Dioxan mit dem vierfachen Überschuss Diethanolamin (1,33 g entsprechend 12,7 mmol) ergibt nach fünftägiger Umsetzung unter Rühren bei 95–101 °C ein Gemisch, welches neben dem angestrebten Produkt auch das entsprechende N-Oxid enthält. Der Reaktionsverlauf lässt sich dc (Dichlormethan + MeOH + Ammoniak (26 %) = 50 + 50 + 1,25, V/V, Detektion: UV₂₅₄, Dragendorffs Reagenz bzw. Bromcresolgrün; Rf_{Produkt} = 0,84, Rf_{4-OH-Oe 9000-N-Oxid} = 0,55) verfolgen. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel am RV entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Der pH-Wert 9 wird mit 5%iger NaOH-Lösung eingestellt. Anschließend erfolgt die Extraktion mit Ether sowie das Waschen der vereinten Etherphasen mit Wasser. Durch SC (Kieselgel 60, 63–200 µm, Fließmittel wie für DC) kann das Produkt von seinem N-Oxid und nicht umgesetztem Edukt getrennt werden. Die Eluate werden einrotiert. Die in Ether aufgenommene Base wird durch Zugabe von wenig Toluol ausgefällt und anschließend im Vakuum unter Stickstoff getrocknet. Das als Nebenprodukt durch Luftoxidation entstandene N-Oxid wird aus heißem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 125 mg (13,7 % d. Th.) 4-OH-Oe 9000, beigefarbene Kristalle vom Schmp. 192–193 °C sowie 200 mg (21,0 % d. Th.) farblose Kristalle des N-Oxids vom Schmp. 150 °C.

ESI-MS: *m/z* [%] = 398 [0,5, (M + K)⁺], 382 [2, (M + Na)⁺], 360 [100, (M + H)⁺], 250 [3].

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,29–7,37 [2 H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-2', H-6'], 7,14–7,17 [2 H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-3', H-5'], 6,80–6,83 [2 H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-3, H-5], 6,67–6,82 [2 H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-2, H-6] 4,94 [2 H, s, benzyll], 3,55–3,68 [4 H, t, J = 4,0 Hz, –CH₂OH], 2,55–2,71 [8 H, m, –Ph–CH₂–CH₂– + HN(CH₂)₃], 1,47–1,77 [4 H, m, –CH₂–CH₂–].

¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 150,7, 149,6, 140,4, 133,5, 126,6, 125,8, 114,2, 114,0, 68,9, 57,6, 54,6, 53,1, 33,5, 27,3, 24,4.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1511, 1234, 1046, 3227, 2941.

4.1.2.5. 2,2'-[4-[4-(4-Hydroxy-phenoxymethyl)phenyl]butylimino]-diethanol-N-oxid (4-OH-Oe 9000-N-oxid)

Es werden 40,0 mg (0,111 mmol) 4-OH-Oe 9000 in 1 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzt. Der Verlauf wird dc kontrolliert (Dichlormethan + MeOH + konz. Ammoniaklösung = 50 + 50 + 1,25, V/V). Nach 24 h Umsetzung wird durch weitere Zugabe von Methanol und Kühlung auf 0 °C das N-Oxid gefällt. Die Umkristallisation des Produkts aus heißem Methanol ergibt farblose Kristalle vom Schmp. 150 °C. Ausbeute: 37 mg 4-OH-Oe 9000-N-oxid (88 % d. Th.).

ESI-MS: *m/z* [%] = 414 [0,5, (M + K)⁺], 398 [1, (M + Na)⁺], 376 [100, (M + H)⁺], 360 [3], 267 [0,5], 250 [1], 145 [1], 122 [1].

¹H NMR (MeOD): δ [ppm] = 7,25–7,33 [2 H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-2', H-6'], 7,16–7,21 [2 H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-3', H-5'], 6,81–6,85 [2 H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-3, H-5], 6,67–6,82 [2 H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-2, H-6], 4,94 [2 H, s, benzyll], 3,78–4,03 [4 H, t, J = 5,9 Hz, –CH₂OH], 3,31–3,54 [6 H, m, N(CH₂)₃], 2,45–2,72 [2 H, t, J = 7,7 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–], 1,62–1,91 [4 H, m, –CH₂–CH₂–].

¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 150,9, 149,8, 139,9, 134,0, 126,7, 125,9, 114,5, 114,1, 69,2, 65,5, 54,6, 33,3, 26,7, 21,0.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1234, 1510, 1003, 828, 2926, 1077.

4.1.3. Synthesen der stickstofffreien Referenzsubstanzen POMPBUOH und POMPBA

4.1.3.1. 4-(4-Phenoxymethylphenyl)butanol (POMPBUOH)

400 mg (1,46 mmol) 3 ergeben bei der Umsetzung mit 198 mg (2,91 mmol) Natriumformiat unter Zusatz von 24 mg (0,073 mmol) Tetrabutylammoniumbromid bei einer Temperatur von 125 °C den entsprechenden Ameisensäureester. Nach 4 h ist die Veresterung beendet (DC-Kontrolle mit Dichlormethan + Petrolether = 40 + 60, V/V).

Die Hydrolyse zu POMPBUOH wird mit 4 ml wässriger NaOH (20 mg/ml) über 16 h bei 30 °C durchgeführt. Dabei fällt das Produkt feinkristallin aus. Die Umkristallisation aus heißem Wasser und anschließende Trocknung über P₄O₁₀ ergibt dc-reine gelbliche Plättchen, die bei 52,5–53,5 °C schmelzen. Ausbeute: 90 % d. Th.

EI-MS: *m/z* [%] = 256 [2, M⁺], 163 [100], 145 [19], 130 [7], 117 [46], 104 [20], 91 [15].

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,18–7,47 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,93–7,12 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,07 [2 H, s, benzyll], 3,62–3,77 [2 H, t, J = 6,5 Hz, –CH₂OH], 2,63–2,78 [2 H, t, J = 7,3 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–], 1,57–1,87 [4 H, m, –CH₂–CH₂–].

¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 158,9, 142,2, 135,5, 129,5, 128,7, 127,7, 120,9, 114,9, 69,9, 62,8, 35,4, 32,3, 27,5.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1248, 747, 2928, 2914, 1496, 2857, 1010.

4.1.3.2. 4-(4-Phenoxymethylphenyl)butyronitril (7)

1,30 g (4,3 mmol) 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen, 347 mg (5,3 mmol) KCN und 1 ml Triethylenglycol werden in einem Rundkolben auf 130 °C erhitzt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle: Petrolether + Dichlormethan = 50 + 50, V/V) wird in Wasser gegossen und erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und vom Solvens befreit.

Die Umkristallisation des Rückstands aus einer heißen Wasser-Acetonitril-Mischung (10 + 1, V/V) und anschließende Trocknung über P₄O₁₀ ergeben farblose Kristalle vom Schmp. 86 °C. Ausbeute: 88,3 % d. Th., Rohausbeute 98,9 % d. Th.

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,07–7,38 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,81–6,99 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,96 [2 H, s, benzyll], 2,64–2,80 [2 H, t, J = 7,5 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–], 2,17–2,31 [2 H, t, J = 7,3 Hz, –CH₂–CN], 1,80–2,00 [2 H, quint, J = 7,3 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–].

¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 158,8, 139,5, 135,4, 129,5, 128,7, 128,0, 121,0, 119,5, 114,8, 69,7, 34,1, 26,9, 16,4.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1247, 1237, 753, 1015, 1599, 1499, 1031, ... , 2240 (–C≡N).

4.1.3.3. 4-(4-Phenoxymethylphenyl)buttersäure (POMPBA)

50 mg (0,199 mmol) 7 werden mit 0,5 ml (3,1 mmol) 25%iger NaOH und 1 ml Triethylenglycol vorsichtig auf 130 °C erhitzt. Beim Erreichen der Temperatur wird der Rückflusskühler aufgesetzt, und man rührt weitere 13 h bei gleicher Temperatur. Nach dem Abkühlen erfolgt die Aufarbeitung durch Zugabe des fünffachen Volumens Wasser und Fällung des Produkts durch Zutropfen 15%iger Salzsäure. Nach Zentrifugation lässt sich der Niederschlag vom Solvens abtrennen und anschließend mit Wasser waschen. Der Niederschlag wird in Ether aufgenommen, die etherische Phase erneut mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Solvens befreit. Ausbeute: 44 mg POMPBA (80 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 120 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,08–7,32 [6 H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,82–6,94 [3 H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,95

[2 H, s, benzy], 2,54–2,67 [2 H, t, J = 7,6 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–], 2,24–2,36 [2 H, t, J = 7,3 Hz, –CH₂–COOH], 1,81–1,97 [2 H, quint, J = 7,5 Hz, –Ph–CH₂–CH₂–].
¹³C NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 179,5, 158,8, 141,1, 134,8, 129,5, 128,7, 127,7, 120,9, 114,8, 69,8, 34,7, 33,2, 26,2.
 IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1247, 1702 (>C=O), 1172, 1261, 2930, 748, ... , 3287 (–OH).

