

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

E/Z-Verhältnis und Stabilität der beim Nachweis von Glycinkonjugaten entstehenden halogenierten Benzylidenverbindungen

H. OELSCHLÄGER, A. SEEING, M. RADMAN und H. BOCKHARD

Herrn Prof. Dr. Gerwalt Zinner, Braunschweig, in freundschaftlicher Verbundenheit zum 75. Geburtstag gewidmet

Bei der Detektion von halogenierten Hippursäuren auf DC-Platten mit *N,N*-4-Dimethylaminobenzaldehyd wird ein orangefarbiger fluoreszierender Fleck gebildet, der aus einem E/Z-Gemisch der entsprechenden Benzylidenverbindungen besteht. Die Reaktion verläuft über die Azlactone. Im E/Z-Gemisch dominieren die Z-Derivate (>90%).

E/Z-ratio and stability of halogenated benzylidene derivatives formed during the detection of glycine conjugates

The orange fluorescing spot formed during the detection of halogenated hippuric acids with 4-*N,N*-Dimethylaminobenzaldehyde on TLC-plates consists of a E/Z-mixture of the corresponding benzylidene derivatives. Intermediates are the azlactones.

1. Einleitung

Das seit 1962 als zentral angreifendes Muskelrelaxans eingeführte 2-(4-Chlorphenyl)-3-methyl-perhydro-1,3-thiazin-4-on-1,1-dioxid (Chlormezanon, **1**) wurde aufgrund einer retrospektiven europäischen Erhebung wegen des Risikos des Auftretens schwerer Hautreaktionen vorsorglich vom Hersteller aus dem Markt genommen. Trotz millionenfacher jährlicher Anwendung wurden in der Bundesrepublik Deutschland von 1962 bis 1996 nur 11 Lyell-Fälle ohne tödlichen Ausgang registriert. Erst 1998 wurde über einen Lyell-Todesfall aus dem Jahre 1996 nach Einnahme von **1** berichtet [1]. Nachdem von Oelschläger et al. die pharmazeutisch-chemischen Eigenschaften des chiralen Moleküls, seine Stabilität und die pharmakokinetischen Eigenschaften eindeutig geklärt worden sind [2], laufen jetzt Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik Freiburg i. Br., in denen die Frage geklärt werden soll, ob **1** oder eines seiner Enantiomeren bzw. die Hydrolyse- oder Biotransformationsprodukte in einem kausalen Zusammenhang mit den hauttoxischen Reaktionen stehen oder nicht. Untersuchungen in den neunziger Jahren [2] hatten zu der Erkenntnis geführt, dass rac-**1** im pH-Bereich von 2 bis 9 durch Autoprotolyse in 4-Chlorbenzaldehyd (**2**) und 3-Sulfinatopropionsäure-*N*-methylamid (**3**) gespalten wird. Danach unterliegt **3** einer enzymatischen Spaltung in der Amidstruktur zu Methylamin und 3-Sulfinatopropionsäure (**4**), während **2** zur 4-Chlorbenzoësäure (**5**) oxidiert und diese mit Glycin bzw. aktiverer Glucuronsäure zu den entsprechenden Phase-II-Produkten (**6**, **7**) konjugiert wird. Bei der Biotransformation des Analgetikums Flupirtin entsteht das *N*-(4-Fluorbenzoyl)glycin [3].

Für **1** wurde im Plasma bei 37 °C (pH 7,4) eine Halbwertszeit von 76 h gefunden. In einer Studie mit 20 Probanden wurde nach einmaliger oraler Gabe von 400 mg rac-**1** festgestellt, dass beide Enantiomere rasch resorbiert werden (c_{\max} 15–45 min.), während sie sich in $t_{1/2\text{ term}}$ merklich unterscheiden (+)-**1**: 47 h bzw. (-)-**1**: 24 h.

