

Synthese und Bindungsverhalten eines künstlichen Rezeptors für biogene Amine

Synthesis and Complexing Features of an Artificial Receptor for Biogenic Amines

Franz P. Schmidtchen

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der TU München, Lichtenbergstraße 4,
D-8046 Garching, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **42c**, 476–485 (1987); received October 29, 1986

Dedicated to Professor Helmut Simon on the occasion of his 60th birthday

Host-Guest Chemistry, Biogenic Amines, Artificial Receptor, Azacrown Ether Complex, Potentiometric Determination of Stability Constants

The synthesis of a ditopic linear receptor **3** consisting of an azacrown ether moiety for binding primary ammonium functions and a macrotricyclic tetrahedral moiety for binding hydrophobic guest species is described. The covalent interconnection of these subunits was supposed to constitute a receptor with enhanced specificity towards dopamine-type biogenic amines. Host-guest complexation was studied in a competition method with potassium ion using ion selective electrodes. The binding features of **3** with a series of biogenic amines reveal that neither the absolute binding strength nor the selectivity is enhanced in relation to the monotopic receptor **4**. It is concluded that **3** does not simultaneously utilize both receptor subunits in binding the biogenic amine substrates.

Einleitung

Selektivität in biologischen Systemen beruht nach heutiger Kenntnis auf molekularen Erkennungsprozessen zwischen topologisch, räumlich und funktionell komplementären Substrukturen von Rezeptoren mit ihren spezifischen Substraten. Augenfällige Beispiele für diese Wirt-Gast-Beziehung, die ausschließlich durch nichtkovalente Wechselwirkungen vermittelt wird, wurden durch Röntgenkristallstrukturen von Enzym-Substrat- [1] oder Antigen-Antikörperkomplexen [2] geliefert. Die überragende Rolle dieses Prinzips bei der Enzymkatalyse, dem Membrantransport, der hormonellen Signalübertragung, der Nervenleitung, der Immunantwort oder der genetischen Replikation begründet die Anstrengungen, auch abiotische Wirt-Gast-Systeme zur Erhöhung der Selektivität beispielsweise in der Analytik [3] oder zur Reaktionssteuerung [4] zu nutzen. Als Leitlinien zur Konstruktion künstlicher Rezeptoren verwendet man bisher die experimentell begründeten Befunde, daß möglichst viele Bindungsstellen (Haftgruppen) für Teilstrukturen des zu bindenden Gastmoleküls in geometrisch fixierter Anordnung auf einem starren Molekülskelett anzubringen sind, um die optimale Bindungsspezifität zu gewährleisten. Folgt man diesem Konzept, so muß man sehr großen synthetischen Aufwand treiben, wenn größere, bio-

logisch wichtige Gastspezies wie z.B. Hormone, Neurotransmitter oder Coenzyme komplexiert werden sollen. Das Haupthindernis der Synthese künstlicher Wirte liegt in der Forderung nach molekularer Starrheit, die im allgemeinen nur durch ein Netzwerk kovalenter Bindungen aufrechterhalten werden kann. Die Darstellung und Verknüpfung der benötigten makrocyclischen Ringe ist aber synthetisch anspruchsvoll und verläuft häufig in sehr unbefriedigenden Ausbeuten. Die so erhaltenen Rezeptoren bergen außerdem den Nachteil, daß sie prinzipbedingt nicht einfach in ihrer Struktur und damit ihren Bindungsmerkmalen zu modifizieren sind.

Diesen konzeptuellen Grenzen unterliegt eine alternative Näherung zu spezifischen künstlichen Rezeptoren nicht: Die offenkettige (verzweigte oder unverzweigte) Verknüpfung von Haftgruppen ist zwar vermutlich aufgrund der Flexibilität und geringeren Präorganisation der Bindungsstellen einem starren Wirt mit gleicher Art und Zahl an Bindungsstellen in der Gastspezifität unterlegen. Die leichtere Synthetisierbarkeit linear verknüpfter, modular aufgebauter Wirte ermöglicht aber bei gleichem oder geringerem Synthesaufwand den Zusammenbau einer größeren Anzahl von Haftgruppen, so daß dadurch der zunächst zu erwartende Selektivitätsverlust wieder wettgemacht wird. Vorteilhaft ist bei diesem Konzept die leichte Modifizierbarkeit der Gastspezifität durch Änderung (Anfügung, Austausch, Kürzung) der Haftgruppensequenz, so daß molekulare Rezeptoren für strukturverwandte Substrate

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/0400–0476 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

recht einfach maßgeschneidert werden können. Natürlich kann dieses Konzept nur sinnvoll zur Komplexierung molekularer Gäste eingesetzt werden, die über eine ausreichende Zahl unabhängig erkennbarer Struktur determinanten verfügt. Sehr kleine Gastspezies sind daher keine geeigneten Kandidaten zu seiner Erprobung.

Ein erster Schritt auf dem Weg zu polymodularen abiotischen Rezeptoren ist die Verknüpfung von zwei Haftgruppen zu einem ditopen Wirtmolekül, das dann geeignete Substrate an zwei unterschiedlichen Substrukturen erkennen sollte. Im Rahmen unserer Arbeiten zur molekularen Erkennung [5] waren das makrotricyclische Amin **1** als Stammverbindung einer monotopen Rezeptoreinheit für hydrophobe und anionische Substrate [6] und der Azakronenether **2** [7] als Anker für die prim. Ammoniumgruppe [8] synthetisiert worden. Die kovalente Kombination dieser Haftgruppen ließ einen ditopen Rezeptor erwarten, der biogene Amine vom Typ des Dopamins in protischen Lösungen binden sollte. Die spezifische Komplexierung dieser biologisch wichtigen Substanzklasse durch abiotische Wirte ist ein sehr aktuelles Ziel [9–11]. Betrachtungen an CPK-Modellen stützten die Annahme, daß die in Abb. 1 illustrierte Bindungsweise der biogenen Amine möglich sein mußte. Als Brücke zwischen den Ankergruppen war eine *p*-Xylyleneinheit vorgesehen, die als besonders steifes Verbindungselement aus-
gesucht wurde, daneben aber auch als chromophore Gruppe die UV-spektroskopische Verfolgung des Synthesegangs erleichtert. Ich berichte hier über die Synthese dieses ditopen Rezeptors **3** und seine Kom-

plexierungseigenschaften in wäßrigem Methanol im Vergleich zu dem monotopen Analogon **4**.

