

Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig, Germany

Die Hydroxamsäure-Reaktion von Indometacin und Acemetacin

G. ZINNER, J. GRÜNEFELD, R. GEVENSLEBEN, A. GRUBE

Eingegangen am 13. Dezember 2002, angenommen am 15. Januar 2003

Dr. Johann Grünefeld, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Beethovenstr. 55, D-38106 Braunschweig
j.gruenefeld@tu-bs.de

Pharmazie 58: 431–432 (2003)

Das im Europäischen Arzneibuch beschriebene Indometacin (**1a**) sowie dessen Glykolsäureester Acemetacin (**1b**) gehören zur stark antiphlogistisch wirkenden Substanzklasse der Indolessigsäurederivate. Nach Vorschrift der Identitätsreaktion D des Arzneibuchs wird Indometacin durch die Hydroxamsäure-Reaktion nachgewiesen, d. h. die Lösung der Substanz wird nacheinander mit einer Mischung aus Hydroxylaminhydrochlorid und Natronlauge, Salzsäure und Eisen(III)-chlorid-Lösung versetzt, worauf sich eine violettrosa Färbung ergibt [1]. Dabei wird ein überaus hoher Überschuss an Hydroxylaminhydrochlorid (ca. 640:1) und Natriumhydroxid (ca. 500:1) gegenüber **1a** eingesetzt. Auch der allgemeine Nachweis von Estern erfolgt nach der Arzneibuchvorschrift über die Hydroxamsäure-Reaktion [2], diese ist allerdings nicht spezifisch für Ester [3].

Nach unseren Recherchen wurden von anderer Seite keine Untersuchungen über die Struktur der farbgebenden Komponente(n) beschrieben. Während im Kommentar zum Europäischen Arzneibuch [4] und in einem Lehrbuch zur Arzneistoffanalyse [5] 4-Chlorbenzhydroxamsäure (**2**) als farbgebende Komponente vermutet wird, lässt die Formulierung in einem Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie [6] eher auf eine Reaktion an der Carboxylgruppe unter Bildung der Hydroxamsäure **1c** schließen.

Zur Aufklärung des Reaktionsverlaufs wurde mit beiden Substanzen die Identitätsreaktion nach der Arzneibuchvorschrift durchgeführt. In beiden Fällen ergab sich eine Rotviolettanfärbung, die allerdings bei **1a** deutlich stärker

ausfiel als bei **1b**. Die UV/Vis-Spektren zeigten ein breites Maximum bei ca. 520 nm, die Absorption bei dieser Wellenlänge war bei **1a** ca. 50% höher als bei **1b**. In beiden Fällen war die Farbtintensität von der Reaktionsdauer unabhängig.

Zur chromatographischen Untersuchung wurde die Identitätsreaktion mit **1a** und **1b** jeweils im präparativen Maßstab, allerdings ohne den Zusatz von Eisen(III)-chlorid durchgeführt. Bei der dc-Untersuchung der Chloroform-Extrakte der Reaktionsansätze wurde in beiden Fällen nur ein einziges Produkt gefunden, das nach Besprühen mit Eisen(III)-chlorid-Lösung eine Rotviolettanfärbung gab; durch Vergleich mit einer authentischen Probe [7] wurde dieses als 4-Chlorbenzhydroxamsäure (**2**) identifiziert. Weitere Substanzflecke sind aufgrund ihrer intensiven Fluoreszenz den N-unsubstituierten Indolessigsäure-Grundkörpern zuzuordnen [8]. Eine HPLC-Untersuchung bestätigte die DC-Befunde. Neben **2** wurde als weitere Substanz 4-Chlorbenzoesäure aufgefunden.

Zur Isolierung der farbgebenden Komponente wurde die Identitätsreaktion – wiederum im präparativen Maßstab – nach der Arzneibuchvorschrift durchgeführt, der Eisen(III)-komplex mit 1-Butanol/Ethylacetat ausgeschüttelt und mit EDTA dekomplexiert. In beiden Fällen (**1a** und **1b**) ließ sich ein Festprodukt isolieren und durch IR-spektroskopischen Vergleich eindeutig als **2** identifizieren.