Beide Enantiomere werden nach Dosierung im therapeutischen Maßstab (400 mg) überwiegend (zu 15–20%) an Humanalbumin (37 °C, pH 7,4) gebunden, während die Bindung an die Globulinfraktionen im Bereich von 2 bis 4% lag. (Gleichgewichtsdialyse, validiert durch Ultrafiltration). Die Racemisierungsgeschwindigkeit bei 37 °C und

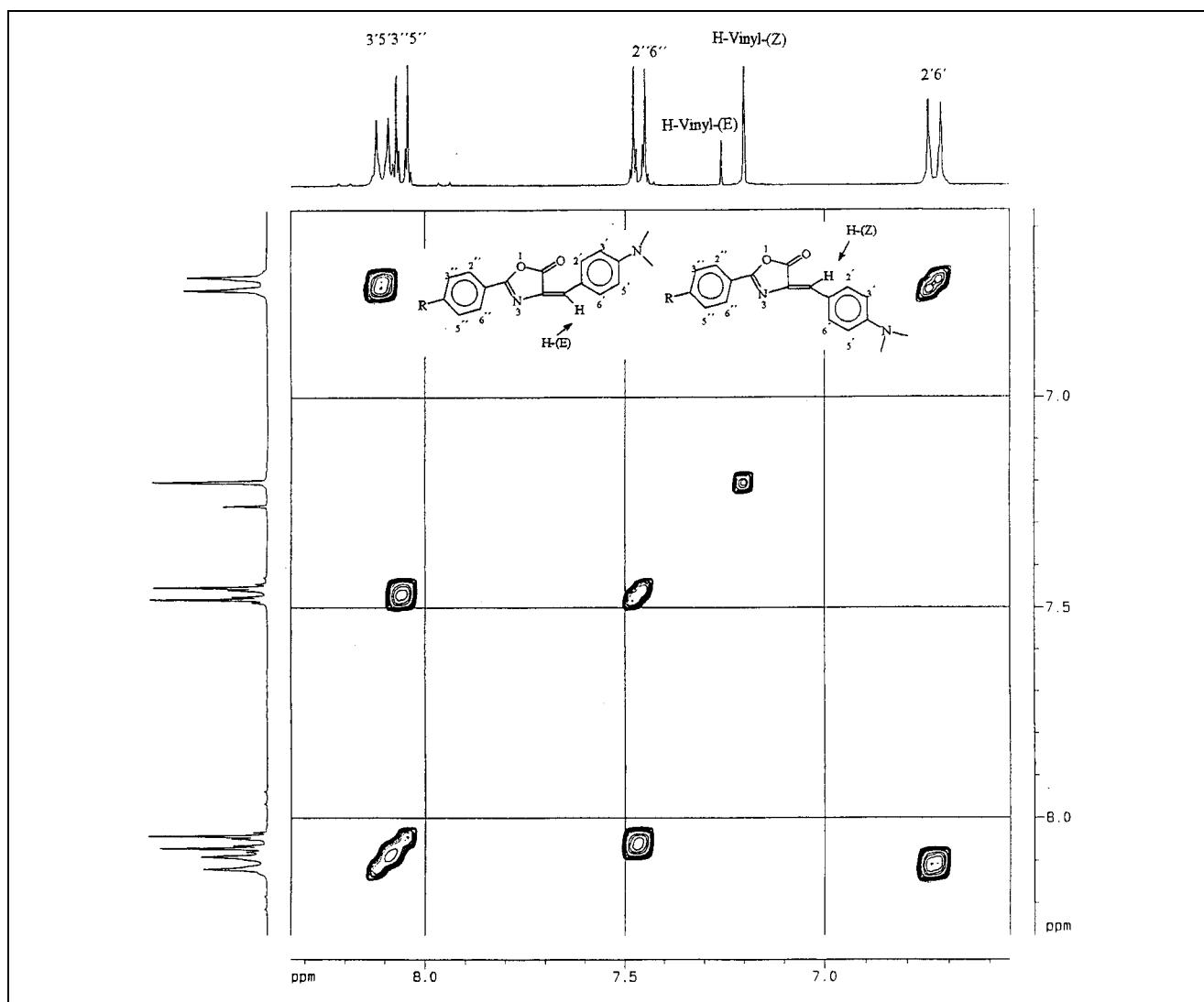
pH 7,4 beträgt etwa 20,5 h, bei pH 2 240 h, bei pH 9 1,3 h [4].