Synthese des ditopen Wirtmoleküls **3**

Die Strategie der Synthese von **3** lehnte sich an die bewährte Darstellungsmethode von 6-Tetazac [5, 6] an. So mußte zunächst das tricyclische Amin **1** an nur einem der vier äquivalenten Stickstoffatome funktionalisiert und damit für die Anknüpfung des Azakronenether Makrocyclus **2** vorbereitet werden. Im Gegensatz zur 6-Tetazac-Synthese [5, 7] gelang uns aber nun die selektive Monoquarternisierung des tertiärenamins **1** mit α -Bromtolylsäureester **5** nicht. Das salzartige Monoalkylierungsprodukt ist selbst in Hexan so gut löslich, daß es nicht ausfällt, sondern weiterer Alkylierung zugänglich bleibt. Einige Versuche, durch Verwendung des sperrigen Diphenyltert.-butyl-silylrestes **6** oder des Cholinrestes **7** als positiv geladener Estergruppe im Alkylierungsmittel die Quarternisierung von **1** durch sterische oder elektrostatische Effekte zugunsten der Monoalkylierung zu leiten, schlugen fehl. Auch hier wurden Produktgemische erhalten, in denen jedoch das vierfach alkylierte quartäre Ammoniumsalz auffälligerweise nur in sehr geringer Menge vorhanden war. Die Analyse dieser Ansätze wurde durch die Verfügbarkeit einer HPLC-Methodik zur Trennung hochgeladener quartärer Ammoniumsalze sehr erleichtert [12]. Dank der hohen Symmetrie von **1** können isomere Alkylierungsprodukte nicht entstehen, so daß das Produktgemisch im Prinzip nach der Nettoladung der Komponenten trennbar sein sollte. Allerdings vereitelte der ausgesprochen hydrophobe Charakter der in der Reaktion **1** mit **5** gebildeten quartären Salze **8** die Auftrennung mittels Ionenaustauschchromatographie. Deshalb permethylierte man die verbliebenen tert. Stickstoffatome mit Trimethyloxoniumtetrafluorborat/ Na_2CO_3 in Nitromethan. Diese Methylierungsmethodik garantiert die ausschließliche Bildung des „all-out“-Stereoisomeren [13], wogegen klassische Verfahren (Methyliodid oder Methyltosylat und Base) immer in beträchtlichem Ausmaß auch „mono-in“-Isomere lieferten (eine der Methylgruppen zeigt zum Zentrum des Tetraeders und besetzt so einen Teil der Moleküelhöhle. Zuordnung erfolgte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Methoden).

Nach alkalischer Esterspaltung erhielt man die zwitterionischen Ammoniumsalze **10**, die als Chlori-

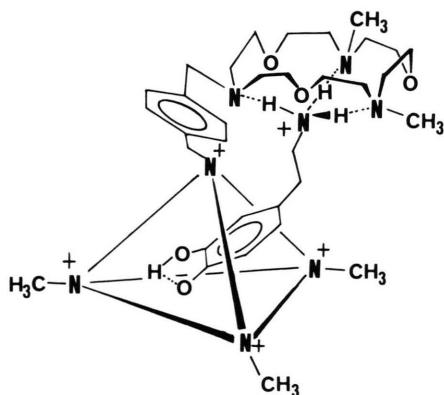
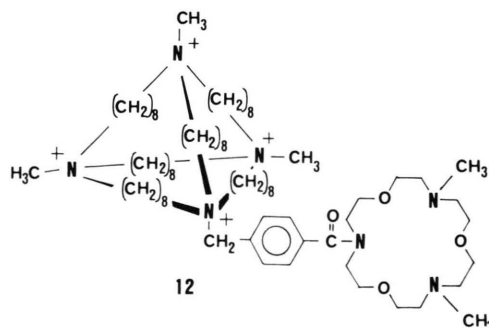
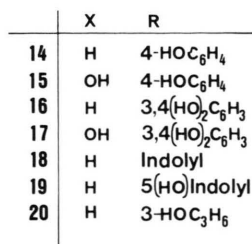
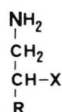
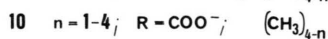
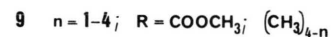
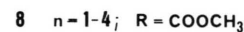
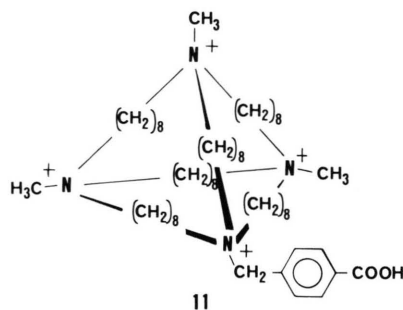
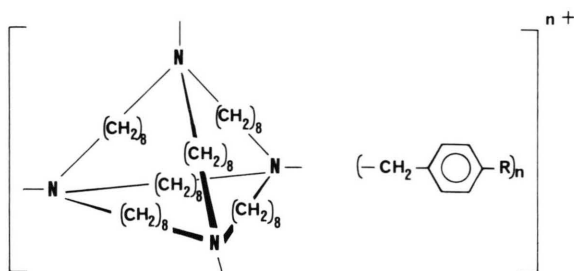
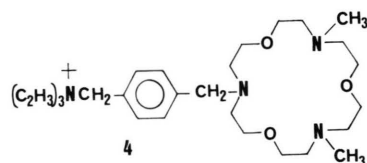
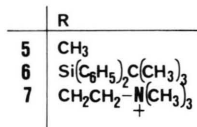
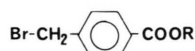
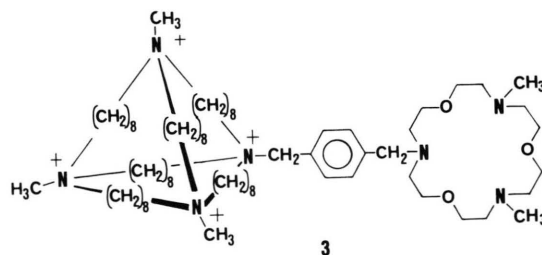
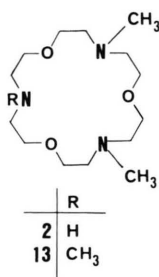
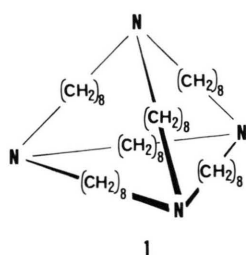


