Biomimetische Studien an Arzneistoffen mit Benzilsäure- oder Estrogenstruktur

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Kai Smolinka
geboren am 18. Dezember 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Bernhard Ronacher

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Göber

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Clement

3. Gutachter: Prof. Dr. R. Stößer

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2001

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin auf Anregung und unter Leitung von Prof. Dr. B. Göber, dem ich für seine engagierte Betreuung und die wertvollen Diskussionen herzlich danke.

Den Mitarbeitern des Instituts für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, Herrn Dr. M. Löwis of Menar, Frau A. Woyda und Frau A. Thiesies, danke ich für die Aufnahmen der EI-MS und der Kernresonanzspektren.
Herrn Dr. M. Bartoszek vom Institut für Angewandte Chemie Berlin-Adlershof e. V. danke ich für die Anfertigung der FAB-MS und Herrn Dr. E. Gründemann für die Aufnahme der Kernresonanzspektren der Steroide.
Ich danke weiterhin Herrn Dr. U. Kertscher und Herrn D. Runald, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie im Forschungsverbund Berlin e. V., für die Aufnahmen der ESI-MS und Herrn Dr. G. Höhne, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin, für die Anfertigung und Hilfe bei der Interpretation der CI-MS.

Der Apogepha Arzneimittel GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die Überlassung zahlreicher Vergleichssubstanzen.
Der Jenapharm GmbH danke ich für die kostenlose Abgabe der Estrogenderivate.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin, insbesondere der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie, möchte ich für die allseitige Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit danken.
Mein besonderer Dank gilt Frau U. Muschick für die Durchführung der Untersuchungen mit den Rattenlebermikrosomen und Herrn Dr. P. Witte und Herrn H. Döhnert für die tatkräftige Unterstützung bei den GC-MS-Untersuchungen.
Herrn Dr. T. Vorwerk und Frau M. Baumbach danke ich für die Synthese und Überlassung zahlreicher Verbindungen als Ausgangstoffe, Vergleichssubstanzen und Katalysatoren.
Für die aktive experimentelle Mithilfe danke ich allen ehemaligen Tutoren der Arbeitsgruppe.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen 5
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 7

1 Einleitung und Problemstellung 9

2 Biochemische und biomimetische Oxygenierungsreaktionen 12

2.1 Cytochrom P450 vermittelte Oxygenierungen 12
2.2 Metallporphyrin vermittelte Modelloxygenierungen 20

3 Untersuchungen und Ergebnisse 39

3.1 Allgemeine Methodik der biomimetischen Umsetzungen basischer Benzilsäure-derivate, Produktisolierung und -identifizierung 39
3.2 Biomimetische Umsetzungen von am Aromaten substituierten Benzilsäurederivaten und verwandten Verbindungen 40
3.2.1 Biomimetische Umsetzungen mit 3,4-Dimethoxybenzophenon (8) 41
3.2.2 Umsetzungen mit N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (1) 47
3.2.2.1 Biomimetische Reaktionen 47
3.2.2.2 Quantitative Bestimmungen 58
3.2.2.3 Untersuchungen zur oxidativen Esterspaltung 60
3.2.3 Umsetzungen mit N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (2) 62
3.2.4 Umsetzungen mit N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (3) 67
3.3 Umsetzungen mit Denaverin (4) 77
3.3.1 Biomimetische Untersuchungen 77
3.3.2 Orientierende Untersuchungen mit einem biologischen Modell 87
3.4 Diskussion der Umsetzungen von Arzneistoffen mit Benzilsäurestruktur 89
3.4.1 Diskussion unter Berücksichtigung der Reaktionsmechanismen 89
3.4.2 Diskussion unter Berücksichtigung der Biotransformation von Benzilsäurederivaten 93
3.5 Umsetzungen von Estrogenen 101
3.5.1 Biomimetische Untersuchungen 101
3.5.2 Diskussion 109

4 Experimenteller Teil 113

4.1 Geräte 113
4.2 Chemikalien und Vergleichssubstanzen 114

4.2.1 Chemikalien 114
4.2.2 Vergleichssubstanzen 115
4.2.2.1 3,4-Dimethoxybenzilsäurederivate und verwandte Substanzen 115
4.2.2.2 3,3‘-Dimethoxybenzilsäurederivate und verwandte Substanzen 122
4.2.2.3 Denaverinhydrochlorid und Derivate 125
4.2.2.4 Estrogene 130
4.3 Biomimetische Reaktionsansätze 131
4.4 Biologische Reaktionsansätze 131
4.5 Chromatographische Methoden 132
4.5.1 Analytische Dünnschichtchromatographie 132
4.5.2 Präparative Schichtchromatographie 133
4.5.3 HPLC 134
4.5.4 Quantitative Bestimmungen 134
4.6 NMR-Untersuchungen 136
4.7 Massenspektrometrische Untersuchungen 136
4.8 GC-MS-Untersuchungen 136

5 Zusammenfassung 138

6 Literatur 141

Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen

1	N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
2	N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
3	N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat
4	2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat, Denaverin
5	3-Methoxy-estra-1,3,5(10)-trien-17-on, Estronmethylether
6	19-Nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol, Ethinylestradiol
7	3-Methoxy-19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-17-ol, Mestranol
8	3,4-Dimethoxybenzophenon
9	2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzophenon
10	3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon
11	4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon
12	3,4-Dimethoxybenzilsäure
13	(cis,trans)-N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid
14	4-Piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
15	(E/Z)-N-Formyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
16	Methyl 3,4-dimethoxybenzilat
17	Substanzgemisch: monochlorierte Derivate von **1**
18	N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxy-O-methylbenzilat
19	Monochloriertes N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
20	Substanzgemisch: mono- und dichlorierte Derivate von **1**
21	3-Piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
22	N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid
23	N-Formyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat
24	Substanzgemisch: Derivate von **2**
25	3,3‘-Dimethoxybenzilsäure
26	(cis,trans) N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat N-oxid
27	4-Piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat
28	(E/Z) N-Formyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat
29	3,3‘-Dimethoxybenzophenon
30	Methyl 3,3‘-dimethoxybenzilat
31	N-Methyl-3-piperidinyl 3,3‘-dimethoxy-O-methylbenzilat
32	N-Methyl-3-piperidinyl 3,3‘-dimethoxyhydroxybenzilat
33	N-Methyl-3-piperidinyl 3-hydroxy-3‘-methoxybenzilat

34	Monochloriertes **33**
35	Dichloriertes **33**
36	O-(2-Ethylbutyl)benzilsäure
37	2-Methylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat
38	2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat N-oxid
39	(E/Z)-2-(N-Formyl-N-methylamino)ethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat
40	2-[2-(2-Ethylbutoxy)-2,2-diphenylacetoxy]essigsäure
41	Benzophenon
42	Methyl benzilat
43	Methyl O-(2-ethylbutyl)benzilat
44	Benzilsäure
45	2-Hydroxybenzophenon
46	2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)-2-hydroxybenzilat
47	3-Methoxy-estra-1,3,5(10)-trien-6,17-dion, 6-Oxoestronmethylether