Bis zu 70% der verabreichten Dosis rac-**1** (400 mg) erscheinen als 4-Chlorhippursäure und 5 bis 10% als Glucuronid der 4-Chlorbenzoësäure im Harn. Die Menge an unverändertem rac-**1** im Harn beträgt etwa 2%.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Bei den pharmakokinetischen Untersuchungen zu **1** zogen wir zur Erkennung der 4-Chlorhippursäure als dc-Orientierungsreaktion die wenig bekannte Altmann-Reaktion [5] heran, bei der auf einer Kieselgelplatte (KG 60 ohne Fluoreszenzindikator) durch Reaktion von 4-Chlorhippursäure (**6**) mit 4-*N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd in Acetanhydrid bzw. Eisessig/H₂SO₄ ein orangefarbiges Produkt entsteht, nachdem 10 min auf 100 °C erhitzt worden ist. Der Fleck fluoresziert im UV-Licht (366 nm) leuchtend gelb-orange. Bei 254 nm ist die Fluoreszenz deutlich schwächer. Mit Hilfe dieser Reaktion können – wie wir fanden – densitometrisch noch ca. 5 µg der 4-Chlorhippursäure (Schmp. 148 °C) detektiert werden. Auf Aluminiumoxid verläuft die Reaktion analog. Versuche, die gelb gefärbte Verbindung aus Kieselgel zu eluieren und nach Reinigung der Strukturanalyse zuzuführen, schlugen fehl, weil sich die Substanz bei dem Extraktionsvorgang und der Reinigung durch SC bzw. präparative HPLC zersetzte. Daher wurde zunächst das Verhalten der 4-Chlorhippursäure beim Erwärmten auf Kieselgel in Gegenwart von Essigsäureanhydrid bzw. Eisessig/Schwefelsäure untersucht. Es resultierte eine kristalline Substanz vom Schmelzbereich 135–140 °C, die sich nach Ausweis der Massen- und NMR-Spektroskopie sowie durch HPLC als ein Gemisch von 4-Chlorhippursäure und dem durch Wasserabspaltung entstandenen Azlacton erwies (Schema).

Die präparativ untersuchte Reaktion von **8** mit 4-*N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd führt nach den spektroskopischen Daten zu einem Gemisch der *E*- und *Z*-Isomeren der Benzylidenverbindung **9**, dessen präparative Trennung noch nicht gelang. Die Ausbeute beträgt bei einem Ansatz von 0,03 mol 70% d. Th. (Schmp. 228–230 °C). Ohne die zu **8** führenden wasserabspaltenden Zusätze (Acetanhydrid bzw. Eisessig/H₂SO₄) erfolgt keine Bildung von **9**. Das *E/Z*-

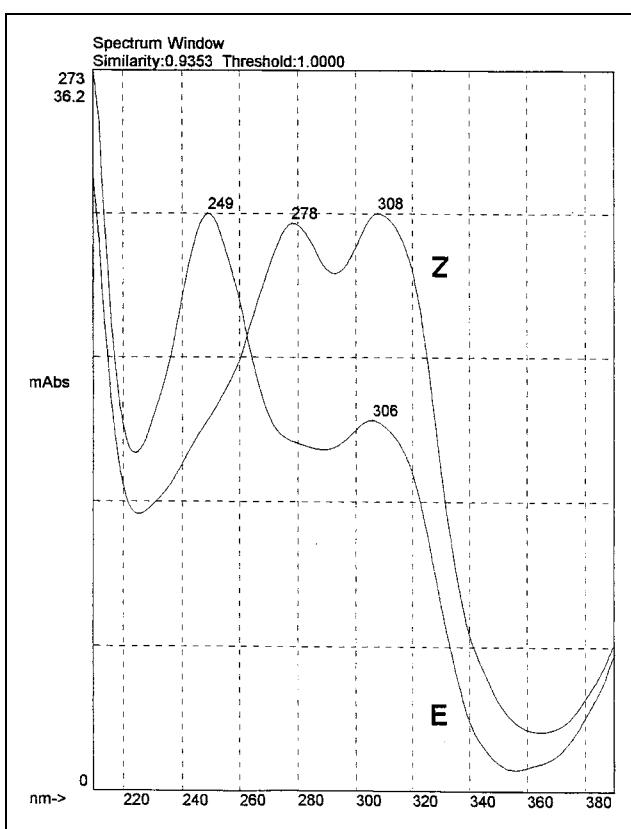
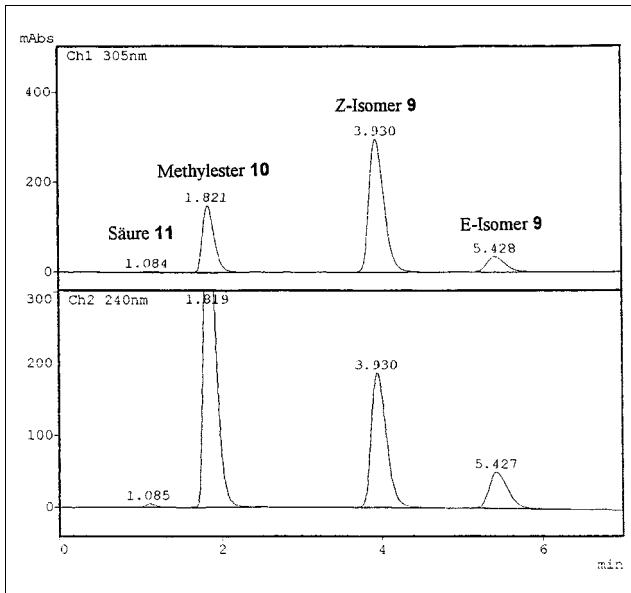
Abb. 1: H/H-Cosy-NMR von **9**