Abb. 1. Vermutete Assoziationsweise von Dopamin an das ditope Wirtmolekül **3**.

de gut wasserlöslich waren und an Sephadex-CM-25-Kationenaustauscher getrennt wurden. Das monofunktionalisierte tricyclische Ammoniumsalz **11** wurde so in 40% Ausbeute (bez. auf **1**) erhalten. Zur Ankoppelung der Azakronenethereinheit **2** an **11**

ließ sich die Kondensationsmethode von Mukaiyama [14] nutzen. Das Amid **12** erhielten wir so in glatter Reaktion aus **11** und **2** in Gegenwart von N-Methyl-2-chloropyridinium iodid in 79% Ausbeute. Der letzte Schritt der Synthesesequenz erforderte die Über-



führung von **12** in das tert. Amin **3**. Diese Aminreduktion kann wegen der Schwerlöslichkeit der salzartigen Verbindung **12** in aprotischen Lösungsmitteln nicht nach Standardverfahren mittels Hydridreagenzien durchgeführt werden, doch bewährte sich hier wieder die bei der Darstellung von 6-Tetazac [5, 7] ausgearbeitete Technik: Reaktion von **12** mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex in Nitromethan bei 90 °C für 6 min ergab in 91% Ausbeute die Zielverbindung **3**.

Komplexierungsverhalten von **3** und **4**

Zur Charakterisierung der Wirt-Gast-Komplexe nach Stabilität und Struktur der Assoziate sind direkte Verfahren besonders aussagekräftig. Da die Bindung von prim. Ammoniumverbindungen an Azakronenether in aprotischen Lösungsmitteln im ^1H -NMR-Spektrum direkt beobachtbar ist [8c, 15], lag die Anwendung dieser Methode auch für die vorliegende Problematik nahe. In Wasser oder wäßrigen Alkoholen stellen sich zwischen Wirt und Gast jedoch rasch Transprotonierungsgleichgewichte ein, so daß man in diesen Solventien den entsprechenden Wirt-Gast-Komplex korrekt als ein Assoziat aus dem Azakronenether, dem Amins substrat und einem Proton beschreiben muß. Da die NMR-Signallagen von Wirt und Gast stark von ihrem Protonierungsgrad abhängen, muß das Reaktionsmedium gut gepuffert sein, um auftretende Änderungen der chemischen Verschiebung als Folge einer Wirt-Gast-Wechselwirkung nachweisen zu können. Die Pufferkomponenten dürfen an keiner der beiden Bindungsstellen in **3** merkbar mit dem potentiellen Gastsubstrat in Kon-

kurrenz treten und sollen selber keine störenden NMR-Signale erzeugen. Diese Forderungen wurden von 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin in Verbindung mit seinem Fluoridsalz bestens erfüllt. Ztitration einer entsprechend gepufferten Tyraminlösung zur ebenfalls gepufferten Lösung von **3** in Methanol ergab aber nur eine sehr geringe (~ 2 Hz) Verschiebung der N-CH₂-Signale im 200-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von **3**, so daß eine quantitative Bestimmung der Stabilitätskonstanten der Wirt-Gast-Komplexe auf diesem Wege ausgeschlossen schien.

Da wir keine brauchbare Methode zur direkten Ermittlung der gewünschten Stabilitätsdaten fanden, wendeten wir uns nun indirekten Konkurrenzverfahren zu. Dabei bot sich besonders die potentiometrische Analyse der Konkurrenz des Amins substrats mit Kaliumionen um die Bindung an der Azakronenether-Substruktur an [7, 16]. Einleitende Versuche zeigten jedoch, daß die Kaliumkomplexe von **3** und **4** in Wasser und selbst in 50proz. wäßrigem Methanol zu schwach waren, um eine verlässliche Bestimmung der Stabilität der Komplexe dieser Wirte mit biogenen Aminen zu erlauben. Mit steigendem Methanolgehalt nimmt die Stabilität der Kaliumkomplexe jedoch stark zu, so daß bei Methanolgehalten ≥ 80 Gew.% die Assoziationskonstanten der Aminkomplexe ermittelt werden konnten. Die erhaltenen Werte sind in Tab. I für den monotopen Rezeptor **4** und in Tab. II für den ditopen Wirt **3** zusammengestellt.

Schon ein grober Überblick über die Daten zeigt, daß für beide Wirte die Aminkomplexe zum Teil erheblich schwächer sind als die Kaliumkomplexe. Dieser Befund ist unerwartet, denn der Azakronen-

Tab. I. Komplexbildung von **4** mit K⁺-Ionen und biogenen Aminen in wäßrigem Methanol (Fehlergrenzen: $\pm 8\%$ für die Kaliumkomplexe; $\pm 15\%$ für die Aminkomplexe).