Porphyrinderivate:

P	Porphyrin, allgemein
MnTPPCl	Mangan(III) 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin chlorid
MnTPFPPCl	Mangan(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)porphyrin chlorid
$MnTPFPS_4PCl$	Mangan(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)-β-tetrasulfoporphyrin chlorid
MnTDCPPCl	Mangan(III) 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorphenyl)porphyrin chlorid
FeTPPCl	Eisen(III) 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin chlorid
FeTPFPPCl	Eisen(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)porphyrin chlorid
$FeTPFPS_4PCl$	Eisen(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)-β-tetrasulfoporphyrin chlorid
FeTDCPPCl	Eisen(III) 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorphenyl)porphyrin chlorid
$FeTDCPBr_8PCl$	Eisen(III) 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorphenyl)-β-octabromporphyrin chlorid
Fe(III)TMPCl	Eisen(III) 5,10,15,20-tetramesitylporphyrin chlorid
FeTSMP	Eisen(III) 5,10,15,20- tetrakis(3-sulfonatomesityl)porphyrin

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

450191-S	5-[(2-Amino-acetylamino)methyl]-1-[4-chlor-2-(2-chlorbenzoyl)phenyl]-1*H*-[1,2,4]triazol-3-carbonsäure dimethylamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CI	Chemische Ionisation
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC/dc	Dünnschichtchromatographie/dünnschichtchromatographisch
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d. h.	das heisst
Dm	Detektionsmittel
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPR	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
Fp.	Schmelzbereich
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor
HPLC/hplc	Hochleistungsflüssigchromatographie/hochleistungsflüssigchromatographisch
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HRP	Meerettichperoxidase
IBPP	Isobutyryl-2-isopropylpyrazolo[2,3-a]pyridin
IC_{50}	halbmaximale Hemmkonzentration
IUPAC	Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie
M^+	Molekülionenpeak
MBTH	3-Methylbenzothiazolin-2-on hydrazon
MS/ms	Massenspektrum/massenspektrometrisch
m/z	Masse/Ladung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
NIH	National Institut of Health (USA)

NMR/nmr	Kernresonanzspektroskopie/kernresonanzspektroskopisch
^{1}H-NMR	Protonenresonanzspektrum
^{13}C-NMR	Kohlenstoff-13-Resonanzspektrum
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PSC	Präparative Schichtchromatographie
R_F	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase
R_T	Retentionszeit
SKF-525A	2-Diethylaminoethyl 2,2-diethylaminovalerate
SPME	Festphasenmikroextraktion
u. Ä.	und Ähnliches
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung und Problemstellung

Arzneistoffe und andere Xenobiotika werden in der Regel bei Körperpassage enzymatisch umgewandelt. Die gebildeten Metabolite können aktive oder inaktive Bioreaktanden sein und somit zu verminderter oder zu erhöhter Wirksamkeit bzw. Toxizität führen. Die Kenntnis dieser Stoffwandlungsprozesse und des entstehenden Metabolitenspektrums spielen daher eine wichtige Rolle in der Bewertung von Arzneimitteln, vor allem im Rahmen der Zulassung neuer Arzneistoffe und der Suche nach den Ursachen von Nebenwirkungen und Toxizität. Pharmakodynamische und -kinetische Studien werden zunächst an geeigneten Tierspezies durchgeführt, bevor die Prüfung am Menschen erfolgt. In Ergänzung und zum Teil auch als Ersatz für Metabolismusstudien am Tier hat sich in den letzten Jahren eine Reihe biologischer und chemischer Modelle etabliert [1]. Vorteile gegenüber den Untersuchungen am Tier bieten sie mit der möglichen gezielten Beeinflussung von einzelnen Parametern, der verminderten Komplexität, welche einen detaillierten Einblick in die Mechanismen erlaubt, einer im Allgemeinen geringeren Varianz der Ergebnisse und einer leichteren Handhabbarkeit. Nicht zuletzt kann die Zahl der Tierversuche und damit die Anzahl an Versuchstieren eventuell verringert werden. Solche Ersatzmethoden erfassen jedoch immer nur modellartig Einzelaspekte der Stoffwechselvorgänge, so dass eine Überprüfung der Ergebnisse an Tier und Mensch immer notwendig sein wird.

Die Anwendung chemischer Modellsysteme zur Modellierung von Stoffwandlungswegen wird nach Breslow unter dem Begriff „Biomimetik“ zusammengefasst [2]. Besonderes Interesse besteht an der Simulation der Reaktionen des Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasesystems, dem bei der oxidativen Metabolisierung von Xenobiotika eine große Bedeutung zukommt. Mit Hilfe biomimetischer Modelle können Derivate gewonnen werden, die auf klassisch chemischen Wegen mitunter schwer zugänglich sind. Sie können als Vergleichssubstanzen in Metabolismusstudien oder als Testsubstanzen in pharmakologisch-toxikologischen Studien dienen. Die gebildeten Produktspektren können möglicherweise unbekannte Reaktionswege aufzeigen und erste Hinweise auf das zu erwartende Metabolitenspektrum geben. Nicht zuletzt führten zahlreiche biomimetische Studien zur Klärung und zu einem tieferen Verständnis der zugrundeliegenden enzymatischen Reaktionen [3][4].

Einfache chemische Systeme wie z. B. Fentons Reagenz [5][6], Udenfriends Reagenz oder Gifs System [7] sind aufgrund ihres grundsätzlich verschiedenen Reaktionsablaufs nicht zur

Modellierung enzymatischer Abläufe geeignet, werden jedoch zum Teil noch als Vergleichssysteme, insbesondere zur Klärung von Reaktionsmechanismen, genutzt. Eine weitgehende Übereinstimmung mit den enzymatischen Monooxygenierungen konnte von Systemen mit Metallporphyrinen aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandschaft zum aktiven Zentrum des Cytochrom P450 erwartet werden. Zahlreiche systematische Untersuchungen führten zur Entwicklung effizienter Modellsysteme auf Metallporphyrinbasis [8][9], die erfolgreich zur Epoxidierung olefinischer Doppelbindungen [10], zur Hydroxylierung von Alkanen und zur Oxygenierung von Aromaten [11] eingesetzt wurden. In den letzten Jahren gelang es, solche Systeme erfolgreich zur Nachahmung des Metabolismus von Arzneistoffen einzusetzen [12].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, basierend auf den Erkenntnissen vorliegender Studien, biomimetische Modellsysteme ergänzend zu Metabolismusstudien anzuwenden. Es sollten die systematischen Untersuchungen an Diphenylmethanderivaten hinsichtlich des Einflusses der Aromatensubstitution vertieft werden und die Anwendbarkeit eines optimierten Modellsystems auf andere, von Diphenylmethanen abweichende Strukturen getestet werden.

