

***o*-N-Diisopropylaminoethoxy-Butyrophenone, a New Local Anaesthetic Drug**

The wide spectrum of biological activities of N-substituted β -phenoxyethylamines¹, some of which were also described recently for their spasmolytic action^{2,3}, prompted us to examine these substances for a possible local anaesthetic activity and in fact pilot experiments showed that acylation was effective in conferring this activity on phenoxyethylamines. A systematic research into *ortho*, *meta* and *para* isomers of acyl-phenoxyethylamines enabled us to establish the superiority of the *ortho* isomers, the optimal length of the basic chain and of the acyl group as well as the best type of N-substituent. The most promising compound is the *ortho*-N-diisopropylaminoethoxy-butyrophenone since modifications of this structure, such as the introduction of other substituents into the benzene ring, e.g. alkyls, halogens, amino and nitro groups, or the transformation of the acyl radical into alcohol, alkyl and carboxylethyl radicals, greatly reduced the anaesthetic activity.

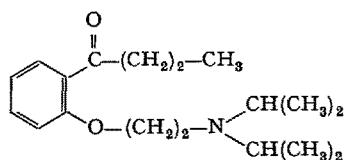


Table I shows the surface, infiltration and troncular anaesthetic activity of *ortho*-N-diisopropylaminoethoxybutyrophenone hydrochloride (Rec 7-0518) compared with the activity of cocaine and of procaine. Table II gives the intraperitoneal and subcutaneous LD₅₀'s of the three substances.

On comparing the activities and the toxicities of these compounds, it will be seen that Rec 7-0518 shows higher therapeutic indices than cocaine, a model for surface

Table I. Effective concentrations in 50% of the animals (EC₅₀'s) calculated according to LITCHFIELD and WILCOXON⁴

Type of anaesthesia	Rec 7-0518 mg/ml	Cocaine mg/ml	Procaine mg/ml
Surface ⁵ (rabbit eye)	0.75 (0.61-0.92)	2.8 (2.3-3.4)	21 (18-26)
Infiltration ⁶ (mouse tail)	0.38 (0.27-0.54)	0.38 (0.30-0.47)	3.6 (2.7-4.9)
Troncular ⁷ (rat ischiatic nerve)	2.1 (1.7-2.6)	0.90 (0.78-1.1)	6.0 (5.1-7.0)

The values in brackets represent the P = 0.05 fiducial limits of the EC₅₀'s.

anaesthetic activity, and than procaine, a model for infiltration anaesthetic activity. The results obtained in clinical experiments agree with these pharmacological findings.

The *ortho*-N-diisopropylaminoethoxy-butyrophenone was prepared by condensing the *o*-hydroxy-butyrophenone with the β -N-diisopropylaminoethylchloride hydrochloride in an alcoholic medium and in the presence of a base. The resulting product is a colourless oil with a b.p. of 183-185°C/6-7 Torr. Analysis: calc. for C₁₈H₂₉NO₂ C 74.19%, H 10.05%, N 4.81%. Found C 74.45%, H 9.90%, N 4.52%.

The hydrochloride of the *ortho*-N-diisopropylaminoethoxy-butyrophenone (Rec 7-0518) is obtained as a white and bitter crystalline powder, with a m.p. of 129-130°C. Analysis: calc. for C₁₈H₃₀ClNO₂ C 65.93%, H 9.22%, Cl 10.81%, N 4.28%. Found C 65.89%, H 9.20%, Cl 10.86%, N 4.25%.

Table II. Intraperitoneal and subcutaneous LD₅₀'s

Route	Rec 7-0518 mg/kg	Cocaine mg/kg	Procaine mg/kg
i.p.	102 (96-108)	79 (75-83)	173 (156-192)
s.c.	217 (187-252)	81 (57-115)	830 (703-979)

The values in brackets represent the P = 0.05 fiducial limits of the LD₅₀'s.

Riassunto. Da una serie di β -fenossietilamine acilate è stata selezionata una nuova sostanza e cioè l'*o*-N-diisopropylaminoetossibutirrofeno, che possiede elevate proprietà anestetiche locali di superficie, per infiltrazione e tronculari. Si sono comparate le attività anestetiche e la tossicità del nuovo composto con quelle della cocaina e della procaina.

P. DA RE and I. SETNIKAR

Research Division of Recordati s.a.s., Milano (Italy),
July 16, 1964.

¹ D. BOVET and F. BOVET-NITTI, *Médicaments du système nerveux végétatif* (Ed. S. KARGER, Bale 1948), p. 231.

² L. TURBANTI and G. F. DI PACO, Il Farmaco Ed. Sci. 17, 651 (1962).

³ N. P. BUU-HOI, P. JACQUIGNON, and M. DUFOUR, Bull. Soc. Chim. Fr. 1964, 23.