	Gew.% CH ₃ OH	Solvens Ionen- stärke	pH	pK _a HTMP	K ⁺	K _{ass} [M ⁻¹]	Amin
1	80	0,1	9,06	9,06	90	Tyramin (14)	141
2	90	0,1	9,00	8,95	512	Tyramin (14)	248
3	90	0,1	>12		1500		
4	90	1,0	9,50	9,75	762	Noradrenalin (17)	150
5	90	1,0	9,80		1200	Noradrenalin (17)	163
6	90	1,0	10,10		1900	Noradrenalin (17)	130
7	90	1,0	10,10		1900	Dopamin (16)	390
8	90	1,0	>12		2400		
9	95	0,1	9,70	8,93	1930	Dopamin (16)	500

ether gleicher Ringgröße und Topologie mit nur wenig geändertem Substitutionsmuster an den N-Atomen **13** wurde als Haftgruppe für prim. Ammoniumgruppen mit großem $R-NH_3^+/K^+$ -Selektivitätsverhältnis beschrieben [8a]. Gerade dieses Merkmal hatte unsere Wahl des Azakronenethertyps bestimmt. Darüber hinaus ist auch die um den Faktor 100 geringere Stabilität der Aminkomplexe von **3** und **4** gegenüber den publizierten Werten von **13** [8a] (z. B. K_{ass} (Phenylethylamin \subset **13**) = 50000 M^{-1} in 90% CH_3OH/H_2O , $\mu = 0,1$) überraschend. Zum einen trägt sicherlich die positive Ladung der N-Substituenten von **3** und **4** zu der geringeren Stabilität der Komplexe mit Gastkationen bei. Vervierfachung der Ladung beim Übergang von **4** nach **3** bewirkt allerdings nur eine Stabilitätsabnahme um den Faktor 4 (Tab. 1/3 \rightarrow Tab. 2/8). Man muß deshalb vermuten, daß auch sterische Gründe beispielsweise eine durch die sperrigen N-Substituenten erzwungene, für die Komplexbildung aber ungünstige Konformation die drastische Stabilitätsabnahme verursacht.

Wie erwartet sind die Assoziationskonstanten deutlich vom Protonierungsgrad des Azakronenethers und somit vom pH-Wert abhängig (1/2–1/3; 1/4–1/5–1/6; 2/1–2/2; 2/7–2/8; 2/9–2/10–2/11). Für die Charakterisierung der Gastbindung von **3** und **4** in wäßrigem Methanol war aber die genaue Bestimmung ihres Protonierungsstatus nicht erforderlich.

Vielmehr mußten nur gut reproduzierbare konstante pH-Bedingungen geschaffen werden. Die Erfahrung zeigte, daß die Verwendung von Puffersystemen allein nicht die erforderliche Meßgenauigkeit garantierte. Deshalb wurde zusätzlich der pH-Wert mittels Glaselektrode gleichzeitig gemessen und gegebenenfalls Abweichungen auf ± 0.01 -pH-Einheiten durch Säure- oder Basezusatz korrigiert. Diese experimentellen Werte sind in den Tabellen aufgeführt. Aus den Messungen 1/5–1/8; 1/2–1/3 und 2/7–2/8 muß man schließen, daß die erste Protonierungsstufe im Azakronenether **3** in den verschiedenen Methanol/Wasser-Gemischen etwa dem pK_a -Wert des Hydroxytetramethylpiperidin-Puffersystems folgt, während der pK_a von **4** um 0,1 Einheiten höher liegt. Dieser Befund deckt sich mit früheren Ergebnissen [7]. Im Vergleich mit den Kaliumkomplexen ist die Stabilität der Aminkomplexe deutlich weniger pH-abhängig. Die Versuche 1/4, 5, 6 belegen, daß in einem Bereich von 0,6-pH-Einheiten um den wahrscheinlichen pK_a -Wert von **4** die Bindungskonstante für Noradrenalin nur innerhalb der Meßfehlergrenze variiert, die Stabilität des K^+ -Komplexes sich dagegen um den Faktor 2,5 unterscheidet. Das Stabilitäts-pH-Profil der Aminkomplexe wird um so flacher sein, je unterschiedlicher die pK_a -Werte der Aminogruppen von Wirt und Gast sind. Im Fall des Noradrenalins ist zusätzlich noch die Dissoziation der Brenzcatechin-

Tab. II. Komplexbildung von **3** mit K^+ -Ionen und biogenen Aminen in wäßrigem Methanol (Fehlergrenzen: $\pm 10\%$ für die Kaliumkomplexe; $\pm 20\%$ für die Aminkomplexe).

	Gew. % CH_3OH	Solvens Ionen- stärke	pH	pK_a HTMP	K^+	$K_{ass} [M^{-1}]$	Amin
1	80	0,1	9,06	9,06	82	Tyramin (14)	82
2	80	0,1	9,50		178		
3	80	1,0	10,00	9,90	245	Tyramin (14)	170
4	80	1,0	10,00			Tryptamin (18)	183
5	80	1,0	10,00			Dopamin (16)	130
6	80	1,0	10,00			5-Aminopentanol (20)	83
7	90	0,1	8,95	8,95	190	Tyramin (14)	97
8	90	0,1	>12		382		
9	90	1,0	9,30	9,75	130	Tyramin (14)	250
10	90	1,0	9,80		470		
11	90	1,0	10,10		600		
12	95	0,1	8,94	8,93	505	Tyramin (14)	221
13	95	0,1	8,94			Tryptamin (18)	263
14	95	0,1	8,94			Dopamin (16)	140
15	95	0,1	8,94			Noradrenalin (17)	86
16	95	0,1	8,94			Octopamin (15)	130
17	95	0,1	8,88		370	Serotonin (19)	195

einheit zu berücksichtigen, die in Wasser den niedrigsten pK_a -Wert aufweist [17], in den weniger polaren alkoholischen Solventien aber basischer als die Ammoniumgruppe sein dürfte [18], so daß hier keine Abschätzung des pK_a der Aminogruppe des Gastes zu treffen ist.