4.2. Biopharmazeutische Untersuchungen

4.2.1. Gewinnung der Leberhomogenate (nach Mazel 1971a)

Die noch schlachtfrische, körperwarme Schweineleber wird fein geschnitten und mit eiskaltem Tris-KCl-Puffer (Oelschläger 2001) (pH 7,4) gewaschen. Jeweils 90 g Leberstücke werden mit 180 ml Tris-KCl-Puffer versetzt und mittels Mixer (Waring[®] commercial blender, 22000 U/min, 1 min) und Ultra Turrax (T25; 13500 U/min; 30 s lang) homogenisiert. Die Homogenate werden zentrifugiert (20 min, 10000 × g, 1 °C) und die Überstände direkt für die Inkubation oder zur Mikrosomenpräparation verwendet. Zur Gewinnung der Mikrosomen werden die 10000 × g-Überstände 60 min lang bei 140000 × g und 1 °C zentrifugiert. Man dekantiert die lösliche Fraktion und resuspendiert das Zentrifugat mit der zweifachen Masse Tris-KCl-Puffer. Für die Versuche, die einer sorgfältigen Abtrennung von Begleitproteinen bedürfen, wird ein weiteres Mal zentrifugiert (140000 × g, 30 min, 1 °C) und ebenso resuspendiert.

10000 × g-Überstände werden frisch verwendet oder einige Tage bei –80 °C gelagert. Mikrosomen lassen sich einige Wochen bei –80 °C aufbewahren.

4.2.2. Gehaltsbestimmung von Cytochrom P-450 und Gesamtprotein

Der Proteingehalt der Leber wurde nach Mazel (1971b) auf 19–27 mg/g Leber bestimmt und der Gehalt an mikrosomalem CYP mittels UV-Aufnahme der CO-Spektren des mit Dithionit reduzierten CYP (Oelschläger et al. 1989). Die bereinigte Absorption für Cytochrom b₅ lag zwischen 0,003 und 0,012 pro mg Gesamtprotein, während die Absorption für CYP 2,9–3,5*10⁻³ pro mg Gesamtprotein betrug.

4.2.3. Inkubationen

4.2.3.1. Zusammensetzung des Inkubationsansatzes

0,50 ml Oe 9000 Stammlösung (vgl. 4.2.3.2.), 0,50 ml Suspension des Leberhomogenats, 1,00 ml Cofaktorlösung für CYP (Oelschläger et al. 1989).

4.2.3.2. Durchführung der Inkubationen

Die Inkubationen werden im Schüttelwasserbad bei 38–39 °C unter Luftzutritt durchgeführt. Als Stammlösungen dienen wässrige Lösungen von Oe 9000-HCl im Konzentrationsbereich von 0,6 bis 1,34 mmol/l. Nach einer Inkubationszeit von 40 min und sich anschließender zweiminütiger Abkühlungsphase auf RT wird die Umsetzung durch Zugabe von 1,5 ml frisch destilliertem Aceton (Methode 1) oder 250 µl 30%iger TFA (Methode 2) gestoppt.

Unter den selben Bedingungen werden jeweils Leerwerte (ohne Substratzusatz) und Referenzwerte (ohne Mikrosomenzusatz) inkubiert.

4.2.4. Probenvorbereitung

Zum Abtrennen der Proteine wird zentrifugiert und der Überstand bei einem Teil der Proben direkt der LC-MS-Analytik zugeführt (Methode 1), für die übrigen Proben schießt sich zur Aufkonzentrierung die Flüssig-Flüssig-Extraktion über Extrelut[®]-Material (Kieselgur) an. Dafür wird die Hälfte der Proben TFA-sauer gelassen (Methode 2a), die andere Hälfte mit Na₂CO₃ auf pH 10 gebracht (Methode 2b), auf die Extrelut[®]-Säulen N3 gegeben, mit 25 ml Ether extrahiert, mit Stickstoff vom Eluens befreit, im Acetonitril/Wasser-Gemisch (30 + 70, V/V) aufgenommen und mit dem HPLC-MS-System 2 untersucht.