Für einige in unserem Arbeitskreis als potentielle Antiparkinsonmittel neu entwickelten Benzilsäurederivate sollten beispielhaft mögliche Biotransformationswege aufgezeigt und für aktuell laufende Biotransformationsstudien die Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Derivaten erarbeitet und potentielle Metaboliten als Vergleichssubstanzen gewonnen werden. Hierfür wurden die Verbindungen N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**), N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**) und N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (**3**) ausgewählt. Im Rahmen der systematischen Untersuchungen sollten die Umsetzungen in verschiedenen biomimetischen Systemen quantitativ erfasst werden.

Für Denaverin (**4**), einem muskulotropen Spasmolytikum aus der Reihe der basischen Ether- und Esterderivate der an den Aromaten unsubstituierten Benzilsäure, sollten mögliche Metabolisierungswege am biomimetischen und einem einfachen biologischen Modell untersucht werden, da Untersuchungen am Menschen und an der Ratte bisher wenig befriedigende Ergebnisse brachten. Die Produktspektren der biomimetischen und *in vitro*-Modelle und des *in vivo*-Metabolismus sollen vergleichend diskutiert werden.

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des chemischen Modells auf Stoffe ohne Diphenylmethanstruktur wurden Substrate mit Estrogenstruktur ausgewählt. Als Modellsubstrat sollte Estronmethylether (**5**) umgesetzt und die Untersuchungen mit den arzneilich verwendeten Ethinylestradiol (**6**) und Mestranol (**7**) ergänzt werden. Estrogene werden millionenfach vor allem zur Kontrazeption und Osteoporoseprophylaxe angewendet. Sie werden bei Körperpassage vielfältig metabolisiert. Die geringen therapeutischen Dosen, in der Regel weniger als

100 µg, und die entsprechend geringen Mengen an Metaboliten stellen an sich hohe Anforderungen an die analytischen Methoden zu ihrer Auffindung und Strukturklärung. Hinzu kommt, dass Vergleichssubstanzen nur begrenzt zur Verfügung stehen, da die Synthese erwarteter Metabolite auf klassisch chemischem Weg aufwendig und teuer ist. Die Entwicklung eines biomimetischen Modells, mit dem ausreichende Mengen umgesetzt und Vergleichssubstanzen gewonnen werden können, wäre daher wünschenswert.

2 Biochemische und biomimetische Oxygenierungsreaktionen

2.1 Cytochrom P450 vermittelte Oxygenierungen

Im Vordergrund der vielfältigen Umwandlungsprozesse von Arzneistoffen und anderen körperfremden Substanzen im Organismus stehen Reaktionen, die die Lipidlöslichkeit vermindern und eine renale Ausscheidung der Fremdstoffe ermöglichen. Durch sogenannte Funktionalisierungsreaktionen werden an der Ausgangsverbindung funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt (Phase I-Reaktionen). Durch Konjugation dieser funktionellen Gruppen mit aktivierten Resten aus dem Intermediärstoffwechsel wird die Wasserlöslichkeit weiter erhöht (Phase II-Reaktionen) und der Metabolit ausgeschieden [13][14][15].

Bei der Umwandlung körpereigener und -fremder Stoffe spielen die zur Gruppe der Häm-Proteine gehörenden Monooxygenasen eine herausragende Rolle. Die im Intermediärstoffwechsel eingebundenen Isoenzyme sind meist mitochondrial und z. T. auch am endoplasmatischen Retikulum (EPR) in der Leber und in den entsprechenden stoffbildenden Organen, z. B. für die Steroidbiosynthese in den Ovarien, den Testes oder den Nieren, lokalisiert. Ihre Substratspezifität ist hoch. Im Gegensatz dazu ist die Substratspezifität der im Fremdstoffwechsel involvierten Monooxygenasen gering, dies ermöglicht die Umwandlung vielfältiger Strukturen. Sie sind im EPR der Leber und anderer metabolisch aktiver Organe, z. B. der Haut und der Lunge, lokalisiert.

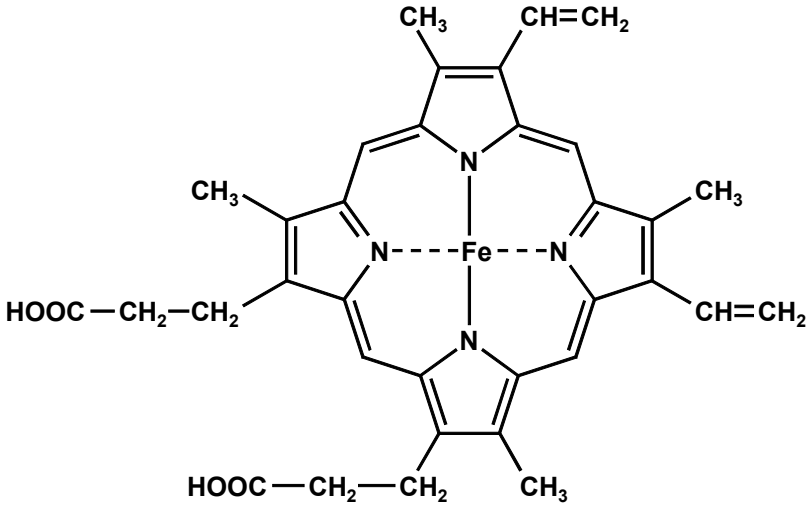
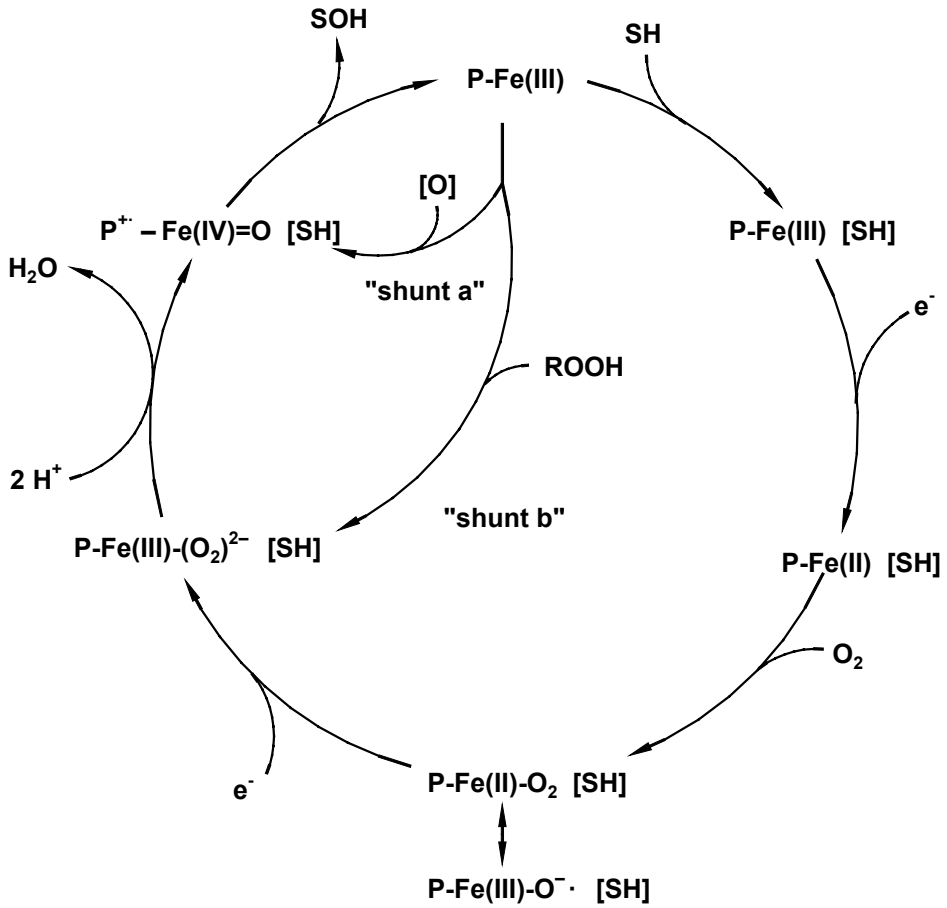