Die entscheidende Rolle der Lösungsmittelpolarität für die Komplexbindung wird durch ihre Änderung mit der Methanolkonzentration illustriert. In den Versuchen 1/1 und 1/2 sowie 2/1, 2/7 und 2/12, in denen die Makrocyclen von **4** und **3** jeweils etwa bei ihrem pK_a vorliegen, steigen die Bindungskonstanten für K^+ zwei- bis fünffach, wenn man den Methanolgehalt von 80 auf 90 bzw. 95 Gew.% steigert. In ähnlicher Weise wirkt auch die Erhöhung der Ionenstärke. Der Theorie der Elektrolyte zufolge sinkt die Abstoßung zwischen gleichsinnig geladenen Reaktionspartnern mit der Wurzel aus der Ionenstärke. Der beobachtete Stabilitätszuwachs der K^+ -Komplexe beim Übergang von 0,1-M- zu 1,0-M-Lösungen (1/2–1/5; 2/1–2/3; 2/7–2/10) entspricht annähernd dieser für verdünntere Lösungen abgeleiteten Vorhersage und weist damit auf die Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkung bei der Bildung dieser Komplexe hin. Die Aminkomplexe sind demgegenüber weit weniger abhängig von Solventpolarität und Ionenstärke (1/1–1/2; 2/1–2/7–2/12; 2/1–2/3; 2/7–2/9). Offenbar ist die elektrostatische Wechselwirkung für diese Substrate nicht dominierend, sondern nur einer von mehreren Beiträgen zur Komplexstabilität. Diese Sicht wird durch den Vergleich der Bindungskonstanten verschiedener Amins-substrate gestützt (2/3–6; 2/12–17), die sich kaum in ihren Dimensionen, wohl aber in der Hydrophobie unterscheiden. 5-Amino-pentanol (**20**) ($\pi = +0,5$) bindet beispielsweise nur halb so stark an **3** wie Tyramin (**14**), das bei ähnlichem Abstand der funktionellen Gruppen eine größere Hydrophobie ($\pi = +1,63$) [19] besitzt. Die Unterschiede im Bindungsverhalten der geprüften biogenen Amine sind bemerkenswert gering. Lediglich wenn die an den Azakronenether-Rezeptor bindende Aminogruppe an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt ist, findet man eine deutliche Abnahme der Komplexstabilität relativ zur Vergleichsverbindung (2/12–2/16; 2/14–2/15). Die Substruktur der Gäste, die an die tetraedrische Rezeptoruntereinheit in **3** im Sinn von Abb. 1 binden soll, ist offenbar für die Stabilität der Komplexe von untergeordneter Bedeutung. Ebenso überraschend ist das Ergebnis, daß die Aminkomplexe mit dem

monotopen Rezeptor **4** stabiler sind als mit dem ditopen Wirt **3** (1/1–2/1; 1/2–2/7). Wenn **3** über eine zusätzliche Wechselwirkungsmöglichkeit mit dem Substrat verfügt, muß man eigentlich eine Verstärkung der Komplexstabilität erwarten. Wegen des größeren Raumbedarfs der Tetraederuntereinheit in **3** relativ zum N-Benzylsubstituenten in **4** mag die Komplexstabilisierung nur schwach sein, doch eine Abnahme der Assoziationskonstanten um 50–100% ist mit der gleichzeitigen Bindung zweier Gastsubstrukturen an den ditopen Rezeptor **3** kaum vereinbar. Die beiden letzten Befunde erzwingen daher die Aussage, daß der offenkettige ditope Wirt **3** biogene Amine in protischer Lösung komplexieren kann, daran aber nur seine Azakronenetheruntereinheit, nicht jedoch die makrotricyclische Substruktur beteiligt ist.

Dank

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und durch den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Besonderer Dank gilt Prof. G. Gokel für die Überlassung eines Manuskripts [16] vor der Veröffentlichung.

Experimenteller Teil

Allgemeines

Schmelzpunkte bestimmte man auf einem Fischer-Jones-Gerät. Protonen bzw. ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf einem Bruker WP 200 (200 MHz ^1H , 50,3 MHz ^{13}C) Spektrometer oder einem Jeol GX 400 (400 MHz ^1H , 100,6 MHz ^{13}C) oder Jeol FX 90 (22,6 MHz ^{13}C) Gerät gemessen. Die chemischen Verschiebungen für Messungen in organischen Lösungsmitteln beziehen sich auf Tetramethylsilan als internem Standard (0 ppm). In wäßrigen Lösungen sind die chemischen Verschiebungen relativ zu internem Acetonitril ($\delta(^1\text{H}) = 1,90$ ppm; $\delta(^{13}\text{C}) = 3,4$, 122,2 ppm) angegeben. Analytische HPLC-Chromatographie nutzte Waters- (Modell-6000-Pumpe in Verbindung mit einem M-440-UV-Detektor und einem R-401-Differentialrefraktometer) oder Merck-Hitachi (Modell-655A-11-Pumpe und Knauer-UV-97,00- und RI-98,00-Detektoren) Geräte, wobei letzteres mit einem Niederdruck-Gradientensystem ausgerüstet war. Wir verwendeten Macherey-Nagel-7-RP₁₈-Säulen (250 × 4,6 mm) und Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Eluenten, die

30 mM Natriumperchlorat und 10 mM Ameisensäure enthielten. Die angegebenen k' -Werte beziehen sich auf diese isokratischen Standardbedingungen.

Mit Ausnahme von Acetonitril und Nitromethan, die in p.A.-Qualität gekauft wurden, wurden alle Lösungsmittel vor Gebrauch getrocknet und destilliert. Kommerziell erhältliche Hydridlösungen wurden nach gasvolumetrischen Standardverfahren bestimmt. Alle anderen Chemikalien wurden in höchster Reinheit gekauft und als solche eingesetzt.

Synthese

1-(4-Carboxybenzyl)-10,19,28-trimethyl-1,10,19,28-tetraazoniatriacyclo[17.17.8.8^{10,28}]dopentacontan tetraperchlorat (**11**)

Zu einer siedenden Lösung von 1,09 g (1,5 mmol) **1** [6] in 15 ml Isopropanol gab man 515 mg (2,25 mmol), 150 mol% α -Bromtolylsäuremethyl-ester **5** in 3,5 ml Isopropanol zu und verfolgte die Reaktion *via* HPLC (60% MeOH; k' : (**1**) = 1,33; (**5**) = 3,93; k' (Alkylierungsprodukte: Mono = 3,13; Bis = 6,80; Tris = 13,20). Nach 2 Stunden wurde die Reaktionsmischung auf 4 ml eingengt. Zusatz von 20 ml Isooktan fällte ein schweres Öl, das die höheralkylierten Produkte und die Hauptmenge des Monoalkylproduktes **8** enthielt. Zentrifugation ergab einen klaren Überstand, der das nicht umgesetzte Amin **1** und etwas Monoalkylprodukt **8** gelöst hatte. Einengen auf ca. 1 ml und Verdünnen mit 25 ml Isooktan fällte daraus das restliche Alkylierungsprodukt fast vollständig aus. Das Zentrifugat dieser Fällung wurde eingengt, in 5 ml siedendem Isopropanol aufgenommen und diese Lösung desamins **1** mit weiteren 130 mg (560 μ mol) **5** alkyliert. Durch Einengen, Fällung mit Isooktan und Zentrifugation in der beschriebenen Weise konnte man 210 mg (288 μ mol) nicht umgesetztes Ausgangsprodukt **1** wiedergewinnen. Die gesammelten Präzipitate des ersten und zweiten Alkylierungsansatzes wurden in Nitromethan (20 ml) aufgenommen, einrotiert und wiederum in 50 ml Nitromethan zu einer klaren, fast farblosen Lösung gelöst. Nacheinander gab man unter kräftigem Rühren 5 g pulverisiertes Natriumcarbonat und 1,23 g (8,4 mmol) Trimethyloxoniumtetrafluoroborat zu und rührte bei 25 °C 60 min weiter. Die Vollständigkeit der Methylierung zu **9** wurde durch eine HPLC-Analyse bestätigt (k' (**9**): Mono-*tolyl*trimethylprodukt = 1,47; Bistolylbismethylprodukt = 3,80; Tristolylmonomethylprodukt = 8,87).