4.2.5. Reduktion der N-Oxide

Die N-Oxide werden durch Zugabe von 25 mg Natriumdithionit pro ml Analysenprobe innerhalb von 45 min bei 40 °C reduziert. Die Abnahme der N-Oxid-Konzentrationen und Zunahme der Aminkonzentrationen lassen sich mittels LC-MS verfolgen.

4.3. Analytik

4.3.1. HPLC und HPLC-MS-Untersuchungen

4.3.1.1. HPLC-System 1

Gerätekonfiguration: Steuermodul SCL-6B, Pumpen LC-8A, UV-Detektor SPD-7A, Injektor SIL-6B, Bus-Modul CBM-10A, Software Class-LC10, alle Anlagenteile Shimadzu Europa GmbH Duisburg.

Die Chromatographie wird an einer LiChroCART[®] 250–4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm) durchgeführt; Fließmittel 1: TFA (0,1 %) und 1 mM

Natrium-1-octansulfonat in Acetonitril/Wasser = 32 + 68 (V/V), nach 10 min auf 65 + 35 (V/V, stufenförmiger Gradient), Flussrate 0,73 ml/min; Detektorwellenlänge 222 nm, Injektionsvolumen 50 µl.

4.3.1.2. HPLC-System 2 mit ESI-MS-Kopplung

HPLC: Probengeber, Steuermodul, Binäre Pumpen, Software u. Diodenarray-Detektor gehören zum System HP1100 von Hewlett-Packard. Fließmittel 2 (isokratisch): Acetonitril/Trifluoressigsäure (0,2 %, m/V) in Wasser = 60 + 40 (V/V), Säule LiChroCART[®] 250–4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm); Fließmittel 3 (Gradient, zur Differenzierung der 4-OH-Derivate genutzt): TFA (0,1 %, m/V) in Acetonitril/Wasser = 32 + 68 (V/V) für 13 min; lineare Änderung der Fließmittelzusammensetzung über 2 min; TFA (0,1 %, m/V) in Acetonitril/Wasser = 65 + 35 (V/V) für 18 min. Säule LiChroCART[®] 250–4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm), Flussrate 0,73 ml/min, Detektorwellenlängen: 222 nm, 239 nm, 271 nm, 292 nm, Injektionsvolumen 50 µl. Als Vorsäule dient jeweils LiChroCART[®] 4–4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm).

ESI-MS: Gerätekonfiguration: Single-Quadrupole-Gerät API 165TM, Interface: Turbo Ion Spray Source, Focusing Potential 230 V, Declustering Potential 30 V, Entrance Potential 10 V, Ion Spray Voltage 4500 V, Modus positiv, ESI-Interface-Temperatur 350 °C, Split: 1 : 5, Massenbereich: 100–450 m/z.

4.3.2. GC-MS

Gerätekonfiguration: G 1800C, GCD Plus System, Firma Hewlett Packard (USA), Detektortyp: EI, Säule: HP-5ms (Länge: 30 m, ID: 0,25 mm, Film: 0,25 µm), Firma J & W Scientific (CA, USA), Injektortemperatur: 250 °C, Detektortemperatur: 280 °C, Anfangstemperatur: 100 °C für 3 min, Heizrate: 10 K/min, Endtemperatur: 280 °C für 19 min, Gesamtlaufzeit: 40 min, Heliumdruck: 0,9 bar.