Verhältnis von **9** wurde durch ^1H -NMR und H/H-Cosy-NMR (Abb. 1) aufgeklärt. Als Bezug für die rechnerische Bearbeitung diente das Signal des Vinylprotons, das in der Z-Form bei 7,20 ppm und in der E-Form bei 7,25 ppm als Singulett erscheint. Es dominiert das Z-Isomere [$E/Z = 1:2,7$ bzw. 3]. Um einen möglichen Einfluss des Chloratoms auf das E/Z -Verhältnis zu erkennen, wurde sowohl die in 4-Stellung fluorierte als auch die bromierte Benzylidenverbindung synthetisiert, die alle drei hohe Schmelzpunkte zeigen. Es dominiert bei den Benzylidenverbindungen eindeutig das Z-Isomere, allerdings über den weiten Bereich von 3:1 bis 13:1 (bei der fluorierten Verbindung). Diese Messungen wurden mit den bei der Aufarbeitung erhaltenen kristallinen Isomerengemischen durchgeführt und sind somit nur bedingt relevant für die Zusammensetzung bei Reaktionsende. Inzwischen gelang es auch, in dem Reaktionsansatz vor der Aufarbeitung das E/Z -Verhältnis zu bestimmen. Danach entsteht ganz überwiegend das Z-Isomere (99:1), mithin geht bei der Aufarbeitung ein beträchtlicher Anteil des Z-Isomeren verloren. E- und Z-Isomere unterscheiden sich charakteristisch durch ihre UV-Spektren (Abb. 2).

Die Benzylidenverbindungen zeichnen sich durch eine gewisse Instabilität aus. So entsteht bei der HPLC (RP-18) mit dem Eluens CH_3OH der (*Z*)-2(4-Chlorbenzamido)-4'-

dimethylaminozimtsäuremethylester **10**, der auch als Referenzsubstanz synthetisiert wurde (Schema). Er liegt ausschließlich in der Z-Form vor. Enthält das bei der HPLC verwendete Methanol Spuren von Wasser, so tritt neben der Methanolyse – abhängig vom Wassergehalt – noch Hydrolyse ein (**11**). **11** ist gelb gefärbt. Versucht man, das Z-Zimtsäurederivat **11** unter Schwefelsäure-Katalyse zum Methylester reagieren zu lassen, so entsteht nicht dieser, sondern unerwartet unter Cyclisierung zum Azlacton das Methoxyderivat **12**. Abb. 3 veranschaulicht eine solche HPLC-Trennung von **9** mit den durch Methanolyse und Hydrolyse entstandenen Produkten **10** und **11**. Allerdings muss die Flüssigchromatographie wegen der bedingten Instabilität rasch und jeweils mit frisch hergestellten Lösungen durchgeführt werden. Lässt man die methanolische Lösung von **9** 24 h bei RT stehen, so enthält die Lösung danach nur **10**.