Die Reaktionsmischung wurde filtriert, eingedampft und der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen. Zu dieser Emulsion fügte man bei 50 °C eine Lösung von 1,1 g Natriumhydroxid in 5 ml H₂O hinzu und rührte die Mischung 4 h, wobei sie sich schnell klärte. Anschließend stellte man mit 3 N HCl neutral und dampfte das Lösungsmittel im Vakuum ab. Man nahm den Rückstand in wenig warmem Methanol auf, trennte von ungelöstem anorganischem Salz ab und filtrierte die klare Lösung durch eine Säule mit 40 ml Serdolit-AS-6-Anionenaustauscher in der Fluoridform. Das Eluat (Nachwaschen mit Methanol) wurde eingengt und in einer entgasten Mischung aus 0,02 M Phosphatbuffer pH 7,0 und Methanol (ad 30 Vol.-%) gelöst. Die Trennung der Alkylierungsprodukte erfolgte an einer Sephadex-CM-25-Säule (3,5 \times 35 cm; Na⁺-Form), die mit dem gleichen Puffergemisch voräquiliert war. Nach Durchwaschen der Säule mit 120 ml Startpuffer eluierte man die Alkylierungsprodukte durch Anlegen eines linearen Ionenstärkegradienten (0 \rightarrow 0,4 M NaCl in Startpuffer, Gesamtvolumen 600 ml). Die Macrotricyclusmonocarbonsäure **11** wurde mit dem letzten Peak in einem sauber aufgetrennten Chromatogramm aus 3 Peaks eluiert (UV-Detektion). Die das Produkt **11** enthaltenden Fraktionen wurden zur Trockene gebracht und zur Entfernung überschüssigen Salzes mit abs. Ethanol extrahiert. Nach Eindampfen der Ethanolösung nahm man den glasartig erstarrten Rückstand in Wasser auf, säuerte mit HCl auf pH 1 an und fällte das Produkt durch Zugabe von 2 ml 1 M wäßriger NaClO₄-Lösung. Man zentrifugierte, wusch den Niederschlag mit Wasser und löste ihn in 2 ml Acetonitril. Verdünnen mit 10 ml Ethanol ergab eine klare Lösung, aus der sich im Laufe von 8 Tagen weiße Kristalle abschieden (278 mg). Aus der Mutterlauge wurden durch weiteres Einengen noch 360 mg **11**·(ClO₄)₄ gewonnen, das nach HPLC-Analyse (50% MeOH, k' (**11**) = 6,60) von gleicher Reinheit wie die zuerst ausgefallenen Kristalle war. Schmp. 200 °C Zers.

¹H-NMR (200 MHz; Cl₄-Salz in CD₃CN), δ = 1,35 (br, 48H, γ,δ -CH₂), 1,73 (br, 24H, β -CH₂), 2,92 (s, 9H, N-CH₃), 3,15–3,4 (br, 24H, α -CH₂), 4,48 (s, 2H, CH₂-Ar), 7,46 (d, J = 8 Hz, 2H, Arom.), 8,02 (d, J = 8 Hz, 2H, Arom.). ¹³C-NMR (22,6 MHz, Cl₄-Salz in CD₃CN). 22,3, 26,2, 28,3 (β,γ,δ -CH₂), 48,9 (N-CH₃), 59,5 (CH₂Ar), 62,3 (α -CH₂), 130,2, 130,5, 132,9, 140,9 (Aromat), 169,8 (Carboxyl). Analyse: C₅₉H₁₁₂Cl₄N₄O₁₈

(1307,4); Ber. C 54,20, H 8,64, N 4,29; Gef. C 54,18, H 8,32, N 4,46.

Amid **12** aus **11** und **2**

Eine Lösung von 131 mg (100 μmol) **11** (ClO_4)₄ in 2 ml Acetonitril wurde mit 50 mg (172 μmol) **2** und 48 μl Ethyldiisopropylamin versetzt. Man tropfte diese Mischung zu einer gerührten Lösung von 60 mg (235 μmol) N-Methyl-2-chloropyridinium-iodid (Aldrich) in 2 ml Acetonitril über 10 min zu. Die anfänglich auftretende Trübung klärte sich nach wenigen Minuten und die klare gelbe Lösung wurde für weitere 16 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, der Rückstand in 3 ml Methanol/Acetonitril 10:1 Vol. aufgenommen und über eine im gleichen Solvens äquilibrierte Säule (15 ml) Serdolit AS 6 Cl^- -Form filtriert. Das Eluat (Nachwaschen mit Methanol) wurde einrotiert, in 5 ml Wasser aufgenommen und mit einigen Tropfen Ameisensäure angesäuert. Die Trennung des Produktes **12** von dem Überschuß an **2** und den Reagenzien gelang weitgehend durch Chromatographie an Sephadex G 10 (5 \times 40 cm-Säule, Elution mit 50 mM NaCl/30 mM HCOOH in H_2O , Flußrate 90 ml), wobei ein geringer Teil des mit dem Totvolumen der Säule eluierten Produktpeaks wegen Überlappung mit einem nachfolgenden Peak an Sephadex G 15 rechromatographiert wurde (gleiche Elutionsbedingungen wie in der ersten Trennung). Die das Produkt **12** enthaltenden Fraktionen wurden eingedampft und mit Ethanol/ CH_3CN 1:3 Vol. zur Entfernung des Salzüberschusses extrahiert. Filtration durch eine kleine Celite-Säule ergab eine klare, farblose Lösung, die eingeeengt, in Wasser gelöst und lyophilisiert wurde. Man erhielt so 108 mg des Hexachlorids von **12** (79 μmol). HPLC (50% Methanol, k' (**12**) = 1,33).