⁴ J. T. LITCHFIELD JR. and F. WILCOXON, J. Pharmacol. exp. Therap. 96, 99 (1949).

⁵ M. R. A. CHANCE and H. LOBSTEIN, J. Pharmacol. exp. Therap. 82, 203 (1944).

⁶ C. D. BIANCHI, Brit. J. Pharmacol. 11, 104 (1956).

⁷ L. F. SHACKELL, Anesth. Analg. curr. Res. 14, 20 (1935).

Gewinnung von Chloroplasten ohne Verwendung von Flüssigkeiten

Bei allen bekannten Methoden, einzelne Zell- und Gewebebestandteile in grösseren Mengen zu gewinnen (Zell- und Gewebetrennung, isolation of subcellular components)¹⁻⁴, werden zur Trennung Flüssigkeiten benutzt.

Durch diese treten bei den zu isolierenden Komponenten unkontrollierbare Veränderungen auf (Extraktion und Verlagerung von Substanzen, Schädigung von Fermen-ten usw.). Es wurden daher Versuche unternommen, eine Trennung ohne Verwendung von Flüssigkeiten zu erzielen. Als Ausgangsmaterial dienten dabei Pulver gefriergetrockneter pflanzlicher und tierischer Gewebe.

Es gibt viele Verfahren, Pulver verschiedenartiger Teilchen auf trockenem Wege in Fraktionen gleichartiger Teilchen zu zerlegen. In Vorversuchen wurde eine Anzahl der bekannten Methoden (Sieben, Sedimentieren, Windsichten, Pralleffekt, Trennung im Zyklon oder auf Grund elektrostatischer Eigenschaften usw.)⁵⁻⁸ auf ihre Anwendbarkeit hin geprüft. Bei diesen Bemühungen wurde als erstes Ergebnis ein überraschend einfacher Weg gefunden, Chloroplasten zu isolieren. Die Trennung beruht auf dem sogenannten Pralleffekt. Lässt man einen mit Staub beladenen Gasstrom aus einer Düse auf eine Fläche auftreffen, so tritt eine Ablagerung und gewisse Auftrennung der Staubteilchen nach ihren physikalischen Eigenschaften ein; feines Blattpulver bildet dabei einen zentralen weissen Fleck, der von konzentrischen, mehr oder weniger grünen Ringen umgeben ist.

Eine ähnliche Erscheinung tritt auch in hochtourigen Schlagmühlen auf (Luftwirbel, Zentrifugalkräfte). Bei Blattpulver schlagen sich die feinen Teilchen (Chloroplasten, Cytoplasma, Bruchstücke von Zellmembranen usw.) an den Wandungen des Mahlraumes nieder und zwar die einzelnen morphologischen Bestandteile an verschiedenen Orten. Neben weisslichen finden sich chloroplastenreiche grün gefärbte Niederschläge, die sich leicht gewinnen lassen. Der Trenneffekt in Schlagmühlen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Von Bedeutung sind u.a. Geschwindigkeit und Form des Schlagmessers, Grösse und Form des Mahlraumes, Feinheitsgrad und Menge des eingesetzten Pulvers. Durch geeignetes Vorgehen und Auswahl geeigneter Schlagmühlen lässt sich ein Reinheitsgrad der Chloroplasten von ca. 90% erreichen. Das Verfahren wird im folgenden beschrieben.

Material. Blattspitzen von Feldsalat (*Valerianella olitoria*), frei von Mittelrippen, werden nach Waschen und Trocknen zwischen Filterpapier durch Einröhren in flüssigen Stickstoff rasch eingefroren und gefriergetrocknet. In Portionen von ca. 4 g werden die getrockneten Blätter durch Mahlen (1 $\frac{1}{2}$ min) in einer Moulinex-Kaffeemühle⁹ (Type MG 1F) zerkleinert.

Isolierung der Chloroplasten. Sie erfolgt in drei Schritten.

A. Das erhaltene Blattpulver wird in Portionen von 2 g in der Moulinexmühle 30 sec lang gemahlen. Das in der Mühle liegende grobe Pulver (angeschlagene Zellen, Zellwände, Zellverbände usw.) wird ausgeschüttet und aufgehoben. Am zylindrischen Teil des Mahlraumes hat sich grünes, chloroplastenreiches Pulver als Ring an der Wand niedergeschlagen. Es ist meist von einer helleren Schicht überdeckt. Diese Schicht sowie das übrige an den Wandungen der Mühle haftende helle Pulver werden mit einer Vogelfeder vorsichtig gelockert und durch Laufenlassen der offenen Mühle entfernt. Der zurückbleibende chloroplastenreiche Ring wird mit der Feder herausgeschabt und das gewonnene Pulver gesammelt. Der gesamte Vorgang wird mit dem ausgeschütteten Pulver so oft wiederholt, bis sich praktisch kein grüner Ring mehr bildet.