Abbildung 1: Eisen-Protoporphyrin(IX)-Chromophor der Cytochrom P450 Isoenzyme

Monooxygenasen sind in der Lage, molekularen Sauerstoff zu spalten, wobei ein Sauerstoffatom in ein Substrat eingeführt und das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Die charakteristische prosthetische Gruppe der Cytochrom P450 Isoenzyme ist das Eisen-Protoporphyrin(IX)-Chromophor (siehe Abbildung 1). Im Ruhezustand liegt das Eisen im Chromophor als Fe(III)-low-spin-Komplex vor. Vier der sechs Koordinationsstellen sind von den Stickstoffatomen des Porphyringrundgerüstes besetzt. Als fünfter, axialer Ligand fungiert die Thiolatgruppe eines Cysteinrestes der umgebenden Polypeptidkette des Enzyms. Die sechste Koordinationsstelle wird von einem Wassermolekül eingenommen. Der hydrophobe Proteinrest des Enzyms gewährleistet die Substratbindung, durch welche die Umwandlung des low-spin-Komplexes in einen high-spin-Komplex erfolgt und der katalytische Zyklus eingeleitet wird.



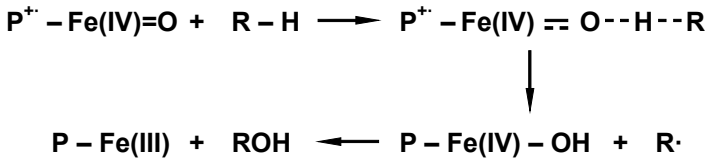
Schema 1: Schematische Darstellung des Reaktionszyklus von Cytochrom P450

Durch Aufnahme eines Elektrons, welches von der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase geliefert wird, wird Fe(III) zu Fe(II) reduziert. Molekularer Sauerstoff lagert sich unter Verdrängung des Wassermoleküls als sechster Ligand an. Nach erneuter Reduktion durch Auf-

nahme eines weiteren Elektrons wird das Sauerstoffmolekül unter Protonenaufnahme und Wasserabspaltung gespalten. Das entstehende reaktive Zwischenprodukt ist in der Lage, das Substrat durch Einschub des Sauerstoffatoms in eine C-H- oder X-H-Bindung zu oxygenieren. Gleichzeitig generiert sich der Fe(III)-low-spin-Komplex, der katalytische Zyklus ist durchlaufen und kann erneut stattfinden. In Schema 1 ist der katalytische Zyklus schematisch dargestellt.

Die aktive Spezies wird im Allgemeinen formal als Ferryl-Sauerstoff-Komplex $[FeO]^{3+}$ oder als Eisen-Oxo-Porphyrinradikalkation ($P^{\bullet+}Fe(IV)=O$) formuliert. Sie konnte bis jetzt nicht direkt beobachtet werden und wurde aus spektroskopischen Daten, gefundenen Produktspektren und theoretischen Berechnungen abgeleitet. Die Lokalisation des Radikals ist nicht unumstritten, da theoretische Betrachtungen sowohl die Möglichkeit eines Porphyrinkationradikals als auch die Lokalisation des Radikals am Schwefel des Thiolatliganden ergeben [16]. Letzteres würde den Einfluss des Axialliganden auf die Reaktivität verschiedener Häm-Proteine erklären.

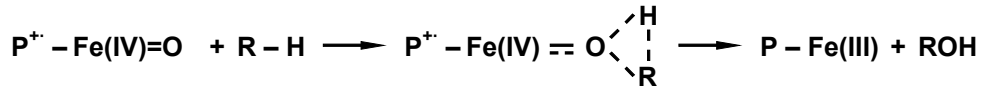
Ein Hinweis, dass in der aktiven Form nur ein Sauerstoffatom involviert ist, stellt die Aktivierung des Enzyms durch künstliche Sauerstoffdonatoren, wie z. B. Iodosylbenzen, dar. Dabei wird die komplizierte, reduktive Sauerstoffspaltung über einen sogenannten „shunt pathway“ (siehe Schema 1, shunt „a“) umgangen. Im Gegensatz ist auch Wasserstoffperoxid in der Lage, mit Cytochrom P450 über einen „shunt pathway“ (siehe Schema 1, shunt „b“) ein reaktives Zwischenprodukt zu bilden und nichtaktivierte Kohlenwasserstoffverbindungen zu hydroxylieren. Dies wird mit einem Fe(III)-peroxid-Komplex als aktives Intermediat in Verbindung gebracht, oder aber das Enzym ist in der Lage, ähnlich der Katalase Wasserstoffperoxid zu spalten, wobei Wasser und ein reaktives Zwischenprodukt entstehen. Möglicherweise existieren auch zwei oxygenierende Formen des Enzyms in Konkurrenz zueinander [17].



Schema 2: Rebound-Mechanismus der Alkanhydroxylierung durch Cytochrom P450

Die Insertion des aktivierten Sauerstoffatoms in eine C-H-Bindung kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Im sogenannten Rebound-Mechanismus wird nach Wasserstoffatomtransfer das entstehende Alkylradikal mit der Eisen(IV)-hydroxospezies (P-Fe(IV)-OH) rekombiniert (siehe Schema 2).