^1H -NMR (200 MHz, F_6 -Salz in D_2O) wenig strukturiertes Spektrum: 1,28 (br, 48H, $\gamma,\delta\text{-CH}_2$, Tet), 1,61 (br, \sim 24H, $\beta\text{-CH}_2$, Tet), 2,82, 2,85 (überlappende s, zusammen 15H, N- CH_3 , Tet und Azac), 3,14 (br, 24H, $\alpha\text{-CH}_2$, Tet), 3,36, 3,54 (br, \sim 12H, N- CH_2 , Azac), 3,65, 3,76, 3,81 (br, \sim 12H, OCH_2 , Azac), 4,41 (s, 2H, ArCH_2), 7,39 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7,48 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar). ^{13}C -NMR (22,6 MHz, F_6 -Salz in D_2O) 23,7, 27,8, 29,8 ($\beta,\gamma,\delta\text{-CH}_2$, Tet), 43,1, 43,3 (N- CH_3 , Azac) 49,1, 52,8 (Amid-N CH_2 , Azac), 50,8 (N- CH_3 , Tet), 57,4, 58,2 (N CH_2 , Azac) 61,0, 63,9 ($\alpha\text{-CH}_2$, Tet) 63,4 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 66,3, 71,8, 72,7 (OCH_2 , Azac), 129,6, 131,6, 135,6, 139,7 (Arom.), 175,9 (C = O).

Ditoper Rezeptor **3**

Der Lyophilisationsrückstand des Amids **12** (108 mg, 79 μmol) wurde in 2 ml Nitromethan gelöst und auf 90 °C erwärmt. Nun fügte man tropfenweise 167 μl Boran-dimethylsulfidkomplex (1,67 mmol) zu (Dauer ca. 2 min), wobei nach anfänglicher heftiger Gasentwicklung rasch ein farbloser flockiger Niederschlag ausfiel. Nach 6 min bei 90 °C kühlte man die Mischung in Eiswasser ab, setzte langsam 2 ml fünfprozentige HCl in Methanol zu und erwärmte wieder für 10 min zum Sieden. Die klare Mischung wurde eingedampft, nochmals mit 10 ml Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel wieder abgezogen. Der Rückstand wurde in Wasser (4 ml) aufgenommen und über Sephadex G 10 (Säule: 5 \times 40 cm, Elution mit 50 mM NaCl/30 mM HCOOH in Wasser, Flußrate 90 ml/Stde) gelfiltriert. Das mit dem Totvolumen eluierte Produkt **3** wurde aus dem Rückstand der eingedampften Fraktion mit 10% Ethanol in CH_3CN extrahiert. Filtration des trüben, leicht gelblichen Extraktes durch eine Aktivkohlesäule (5 \times 20 mm, Elution mit Ethanol) ergab ein wasserhelles Filtrat, das nach Eindampfen und Lyophilisation aus Wasser 101 mg **3** Heptachloridsalz (71 μmol , 90%) lieferte. Aus dem Chloridsalz von **3** kann durch Anionenaustausch mit Serdolit AS 6 F^- -Form in Wasser das in den Komplexierungsexperimenten verwendete Fluoridsalz dargestellt werden. HPLC (45% MeOH, k' (**3**) = 4,44).

^1H -NMR (400 MHz, Heptafluorid-Salz in D_2O) = 1,23 (br, \sim 48H, $\gamma,\delta\text{-CH}_2$, Tet), 1,56 und 1,65 (br, 18 bzw. 6H, $\beta\text{-CH}_2$, Tet), 2,75 (s, 6H, N- CH_3 , Azac), 2,80 (s, 9H, N- CH_3 , Tet), 3,0–3,12 (br, 24H, $\alpha\text{-NCH}_2$, Tet), 3,16 (br, \sim 2H, N CH_2 , Azac), 3,29 (br, N- CH_2 , Azac), 3,68 (br, \sim 2H, N CH_2 , Azac), 3,75 (br, 14H, OCH_2 , Azac and $\text{ArCH}_2\text{-Azac}$), 4,34 (s, 2H, $\text{ArCH}_2\text{-Tet}$), 7,42 (s, 4H, Arom.).

^{13}C -NMR (50,3 MHz, F_7 -Salz in D_2O) 23,88, 23,95, 27,90, 29,95, 30,03 (CH_2 , Tet), 41,6 (N- CH_3 , Azac) 51,1 (N- CH_3 , Tet), 55,3, 58,2 (N- CH_2 , Azac), 58,7, 64,7 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 61,2, 64,1 ($\alpha\text{-CH}_2$, Tet), 66,1, 67,7 (OCH_2 , Azac), 130,9, 134,5, 135,6 (Arom.).

Bestimmung der Stabilitätskonstanten in Methanol/Wasser Gemischen

In ein thermostatisiertes (\pm 0,1 °C) konisches Titriergefäß (20 ml) wurden folgende Elektroden eingeführt: 1) pH-Glaselektrode (Ingold 275), 2) K^+ -