Somit ist gesichert, dass die Identitätsreaktion D des Indometacins im Europäischen Arzneibuch über die Bildung von 4-Chlorbenzhydroxamsäure (**2**) verläuft.

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben und Geräte

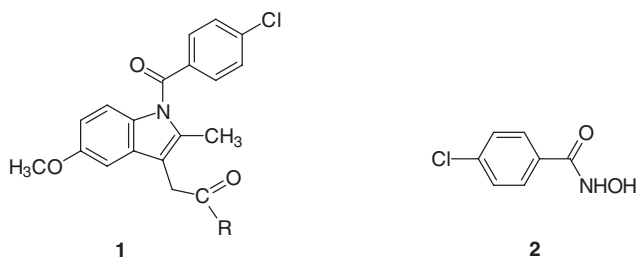
Dc: Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20, Schichtdicke 0,2 mm, Macherey-Nagel, Fließmittel: Toluol/Aceton/Eisessig 60 : 39 : 1, Detektion: UV (254 und 366 nm). UV/Vis-Spektren: Philips PU 8730 UV/VIS-Spektrophotometer. HPLC, analytisch: LiChrograph[®] L-6200 Gradientenpumpe, DAD L-3000 Photodiodendetektor, LiChroCART[®] Auto-fix, PC 486 DX, LiChrograph[®] D-6000-DAD-Manager Software; Säule: LiChroCART[®] LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm) 12,5 cm mit Vorsäule 50963 Select B; Eluent: MeOH/H₂O/H₃PO₄ (600 : 400 : 0,8) isokratisch; Fluss: 1,000 ml/min; Injektionsvolumen: 20 µl (Injektionsschleife); Detektion: UV 240 nm; Totzeit: t_M = 1,15 min ermittelt mit Thioharnstoff; Nettoretentionszeit (t_S) in min.

2.1. DC- und HPLC-Untersuchungen

In Anlehnung an die Arzneibuchvorschrift [1] wurde eine Lösung von 0,1 g Indometacin (**1a**) bzw. 0,11 g Acemetacin (**1b**) mit einer Mischung aus 50 ml Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (250 g/l) und 150 ml verdünnter Natriumhydroxid-Lösung R versetzt. Nach Zugabe von 200 ml verdünnter Salzsäure R wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde 1 h unter Rühren und Rückfluss mit 100 ml Chloroform extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und das Filtrat zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand (ca. 80 mg) wurde für die DC- bzw. HPLC-Untersuchung verwendet, dabei wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: **2**: t_S = 0,61; 4-Chlorbenzoesäure: t_S = 3,01; **1a**: t_S = 15,21; **1b**: t_S = 15,63.

2.2. Isolierung von 4-Chlorbenzhydroxamsäure (**2**)

In Anlehnung an die Arzneibuchvorschrift [1] wurde eine Lösung von 0,1 g Indometacin (**1a**) bzw. 0,11 g Acemetacin (**1b**) mit einer Mischung aus 50 ml Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (250 g/l) und 150 ml verdünnter Natriumhydroxid-Lösung R versetzt. Nach Zugabe von 100 ml Eisen(III)-chlorid-Lösung R 2 und 200 ml verdünnter Salzsäure R wurde die Lösung 3x mit je 100 ml 1-Butanol/Ethylacetat (1 : 1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde 2x mit je 100 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 g/l), 3x mit je 50 ml Natrium-EDTA-Lösung (0,1 mol/l) und 2x mit je 50 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die organische Phase i. Vak. zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde in 5 ml Methanol aufgenommen und die Lösung filtriert.



	1a	1b	1c
INN	Indometacin	Acemetacin	
R =	OH	OCH ₂ COOH	NHOH

Das Filtrat wurde i. Vak. zur Trockne eingeengt und der feste Rückstand 2× mit je 2 ml Ether gewaschen. Der Rückstand (16 mg bei **1a**, 7 mg bei **1b**) wurde durch IR-spektroskopischen Vergleich mit einer authentischen Probe [7] als **2** identifiziert.