Zusammenfassend haben unsere Untersuchungen ergeben, dass der bei der Detektion von halogenierten Hippursäuren auf DC-Platten mit 4-*N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd entstehende fluoreszierende orangefarbige Fleck aus einem E/Z -Gemisch der entsprechenden Benzylidenverbindungen besteht. Die Bildung verläuft über die Azlactone. Im E/Z -Gemisch dominieren die Z-Derivate (>90%). Sie unterliegen leicht der Hydrolyse und Methanolyse.

Abb. 2: UV-Spektren der *E*- und *Z*-Isomeren von **9**Abb. 3: Chromatogramm der HPLC-Trennung von **9** (*E* + *Z*), **10** und **11**

Die Reaktion gestattet noch etwa 5 µg der 4-Chlorhippursäure mit Hilfe des gelben fluoreszierenden Fleckes auf der DC-Platte nachzuweisen. Eine Fluoreszenzmessung steigert die Erfassungsgrenze um den Faktor 10.

3. Experimenteller Teil

3.1. Präparativer Teil

3.1.1. *N*-(4-Chlorbenzoyl)glycin (**6**)

Zu einer Lösung von 0,25 mol Glycin-HCl in 350 ml 10%iger NaOH werden unter kräftigem Rühren tropfenweise 0,025 mol 4-Chlorbenzoylchlorid zugegeben, wobei die Temperatur 30 °C nicht überschritten werden darf.

Nach Beendigung der Zugabe wird noch weitere 2 h bei RT gerührt, anschließend mit konz. HCl neutralisiert, die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 148 °C (H₂O) (148 °C [6]); Ausbeute 77% d. Th. Im Einzelfall wurde auch eine hochschmelzende Modifikation (Schmp. 201 °C) erhalten, die im MS völlig der niedrig schmelzenden Form entsprach.

3.1.2. *N*-(4-Fluorbenzoyl)glycin (**13**)

analog 3.1.1.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 146–150 °C (EtOH) (163–165 °C [7]); Ausbeute 73% d. Th.

3.1.3. *N*-(4-Brombenzoyl)glycin (**14**)

analog 3.1.1.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 163–164 °C (EtOH) (164 °C [8]); Ausbeute 70% d. Th.

3.1.4. 2-(4-Chlorphenyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**8**)

0,06 mol **6** werden in 60 ml Acetanhydrid 1 h unter Rückfluss erhitzt. Die nach dem Erkalten ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und über Blaugel getrocknet.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 126–128 °C (127 °C [9]).

3.1.5. 2-(4-Bromphenyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**15**)

analog 3.1.4.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 127 °C (127 °C [10]).

3.1.6. 2-(4-Fluorphenyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**16**)

analog 3.1.4.

Farblose Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 118 °C (118 °C [11]).

3.1.7. 2-(4-Chlorphenyl)-4-[(*E/Z*)-4-(4-dimethylamino)benzyliden]-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**9**)

0,03 mol (**6**) und 0,03 mol 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden mit 2,5 g wasserfreiem Natriumacetat und 10 g Acetanhydrid über 2 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT werden 12 ml EtOH zugegeben und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig eiskaltem EtOH gewaschen und getrocknet.

Rote bis orange Kristalle, Schmp. 228–230 °C (Toluol); Ausbeute 70% d. Th. MS (rel.%) = M + 326 (100), 298 (5), 159 (100), 139 (30), 111 (10). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 3,1 (s, 6 H, N(CH₃)₂, 6,7 (d, 2 H, J = 9,16 Hz, arom), 7,20 (s 1 H, H-vinyl(*Z*)), 7,25 (s, 1 H, H-Vinyl(*E*)), 7,47 (d, 2 H, J = 8,62 Hz, arom), 8,07 (m, 4 H, arom).

C₁₈H₁₅N₂O₂Cl (326,8), EA

3.1.8. 2-(4-Fluorphenyl)-4-[(*E/Z*)-4-(4-dimethylamino)benzyliden]-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**17**)

analog 3.1.7.