Literatur

- Desille M, Corcos L, L'Helgoualc'h A, Fremont B, Campion JP, Guillouzo A, Clement B (1999) Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy. *Transplantation* 68: 1437–1443.
- Ewald HW (1985) Synthese und Biotransformation von 1-Morpholino-3-[4-phenoxy¹⁴C]methyl-phenyl-propan-Hydrochlorid (¹⁴C-Fomocain-HCl). Dissertation, Univ. Frankfurt a. M.
- Fleck C, Karge E, Loy S, Wennek-Klose J, Listing M, Oelschläger H (2003) Local anaesthetic effects and toxicity of seven new diethanolamine and morpholine derivatives of fomocaine: Testing in rats compared with procaine and tetracaine. *Arzneim.-Forsch* 53: 221–228.
- Fleck C, Wennek-Klose J, Wange J, Oelschläger H (2004) Effects and toxicity of new fomocaine derivatives and of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion compounds in rats. *Arzneim.-Forsch* 54: 265–274.
- Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, Nowakowska M (2000) Evidence for the catalysis of dextromethorphan O-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig liver. *Toxicol In Vitro* 14: 253–263.
- Kobayashi Y, Nakano M, Kumar GB, Kishihara K (1998) Efficient conditions for conversion of 2-substituted furans into 4-oxygenated 2-enoic acids and its application to synthesis of (+)-aspicilin, (+)-patulolide A, and (–)-pyrenophorin. *J Org Chem* 63: 7505–7515.
- Lele SS, Bhavre RR, Sharma MM (1983) Fast and very slow reactions: phase transfer catalysis. *Chem Eng Sci* 38: 765–773.
- Lupp A, Knauth S, Karge E, Jung B, Listing M, Oelschläger H, Müller D, Klinger W, Fleck C (2003) Differential interactions of newly synthesized fomocaine derivatives with the cytochrome P450 system *in vitro*. *Nova Acta Leopold* 87(329): 239–252.
- Mazel P (1971a) Experiments illustrating drug metabolism *in vitro*. In: La Du BN, Mandel HG, Way EL (Hrsg.) *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, 1. Ausg., Baltimore, S. 546–582.
- Mazel P (1971b) General principles and procedures for drug metabolism *in vitro*. In: La Du BN, Mandel HG, Way EL (Hrsg.) *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, 1. Ausg., Baltimore, S. 527–545.
- Nieschulz O, Hoffmann I, Popendiker K (1958) Pharmacology of N-[3-(4-phenoxymethylphenyl)propyl]-morpholine, an amino ether with local anesthetic action. *Arzneim.-Forsch* 8: 539–544.
- Oelschläger H, Temple DJ, Temple CF (1975) The metabolism of the local anaesthetic fomocaine (1-Morpholino-3-[p-phenoxymethylphenyl]-propane) in the rat and dog after oral administration. *Xenobiotica* 5: 309–323.
- Oelschläger H, Rothley D (1979) Bioavailability and local anesthetic effect of a tyrothricin, fomocaine, diphenhydramine, and 8-hydroxyquinoline combination gel for burns and wounds. *Arzneim.-Forsch* 29: 693–697.
- Oelschläger H, Rothley D, Hellwich KH, Schmidt W (1989) Pharmacokinetics of hypolipidemic agents. V. Is 2-(4-hydroxyphenoxy)-2-methylpropionic acid a metabolite of the hypolipidemic agent ciprofibrate [2-[4-(2,2-dichlorocyclopropyl)phenoxy]-2-methylpropanoic acid]? *Arch Pharm (Weinheim)* 322: 337–342.
- Oelschläger H, Hädrich I, Dannhardt G (1991) New environmentally friendly synthesis of 3-(4-chloromethylphenyl)propyl chloride, an intermediate in the technical production of fomocaine. *Pharm Ztg Wiss* 4/136: 159–165.

- Oelschläger H, Glassl P, Seeling A, Wange J, Listing M, Jung B (2001) Synthesis and pharmacologic action of chiral fomocaine ($\{4\text{-}[2\text{-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether and $\{4\text{-}[1\text{-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl}\}$ -phenyl-ether). 13. Synthesis of new compounds with local anesthetic action. *Pharmazie* 56: 620–625.
- Seeling A (1996) Synthese und Analytik der Metabolite des Lokalanästhetikums Fomocain sowie Abklärung ihrer Wirkung und Toxizität. Dissertation, Univ. Frankfurt a. M.
- Seeling A, Leuschner F (†), Oelschläger H (2001) Physico-chemical, pharmacological, and toxicological properties of fomocaine metabolites. *Arzneim.-Forsch* 51: 7–17.
- Soucek P, Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Guengerich FP (2001) Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol* 1: 11.
- Zahalka HA, Sasson Y (1986) One-pot conversion of primary alkyl chlorides and dichlorides into alcohols, diols, and ethers via formic ester intermediates under phase-transfer conditions. *Synthesis* 9: 763–765.
- Zamponi GW, Soong T, Bourinet E, Snutch TP (1996) β Subunit coexpression and the $\alpha 1$ subunit domain I–II linker affect piperidine block of neuronal calcium channels. *J Neurosci* 16: 2430–2443.