Literatur

- 1 Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe 2002, Band 2, S. 2084, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart und Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn
- 2 Europäisches Arzneibuch [1], Band 1, S. 97
- 3 Zinner, G.; Ketz, E.-U.: Pharm. Ztg. **121**, 910 (1976)
- 4 Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Wichtl, M.; Kommentar zum Europäischen Arzneibuch, 9. Lieferung 1998, I 11, S. 3, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart und Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn
- 5 Eger, K.; Troschütz, R.; Roth, H. J.: Arzneistoffanalyse, 4. Aufl., S. 513, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1999
- 6 Auterhoff, H.; Knabe, J.; Hölte, H.-D.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 14. Aufl., S. 372, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1999
- 7 Liguori, A.; Sindona, G.; Romeo, G.; Uccella, N.: Synthesis 168 (1987)
- 8 Dell, H.-D.; Doering, M.; Fiedler, J.; Fischer, W.; Jacobi, H.; Kamp, R.: Arzneim.-Forsch. **30**, 1362 (1980)

Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Kerman, Iran

Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of *N*-[5-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinyl quinolone derivatives

A. FOROUMADI, R. ASHRAF-ASKARI, M. H. MOSHAFI, S. EMAMI, A. ZEYNALI

Received February 14, 2002, accepted July 25, 2002

Dr. A. Foroumadi, Kerman University of Medical Sciences, Faculty of Pharmacy, Haft Bagh St., Kerman, Iran

aforoumadi@yahoo.com

Pharmazie 58: 432–433 (2003)

Fluoroquinolones are a group of synthetic antibacterial agents structurally related to nalidixic acid. They exhibit a broad antibacterial spectrum both to Gram-positive and Gram-negative bacteria [1]. During recent years much attention has been devoted to the synthesis of new 4-quinolone-3-carboxylic acids and to their antibacterial activity [2–3]. Further advances in quinolone development are likely to provide better compounds for clinical use [4].

Quinolones exert antibacterial activity primarily by inhibiting bacterial DNA gyrase. A ternary complex of drug, enzyme, and DNA blocks progress of the replication fork [5]. The inhibition of DNA gyrase and cell permeability of the quinolones are greatly influenced by the nature of the C-7 substituent on the standard structure of 4-quinolone-3-carboxylic acids [6]. In addition, substitution of bulky functional groups are permitted at the C-7 position [7].

We previously reported the synthesis of a series of *N*-(2-aryl-2-oxoethyl) piperazinyl quinolones and related compounds, with significant antibacterial activity against some Gram-positive and Gram negative organisms [8, 9].

According to data from the literature that some 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazole derivatives [10–12] and 5-nitro-2-furyl analogues (e.g. nitrofurantoin) [13] have antibacterial activity, we designed and synthesized a new series of *N*-substituted piperazinyl quinolones with certain structural modifications containing a 2-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole moiety (**3a–c**) as potential new antibacterial agents.

The intermediate 2-chloro-5-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole (**1**) was prepared from 5-nitrofurfurylidene diacetate according to a previously described procedure [14]. Reaction of compound **1** with piperazinyl quinolones **2a–c** in dimethylformamide at 90 °C afforded compounds **3a–c** in high yields (Scheme).

The antibacterial activity of **3a–c** was investigated *in vitro* in side-by-side comparison with norfloxacin, ciprofloxacin and enoxacin, against some Gram-positive and Gram-negative bacteria using a conventional agar dilution procedure. The results are summarized in the Table.

The antibacterial data revealed that compounds **3a–c** had a strong and better activity against Gram-positive organisms than the reference quinolones such as ciprofloxacin, norfloxacin and enoxacin. However, all three compounds were nearly inactive against Gram negative bacteria. This is in contrast to the good antibacterial activity of quinolones and 5-nitrofuranyl derivatives (e.g. nitrofurantoin) [13] against Gram negative bacteria such as *E. coli*. However,