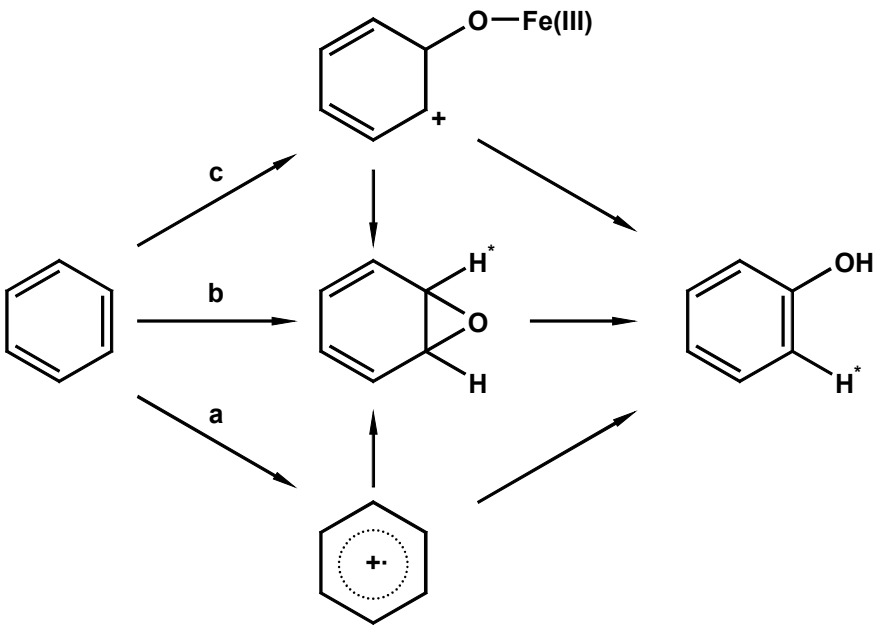
Neue Untersuchungen von Newcomb führen zu dem Schluss, dass der Rebound-Mechanismus nicht mit der Lebensdauer der mutmaßlichen Radikal-Zwischenstufen in Übereinstimmung zu bringen ist. Ihre Lebensdauer ist zu kurz. Radikale können daher nur als Übergangszustände in einem konzertierten Insertionsmechanismus angesehen werden [18]. In Schema 3 ist der konzertierte Insertionsmechanismus schematisch dargestellt.



Schema 3: Konzertierter Insertionsmechanismus nach Newcomb

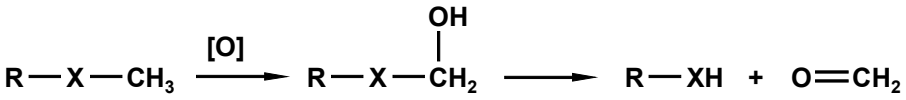
Die aktive Spezies des Enzyms hat jedoch einen High-spin-Grundzustand, der bevorzugt mehrstufige Reaktionen in Übereinstimmung mit dem Rebound-Mechanismus eingeht, während zu konzertierten Reaktionen der Low-spin-Zustand neigt, der aber keine Aktivierung des Komplexes erfordert. Eine mögliche Lösung dieser Problematik ist in einer Spinumkehr auf dem Weg zur reaktiven Zwischenstufe zu sehen, denn damit wären beide Insertionswege möglich und das Verhältnis vom konzertierten zum Radikalmechanismus wird durch die Wahrscheinlichkeit der Spinumkehr festgelegt. Die tatsächlich ablaufende Reaktion wäre damit substratabhängig, da vom Substrat der Verlauf der Reaktionskoordinate festgelegt würde [19][20]. Neben den hier erläuterten Mechanismen werden noch weitere Alternativen, z. B. kationische [21] oder fünffach koordinierte Kohlenstoffatome [22] oder ein agostischer Komplex [23] als Intermediate, diskutiert.

Die oben geführte Diskussion gilt grundsätzlich für alle Oxygenierungen von C-H-Bindungen. Weitere unterschiedliche Möglichkeiten bestehen innerhalb der einzelnen Reaktionen. Auf die Mechanismen der Allyloxidationen und der Olefinepoxidierungen soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sie in den in dieser Arbeit vorgestellten biomimetischen Untersuchungen keine Rolle spielen. Die Hydroxylierung am Aromaten kann über drei Wege erfolgen (siehe Schema 4): über die direkte Sauerstoffinsertion mit radikalischer Zwischenstufe (a), über die Epoxidierung einer aromatischen Bindung und anschließender Umlagerung des Arenoxids (b) und über ein kationisches Intermediat mit anschließender direkter Bildung des Phenols oder der indirekten über ein Epoxid (c). Die Umlagerung des Arenoxids erfolgt unter Wanderung des an der späteren Hydroxylierungsstelle sich befindenden Atoms (H oder Halogen) an den benachbarten Kohlenstoff. Dies wird allgemein als NIH-Shift bezeichnet [24].



Schema 4: Mögliche Reaktionsmechanismen der Aromatenoxygenierung

Neben der Oxygenierung nichtaktivierter C-H-Bindungen sind die Cytochrom P450 Isoenzyme in der Lage, oxidative Dealkylierungen an Heteroatomen zu katalysieren. Als Zwischenprodukt wird über die Oxygenierung des α-C-Atoms eine α-Hydroxyverbindung, ein Carbinolamin, Hemiacetal oder gem-Halohydrin, gebildet, welche nichtenzymatisch zur dealkylierten Verbindung und einem Aldehyd oder Keton zerfällt (siehe Schema 5).

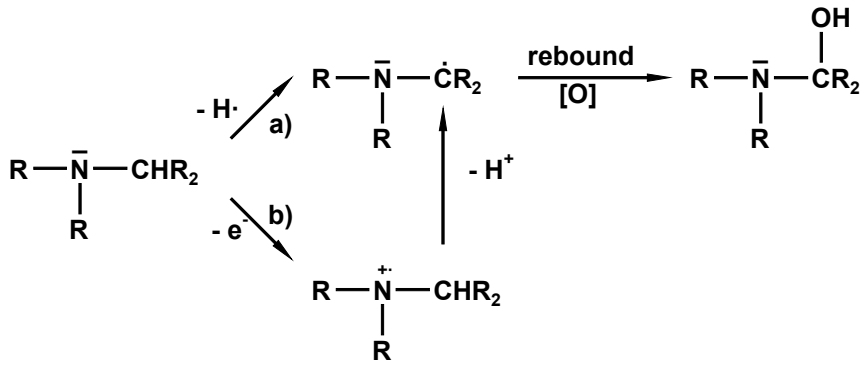


Schema 5: Allgemeiner Reaktionsmechanismus von Heteroatomdealkylierungen

Die Bildung der α-Hydroxyverbindung ist auf zwei Wegen möglich (siehe Schema 6): über Abstraktion eines Wasserstoffatoms des α-C-Atoms (a) oder über einen Elektronentransfer mit anschließender Deprotonierung (b).

Beide Wege führen zu einem Radikal in α-Stellung des Heteroatoms, welches nach dem Rebound-Mechanismus mit dem Hydroxo-Eisen-Enzymkomplex zur Hydroxyverbindung kombiniert wird. Nach welchem Mechanismus die Hydroxylierung abläuft, ist wahrscheinlich von dem Oxidationspotential des Substrates abhängig. Für oxidative O-Dealkylierungen besteht im Allgemeinen Übereinstimmung, dass sie über die Abstraktion eines Wasserstoffradikals (Weg a) erfolgen, dennoch werden für O-Demethylierungen in Abhängigkeit vom Substrat auch andere Reaktionsmechanismen diskutiert [25].