Rote bis orange Kristalle, Schmp. 249 °C (Toluol); Ausbeute 59% d. Th. MS (rel.%) = M + 310 (100), 159 (100), 143 (20), 123 (90), 95 (20). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 3,1 (s, 6 H, N(CH₃)₂, 6,7 (d, 2 H, J = 9,8 Hz, arom), 7,2 (d, 2 H, J = 5,2 Hz, arom), 7,25 (s 1 H, H-vinyl(*Z*)), 7,4 (s, 1 H, H-Vinyl(*E*)), 8,1 (m, 4 H, arom).

C₁₈H₁₅N₂O₂F (310,3), EA

3.1.9. 2-(4-Bromphenyl)-4-[(*E/Z*)-4-(4-dimethylamino)benzyliden]-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (**18**)

analog 3.1.7.

Rote bis orange Kristalle, Schmp. 214 °C (zunächst aus Toluol, dann unter Verlusten aus EtOH); Ausbeute 71% d. Th. MS (rel.%) = M + 370 (10), 183 (10), 159 (100), 143 (6). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 3,3 (s, 6 H, N(CH₃)₂, 6,7 (d, 2 H, J = 9,8 Hz, arom), 7,2 (d, 2 H, J = 9,4 Hz, arom), 7,2 (s 1 H, H-vinyl(*Z*)), 7,4 (s, 1 H, H-Vinyl(*E*)), 8,1 (m, 4 H, arom).

C₁₈H₁₅N₂O₂Br (371,2), EA

3.1.10. (*Z*)-2-[(4-Chlorbenzoyl)amino]-3-[4-(dimethylamino)phenyl]acrylsäure (**11**)

9 mmol **9** werden in 200 ml 1%iger NaOH suspendiert und unter Rückfluss auf 90 °C erhitzt. Wenn sich **9** nahezu gelöst hat, wird filtriert und mit konz. HCl angesäuert. Die ausgefallenen Kristalle werden abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Gelbe Kristalle (HPLC-rein), Schmp. 218–225 °C (EtOH); Ausbeute 77% d. Th. MS (rel.%) = M + 344 (100), 326 (10), 300 (25), 205 (30), 187 (35), 161 (100), 146 (30), 139 (20), 134 (10). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ + CD₃OD) δ = 2,76 (s, 6 H, N(CH₃)₂, 6,45 (d, 2 H, J = 8,9 Hz, arom), 7,25 (m, 4 H, arom), 7,35 (s, 1 H, H-vinyl(*Z*)), 7,65 (d, 2 H, J = 8,28 Hz, arom).

3.1.11. Methyl-(Z)-2{[(4-chlorbenzoyl)amino]-3-[4-(dimethylamino)phenyl]acrylat (10)}

Die Darstellung erfolgt aus **11** mit etherischer Diazomethan-Lösung. Gelbe Kristalle (HPLC rein), Schmp. 62–65 °C; Ausbeute 99% d. Th. MS (rel.%) = M+ 357 (50), 219 (30), 187 (100), 159 (60), 139 (20).

3.1.12. 2-(4-Chlorphenyl)-4-[4-(dimethylamino)benzyl]-4-methoxy-4,5-dihydro-1,3-oxazol-5-on (12)

2,9 mmol **10** werden in einer Mischung aus 50 ml CHCl₃ und 5 ml MeOH gelöst, mit 5 Tropfen konz. H₂SO₄ versetzt und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionswasser wird in einem Wasserabscheider aufgefangen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels verbleibt ein hellgelbes Öl, das bei 6 °C langsam kristallisiert.

Ausbeute 30% d.Th.

MS (rel.%) = M+ 358 (100), 219 (25), 187 (80), 164 (40), 139 (20). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 2,93.