sensitive Glaselektrode (Ingold pK -271- S7 und 3) eine Ag/AgCl Referenzelektrode mit Elektrolytbrücke und Keramikdiaphragma. Als Brückenelektrolyt wurde die gleiche methanolisch-wäßrige Tetramethylammoniumfluoridlösung verwendet, in der die Stabilitätskonstanten gemessen werden sollten. Die Äquilibration aller Elektroden in dieser Elektrolytlösung (Zusatz für die K⁺-sensitive Elektrode: 4 mM Kaliumfluorid) über Nacht ist für die Reproduzierbarkeit der Bestimmung essentiell. Die pH-Elektrode wurde gegen die Referenzelektrode in wäßrigem Puffer pH 10.01 kalibriert. Zur Messung des pH-Wertes und der K⁺-Ionen Aktivität verwendeten wir ein Metrohm E 512 (pH-Messung) bzw. Orion 701 A (K⁺-sensitive Elektrode) Millivoltmeter. Nach Anschluß einer digitalen Mikrokolbenburette (Metrohm E 457, 0,5 ml) wurde das Titrationsgefäß mit 4,0 ml Vorlagelösung beschickt. Diese enthielt außer den in den Tabellen angegebenen Konzentrationen an Methanol und Tetramethylammoniumfluorid noch 10 mM 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinium Fluorid (HTMPH⁺F⁻) und HTMP freie Base (Aldrich), um den gewünschten pH-Wert einzustellen. Kleinere pH-Wert-Korrekturen erfolgten durch Zugabe von 0,2 M (CH₃)₄N⁺OH⁻ bzw. HTMPH⁺F⁻ in den entsprechenden Methanol/Wasser Gemischen. Durch Zutitration einer 0,05 M oder 0,1 M Kaliumfluorid-Lösung im gleichen Solvens wurde eine Eichgerade erstellt, deren Hysteresefreiheit durch zweifaches Verdünnen und Wiederaufkonzentrieren

der K⁺-Aktivität abgesichert wurde. Die Sollwerte mußten dabei auf ±0,2 mV reproduziert werden, andernfalls wurde die Messung abgebrochen. Für jede Bestimmung wurde eine eigene Eichgerade vermessen, da das Absolutpotential, nicht aber die Steigung der Eichgerade (57 mV/Dekade) zwischen zwei Bestimmungen um 2 mV schwankte.

Eine Lösung des Rezeptors **3** oder **4** als Fluorid wurde dann zu einer geeignet verdünnten Eichlösung gegeben. Zutitration von Kaliumfluorid ergab einen Satz von Potentialen, der über die Eichkurve in den Bjerrumparameter \bar{n} (Gl. (1)) umgerechnet wurde. Auftragung von \bar{n} nach Gleichung (2) lieferte Geraden ($r > 0,98$), aus deren Steigung die Stabilitätskonstante des Kaliumkomplexes ermittelt wurde.

$$\bar{n} = \frac{[K^+]_o - [K^+]_E}{[R]_o} \quad (1) \quad \frac{\bar{n}}{1 - \bar{n}} = K_{\text{ass}} [K^+]_E \quad (2)$$

[K⁺]_o = Gesamtkonzentration an K⁺; [K⁺]_E = aus der Eichgerade bestimmte Konzentration an nicht komplexierten K⁺; [R]_o = Gesamtkonzentration des Rezeptors.

Zugabe des Amins erhöhte [K⁺]_E, so daß aus den Massenerhaltungsgleichungen die Konzentrationen an Aminkomplex, freier Aminoverbindung und unkomplexiertem Rezeptor und damit die Assoziationskonstante des Amin-Rezeptorkomplexes bestimmbar war. Die erhaltenen Werte aus 4–6 Bestimmungen variierten um maximal 15%.

- [1] W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* **98**, 765 (1986); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 767 (1986).
- [2] a) A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. V. Philips und R. J. Poljak, *Science* **233**, 747 (1986); b) R. Huber, *Science* **233**, 703 (1986).
- [3] a) W. Bussmann, J.-M. Lehn, U. Oesch, P. Plumere und W. Simon, *Helv. Chim. Acta* **64**, 657 (1981); b) W. E. Morf, M. Huse, B. Lindemann, P. Schulthess und W. Simon, *Helv. Chim. Acta* **6**, 1333 (1986).
- [4] a) A. P. Purmal und L. A. Nikolaev, *Russ. Chem. Rev.* **54**, 466 (1985); b) R. Breslow, A. W. Czarnik, M. Lauer, R. Leppkes, J. Winkler und S. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 1969 (1986); c) F. P. Schmidtchen, *Top. Curr. Chem.* **132**, 101 (1986).
- [5] a) F. P. Schmidtchen, *J. Chem. Soc. Perkin Transact. II* **1986**, 135; b) F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Lett.* **27**, 1987 (1986); c) F. P. Schmidtchen, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [6] a) F. P. Schmidtchen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16**, 720 (1977); b) F. P. Schmidtchen, *Chem. Ber.* **113**, 864 (1980).
- [7] a) F. P. Schmidtchen, *Tetrahedron Lett.* **25**, 4361 (1984); b) F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.*, im Druck.
- [8] a) J.-M. Lehn und P. Vierling, *Tetrahedron Lett.* **21**, 1323 (1980); b) E. Graf und J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **67**, 1040 (1981); c) F. Kotzyba-Hibert, J.-M. Lehn und K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 4266 (1981).
- [9] a) M. Kodama, A. Watanabe und E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2063 (1983); b) E. Kimura, H. Fujioka und M. Kodama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1158.
- [10] J.-P. Behr, J.-M. Lehn und P. Vierling, *Helv. Chim. Acta* **65**, 1853 (1982).
- [11] A. D. Hamilton und P. Kazanjian, *Tetrahedron Lett.* **26**, 5735 (1985).
- [12] F. P. Schmidtchen und H. Oswald, *J. Liq. Chrom.* **9**, 993 (1986).
- [13] vgl. a) C. H. Park und H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2428 (1968); b) J. Franke und F. Vögtle, *Angew. Chem.* **97**, 224 (1985), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **24**, 219 (1985).
- [14] E. Bald, K. Saigo und T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1975**, 1163.
- [15] a) D. J. Chadwick, I. A. Chiffe und I. O. Sutherland, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1984**, 1707; b) I. O. Sutherland, *Chem. Soc. Rev.* **15**, 63 (1986).
- [16] K. A. Arnold und G. W. Gokel, *J. Org. Chem.*, im Druck.
- [17] I. Granoth, *FEBS Lett.* **67**, 271 (1976).
- [18] A. Albert, E. P. Serjeant: *The Determination of Ionization Constants*, 3rd. Ed., Chapman und Hall, London, 1984, Kap. 2.10.
- [19] A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, *Chem. Rev.* **71**, 525 (1971).