Für oxidative N-Dealkylierungen wurden für beide Möglichkeiten entsprechende Nachweise erbracht. Dinnocenzo verglich die kinetischen Deuteriumisotopeneffekte der N-Demethylierung verschiedener Isoenzyme mit denen der Reaktion mit einem tert-Butyloxyradikal [26]. Für Letzteres gilt die Wasserstoffatomabstraktion als Initialschritt als gesichert. In weiteren Studien führte er als Unterscheidungskriterium zwischen beiden Möglichkeiten Isotopeneffektprofile ein und verglich diese in N-Dealkylierungsreaktionen substituierter N,N-Dimethylaniline. Er benutzte als Modell für die H-Abstraktion die Reaktion mit dem tert-Butyloxyradikal und als Modell für den Elektronentransfer ein System aus einem Eisen(III)-phenanthrenkomplex und Pyridin [27]. In beiden Studien zeigten die kinetischen Deuteriumisotopeneffekte bzw. die Isotopeneffektprofile der Reaktion des tert-Butyloxyradikales Übereinstimmung mit den Untersuchungen an isolierten Isoenzymen aus Ratte, Kaninchen und Mensch. Dinnocenzo schlussfolgerte daraus, dass die N-Demethylierung mit einer Wasserstoffatomabstraktion als Initialschritt abläuft.

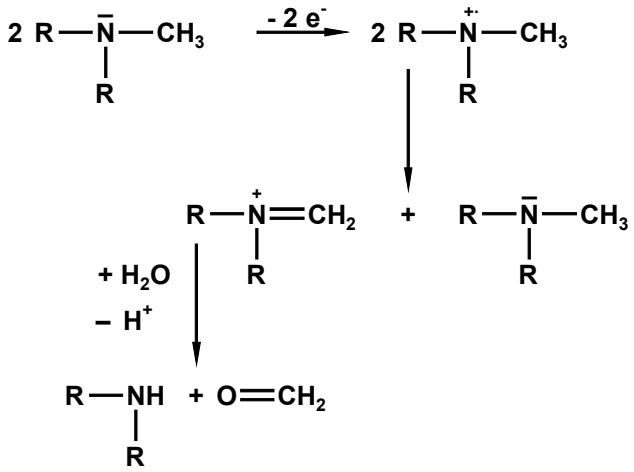


Schema 6: Mechanismen der Bildung der α-Hydroxyverbindungen

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Guengerich. Er begründet seine Schlussfolgerungen mit kinetischen Isotopeneffekten, welche sich für O-Dealkylierungen wesentlich von denen der N-Dealkylierungen unterscheiden; ein Hinweis auf unterschiedliche zugrundeliegende Mechanismen. Ein weiterer Beweis ist der gefundene Zusammenhang der linearen Freie-Enthalpie-Beziehungen nach Hammett oder Marcus mit der Oxidationsrate sowohl in Cytochrom P450 Isoenzym- als auch in porphyrinkatalysierten Oxidationen von Aminen und Thiolen, der aber nicht für Anisole besteht. Die Tatsache, dass 1,4-Dihydropyridin-Hantzsch-Ester und Cyclopropylamine suizidale Inaktivatoren der Cytochrom P450 Isoenzyme sind, wird als mit dem Elektronentransfermechanismus übereinstimmend gesehen [28].

Peroxidasen sind in der Lage, N-Dealkylierungen zu katalysieren. Die Reaktion verläuft über die Bildung des Ammoniumylradikals durch Elektronentransfer. Peroxidasen können zwar

Elektronen aufnehmen, aber keinen Sauerstoff übertragen. Daher dismutieren zwei Ammoniumylradikale zur Ausgangsverbindung und einem Iminium-Ion. Letzteres hydrolysiert zum dealkylierten Amin und dem Aldehyd (oder Keton) (siehe Schema 7). Die als Zwischenprodukt auftretenden Ammoniumylradikale wurden in durch Peroxidase katalysierten Dealkylierungen nachgewiesen. Für Cytochrom P450-vermittelte Dealkylierungen wurde der Nachweis nicht erbracht, was für einen unterschiedlichen Mechanismus der Enzymreaktionen spricht.



Schema 7: Mechanismus der N-Dealkylierung durch Peroxidasen

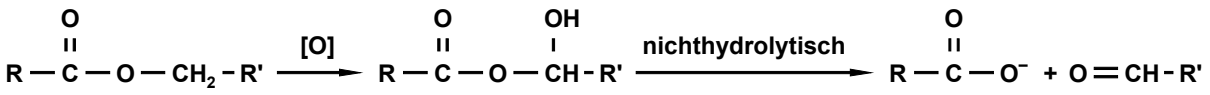
Für die Oxygenierung von Alkanen mit geringen Oxidationspotentialen ist als Initialschritt ein Elektronentransfer denkbar.

Die Bildung stabiler N-Oxide aus tertiären Aminen durch Cytochrom P450 ist nachgewiesen worden, wobei die Reaktion in der Regel durch flavinhaltige Monooxygenasen katalysiert wird. Es wurde gezeigt, dass oxidative N-Dealkylierungen mit einem N-Oxid als Zwischenprodukt möglich sind [29].

Im Weiteren soll auf einige spezielle Reaktionen eingegangen werden, die sich prinzipiell den oben aufgeführten Reaktionen zuordnen lassen, bei denen z. T. jedoch der Mechanismus noch nicht bekannt ist.

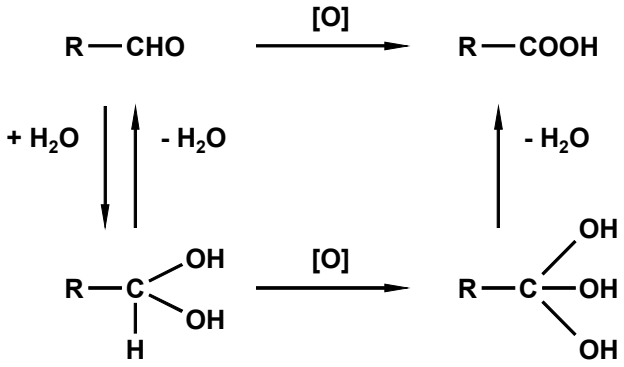
Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass Cytochrom P450 Isoenzyme in der Lage sind, Esterspaltungen zu katalysieren. 1987 gelang Guengerich erstmals der Nachweis oxidativer Esterspaltungen *in vitro* [30] und 1989 *in vivo* [31] für Dihydropyridindicarbonsäurediester. Systematische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus wurden 1995 von Coon und Mitarbeitern durchgeführt [32]. Sie wiesen in ihren Studien nach, dass die oxidative Ester- oder Amidspaltung über die Hydroxylierung des α-C-Atoms der Alkohol- bzw. Aminkomponente

und anschließende nichthydrolytische Spaltung des entstandenen geminalen Hydroxyesters zur Säure und zum Aldehyd abläuft (siehe Schema 8).