B. Das grüne Pulver wird in Portionen von ca. 200 mg 5 sec lang in einer IKA-Analysenmühle¹⁰ (Modell A 10) gemahlen. Dabei schlägt sich am Deckel eine intensiv grüne Fraktion als kreisrunder Fleck nieder. Eine darüberliegende hellere Schicht wird mit einer Feder entfernt und das zurückbleibende chloroplastenreiche Pulver gesammelt.

C. Die weitere Reinigung in der gleichen Mühle wird erzielt bei Verwendung eines besonders geformten Schlagmessers: Ein Rechteck aus nichtrostendem Stahl, 2,5 mm dick, 12 mm breit und ca. 60 mm lang mit einer Ausparung in der Mitte zum Befestigen auf der Mühlenachse

wird in der Mitte auf einer Länge von 18 mm fest eingespannt und an den überstehenden Enden um 90° nach rechts verdreht; es entsteht so ein propellerartiges Schlagmesser. Seine Enden werden der Mühle so angepasst, dass sie zur Wandung des Mahlraumes einen Abstand von 2,5 mm haben. Es werden je 50-100 mg Pulver 5 sec lang gemahlen. Auch hier schlägt sich die chloroplastenreiche Fraktion als kreisrunder Fleck in der Mitte des Deckels nieder. Sie wird von daraufliegendem hellem Material befreit und gesammelt. Diese Fraktion wird nochmals in der gleichen Weise gereinigt.

Prüfung des Reinheitsgrades der Chloroplasten. Zur Beurteilung der Reinheit der so gewonnenen Chloroplasten wurde neben dem mikroskopischen Bild ihr Verhalten im nichtwässrigen Dichtegradienten nach BEHRENS und THALACKER^{11,12} geprüft. Unter Verwendung der gleichen organischen Medien wie dort und der gleichen Abstufung des Dichtegradienten bildeten sich im Bereich $d = 1,25-1,30$ zwei dicht übereinanderliegende intensiv grüne Zonen. Ihr mikroskopisches Bild zeigte reine Chloroplasten. Der Anteil anderer Zellbestandteile, die sich in Zonen ausserhalb des für Chloroplasten typischen Bereiches ansammelten, war sehr gering.

Auf Grund dieser Prüfung beträgt der Reinheitsgrad der Chloroplasten ca. 90%.

Die Versuche, einzelne Zell- und Gewebebestandteile aus gefriergetrockneten pflanzlichen und tierischen Geweben ohne Verwendung von Flüssigkeiten rein zu gewinnen, werden fortgesetzt¹³.

Summary. A method is described for the isolation of chloroplasts from powder of frozen-dried leaves without using any liquids.

M. BEHRENS, W. NEU,
R. THALACKER und H.-J. THIMM

Abteilung für Zell- und Gewebechemie am Physiologisch-chemischen Institut der Justus Liebig-Universität, Giessen (Deutschland), 6. Juli 1964.

¹ M. BEHRENS, Hoppe-Seyler's Z. 209, 59 (1932).

² V. ALLFREY, *The Cell* (Academic Press, New York and London 1959), vol. I, p. 193.

³ C. DE DUVE, J. BERTHET und H. BEAUFAY, Progr. Biophys. 9, 325 (1959).

⁴ W. MENKE, Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 27 (1962).

⁵ E. HANSSEN und E. NIEMANN, 3. Internationaler Brotkongress Hamburg 1955, p. 154 (Herausgeg. von der Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung, Detmold).

⁶ E. HANSSEN und G. FLORIAN, Mühle 94, 539 (1957).

⁷ HOUBEN WEYL, *Methoden der organischen Chemie* (Georg Thieme, Stuttgart 1959), vol. I/2, p. 31.

⁸ O. C. RALSTON, *Electrostatic Separation of Mixed Granular Solids* (Elsevier Publishing Comp., Amsterdam-London-New York-Princeton 1961).

⁹ Zu beziehen durch: L. FRANZ, 6300 Giessen (Deutschland).

¹⁰ Zu beziehen durch: Janke & Kunkel, 7813 Staufen im Breisgau (Deutschland).

¹¹ M. BEHRENS und R. THALACKER, Naturwissenschaften 44, 621 (1957).

¹² R. THALACKER und M. BEHRENS, Z. Naturforsch. 14b, 443 (1959).

¹³ Fräulein H. JUNKER danken wir für die unermüdliche und sorgfältige Mitarbeit bei den zahlreichen Versuchen. – Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für die Bereitstellung der Mittel.