3.2. Analytischer Teil

3.2.1. Dünnenschichtchromatographie

Die DC erfolgte nach Angaben von Moll [5] an Kieselgel 60-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator (Merck/Darmstadt). Als Fließmittel diente eine 2 + 1 + 1 (v/v)-Mischung von 1-Butanol, 1-Propanol und Ammoniaklösung (25%) (Kammersättigung). Zur Detektion wurde die sorgfältig getrocknete Platte bis zur Transparenz mit einer 1%igen (m/v) Lösung von 4-*N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd in Aceton/Acetanhydrid 4 + 1 (v/v) besprüht und im Trockenschrank ca. 10 min auf 100 °C erhitzt. **6** (hR_f = 35) erscheint nach der Reaktion als gelber Fleck auf weißem Grund. Die für *Erlenmeyer-Azolactone* aus Hippursäuren und *N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd spezifische orangegelbe Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 366 nm; UV-Lampe HP-UVIS, Desaga, Heidelberg) steigert die analytische Empfindlichkeit erheblich und bietet die Möglichkeit einer densitometrischen Vermessung im Bereich von 10 bis 100 ng je Fleck. Die Remissionsmessung ohne UV-Anregung erlaubt nur Messungen bis minimal 500 ng je Fleck. Zum Beweis des gestuften Reaktionsablaufs wurde eine DC-Platte zunächst mit methanolischer 4-Chlorhippursäure-Lösung (5% m/v) imprägniert, nach dem Trocknen mit Acetanhydrid besprüht und im Trockenschrank 10 min bzw. 30 min auf 100 °C erwärmt. Das Ethylacetat-Eluat der abgelösten Sorbensschicht wurde über Na₂SO₄ getrocknet und nach Abziehen des Lösungsmittels mittels HPLC (3.2.2.) untersucht. Zur Klärung des Einflusses des Sorbensmaterials auf den Ablauf der Detektion wurden ohne Optimierung des Fließmittels neben Kieselgel 60 noch Aluminiumoxid, mikrokristalline Cellulose und aminoalkyliertes Kieselgel (alle Macherey und Nagel, Düren) eingesetzt. Es traten die gleichen gefärbten, fluoreszierenden Flecke auf.

3.2.2. HPLC

Die Chromatographie erfolgte an einer LiChrospher® RP-18-Säule (125 × 4 mm; 100 µm Merck, Darmstadt); Fließmittel Methanol (Merck, Darmstadt); Flow 0,8 ml/min; Detektorwellenlängen 240 und 305 nm; UV-Spektrenaufnahme (DAD) 210–390 nm.

Gerätekonfiguration: Pumpe LC-10AS (isokratisch), Autoinjektor SIL-10A, UV-Detektor SPD-M10A (Diodenarray); Bus-Modul CBM-10A, Class-LC10-Workstation (alle Anlagenteile Shimadzu Europa GmbH, Duisburg).

3.2.3. Spektroskopie

Die Massenspektren wurden mit dem doppelt fokussierenden Gerät AMD 402 (Intecra GmbH, D-27243 Harpstedt) aufgenommen

Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Kernresonanzspektrometer DPX 300 Avance (300 MHz) der Fa. Bruker (D-76287 Rheinstetten) aufgenommen.

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

Literatur

- 1 Boxberg, C.V.; Breidenbach, K.; Höhler, H.; Köbberling, J.: Dtsch. Med. Wschr. **123**, 866 (1998)
- 2 Oelschläger, H.; Rothley, D.: Forschungsbericht der Universität Frankfurt a. M. **1993**, unveröffentlicht, vorgetragen an der Universität Krakau (Polen), 6.–11.9.1993
- 3 Hlavica, P.; Niebch, G.: Arzneim.-Forsch. **35**, 67 (1985)
- 4 Seeling, A.; Oelschläger, H.; Rothley, D.: Pharmazie **55**, 293 (2000)
- 5 Moll, F.: Biochemische und biopharmazeutische Untersuchungsverfahren; S. 191ff. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1974
- 6 Novello, M. et al.: J. Biol. Chem. **67**, 559 (1926)
- 7 Benvenuti, S. et al.: Farmaco **53**, 439 (1998)
- 8 Mestdagh, H.; Pancraci, A.: Tetrahedron **40**, 3399 (1984)
- 9 El-Hashash, M.A.; Afify, A.A.; Kaddah, A.M.; El-Kady, S.S.: Synthesis **10**, 798 (1981)
- 10 Tan, H.S. et al.: Recl. Trav. Chim. Pays-Bas **88**, 209 (1969)
- 11 Balaban, A.T. et al.: Tetrahedron **19**, 2199 (1963)

Eingegangen am 17. November 1999

Angenommen am 15. Januar 2000

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Oelschläger

Universität Jena

Institut für Pharmazie

Philosophenweg 14

D-07743 Jena