Schema 8: Mechanismus der oxidativen Esterspaltung

Cytochrom P450-katalysiert kann die Oxidation eines Aldehyds zur Carbonsäure ablaufen. Diese Reaktion wird in der Regel von Aldehyddehydrogenasen katalysiert. Eine Cytochrom P450-Beteiligung konnte jedoch in einigen Fällen gezeigt werden, so für die Oxidationen von Acetaldehyd, Retinal, aliphatischen Aldehyden, 11-Oxo-tetrahydrocannabinol und Lorsatan [33]. Ob der Oxygenierungsmechanismus über das Hydrat des Aldehyds, welches zur ortho-Säure hydroxyliert wird und unter Wasserabspaltung zur Säure führt, oder über die direkte Hydroxylierung zur Säure abläuft, konnte nicht eindeutig gezeigt werden [34]. Die möglichen Reaktionswege sind in Schema 9 dargestellt.



Schema 9: Mögliche Reaktionswege der Aldehydoxidation

Für oxidative Decarboxylierungen wurde eine Cytochrom P450-Katalyse ebenfalls nachgewiesen. Hirobe untersuchte die Decarboxylierung der Arzneistoffe Ketoprofen, Indometacin und Clofibrinsäure in Rattenlebermikrosomen. Neben den decarboxylierten Metaboliten wies er das entstandene Kohlendioxid nach und konnte die enzymatische Katalyse durch Cytochrom P450 zeigen, da das Fehlen von NADPH im Inkubationsmedium, die Begasung mit Kohlenmonoxid oder die Zugabe eines spezifischen Cytochrom P450-Inhibitors (SKF-525A) die Bildung der Metaboliten verhindert [35].

2.2 Metallporphyrin vermittelte Modelloxygenierungen

Mit den wachsenden Erkenntnissen über Stoffwandlungswege im Organismus begann die Suche nach einfachen biomimetischen Modellen. Zur Nachahmung oxidativer Reaktionen nehmen chemische Modellsysteme mit Katalysatoren auf der Basis von Übergangsmetallen und mit einer Sauerstoffquelle einen festen Platz ein. Als Übergangsmetalle werden vor allem Eisen, Ruthenium, Cobalt, Kupfer, Mangan und Nickel in verschiedenen Oxidationsstufen verwendet. Die Struktur der Katalysatoren ist sehr variabel. In den einfachen Modellen liegen die Metalle als Salz ohne weitere Zusätze im System vor, z. B. Fenton's Reagenz, bestehend aus Fe^{2+} ($FeCl_2$) und Wasserstoffperoxid. Durch Zugabe von Mediatoren lässt sich die katalytische Wirksamkeit modifizieren, beispielsweise durch Catechol oder Hydrochinon bei Fenton's Reagenz [36] oder wie die zahlreichen Untersuchungen von Murahashi mit Modellsystemen auf Rutheniumbasis nachweisen [37]. Eine weitere Möglichkeit der Katalyse besteht im Einsatz von komplex gebundenen Übergangsmetallen. Hier sollen beispielhaft Udenfriend's Reagenz [7], bestehend aus Fe^{2+}, EDTA, Ascorbinsäure und molekularem Sauerstoff, weiterhin Salenkomplexe (Salen = Bis(salicyliden)ethylendiamin) [38], Komplexe mit Schiff'schen Basen [39] und mit Phthalocyaninen [40] genannt werden.
Eine herausragende Bedeutung haben Metallporphyrine auf dem Gebiet der biomimetischen Studien gewonnen. Aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandschaft mit der prosthetischen Gruppe der Monooxygenasen (Protoporphyrin XI) ist eine weitgehende Übereinstimmung der Reaktionsmechanismen und damit der Produktspektren zu erwarten.

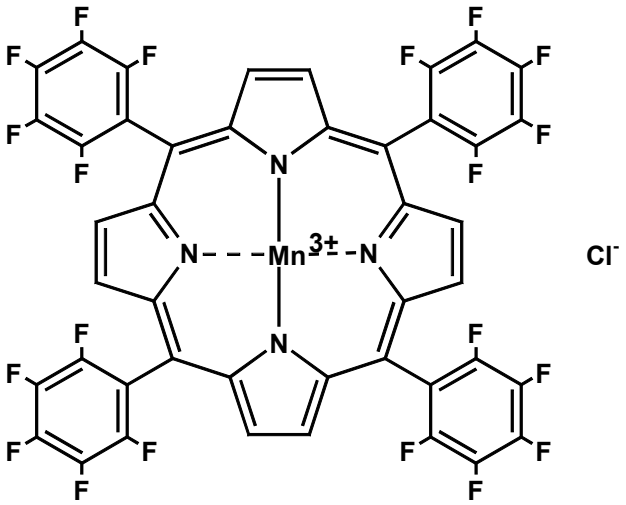


Abbildung 2: Mangan(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)porphyrin chlorid

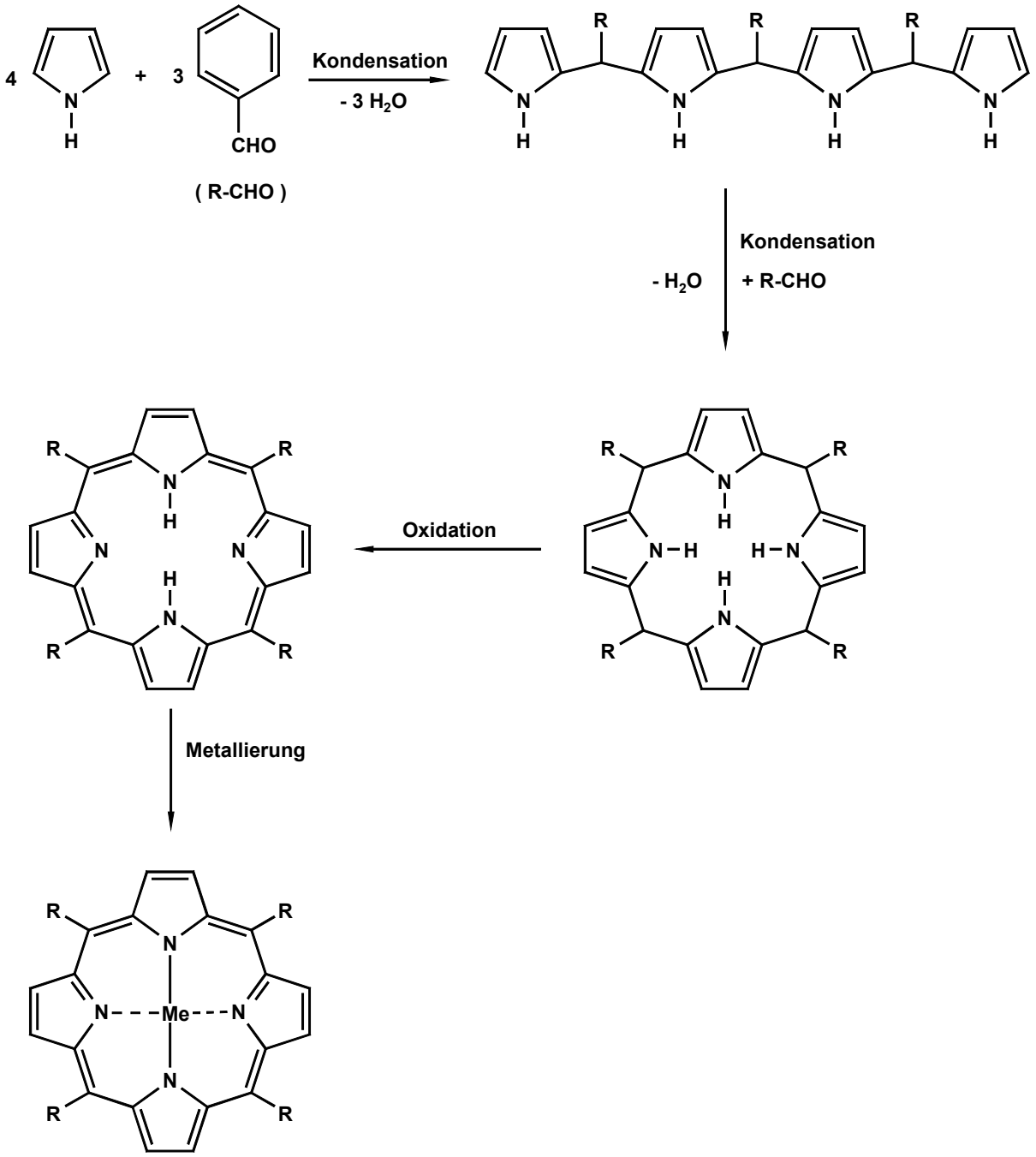
Ausgehend vom Tetraphenylporphyrin als Grundgerüst wurden zahlreiche Strukturvariationen durchgeführt. Die sogenannten Katalysatoren der ersten Generation erhielt man durch Einführung eines Zentralatoms, häufig Eisen oder Mangan, in das Grundgerüst. Sie zeigten jedoch geringe Umsetzungsraten, da sie durch μ-Oxo-Dimerenbildung und geringe Stabilität gegenüber den Sauerstoffdonatoren in ihrer katalytischen Wirksamkeit begrenzt sind. Als effektiver haben sich die Katalysatoren der zweiten Generation erwiesen. Sie sind an den Phenylringen mit Halogen- oder Alkylresten substituiert. Dadurch ist die Stabilität gegenüber den O-Donatoren erhöht und die Dimerenbildung wird durch sterische oder elektronische Effekte verhindert [41]. Zu den am häufigsten angewendeten Vertretern der zweiten Generation gehören die Porphyrine mit Pentafluorphenylringen. In Abbildung 2 ist das Mangan(III) 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorphenyl)porphyrin chlorid (MnTPFPPCl) dargestellt.

Katalysatoren der dritten Generation weisen zusätzlich Substituenten an den β-Pyrrolpositionen auf. Durch Einführung von Sulfonsäureresten an diesen Positionen erhält man wasserlösliche Katalysatoren. Neue Entwicklungen führten zu chiralen Metallporphyrinen und zu an Trägermaterialien (Kieselgel, Zeolithe u. Ä.) fixierten Katalysatoren [42].

Die Synthese der verschiedenen Porphyrinderivate geht auf die Arbeiten von Adler zurück, dessen Methode vor allem durch Lindsey weiterentwickelt wurde. Die schrittweise Kondensation von Benzaldehyd mit Pyrrol führt über das lineare Tetrapyrrol-Zwischenprodukt zum Porphyrinogen, anschließende Oxidation, beispielsweise mit Tetrachlor-1,4-benzochinon (p-Chloranil), generiert das Porphyrin (siehe Schema 10). Durch die Wahl der entsprechend substituierten Benzaldehyde lassen sich die Porphyrine der zweiten Generation im Allgemeinen synthetisieren. Die Substituenten an den β-Pyrrolpositionen werden am Porphyringrundgerüst eingeführt. Die Einführung des Zentralatoms erfolgt durch Erhitzen am Rückfluss mit den entsprechenden Me^{2+}-Salzen, wobei Fe^{2+} und Mn^{2+} zu den dreiwertigen Verbindungen oxidiert werden [43].

Die katalytische Aktivität der Metallporphyrine ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, von denen einige im Folgenden erläutert werden. Die Bildung inaktiver μ-Oxo-Dimere ist durch die Einführung elektronenziehender Substituenten verhinderbar, verstärkt durch eine zusätzliche sterische Behinderung. Mit zunehmendem Substitutionsgrad (1.→ 2.→ 3. Generation) fehlen auch die Angriffspunkte für die Autoxidation, welche zur Zerstörung des Porphyrins durch den O-Donator führt. Zusätzlich erhöhen elektronenziehende Gruppen die Elektrophilie und damit die Reaktivität des Katalysators. Zunehmender Substitutionsgrad führt nicht immer zu verbesserter Katalyse. Weitere Einflussfaktoren sind das Substitutions-

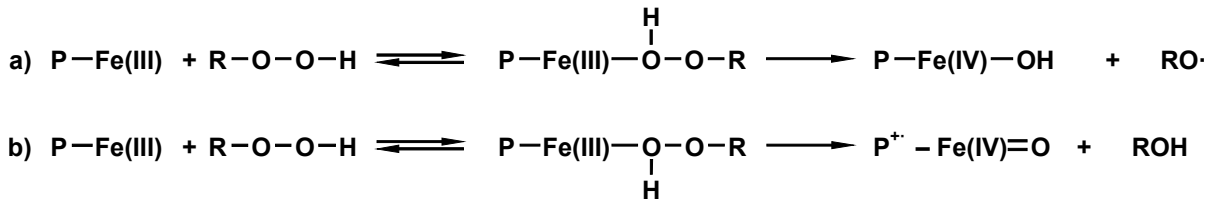
muster und das Zentralatom des Katalysators, der verwendete Co-Katalysator, das Reaktionsmedium (Lösungsmittel, pH-Wert), der verwendete Sauerstoffdonator und auch das Substrat selbst. Die zahlreichen Untersuchungen der Einflussfaktoren führten zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen und sollen im Folgenden exemplarisch dargestellt werden.



Schema 10: Allgemeines Syntheseschema für Metallporphyrine

Groves zeigte, dass das Mangan tetrakis[2-(N-methyl)pyridinyl]porphyrin mit verschiedenen O-Donatoren zu einer stabileren Oxo-Spezies als das Mangan tetrakis[4-(N-methyl)-

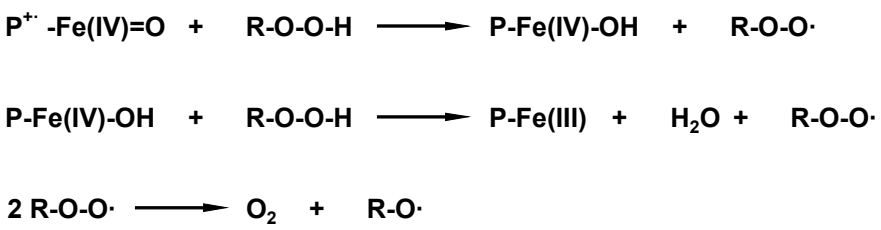
pyridinyl]porphyrin reagiert und die nachfolgenden Reaktionen mit Ersterem langsamer ablaufen [44]. Bruice fand für Manganporphyrine mit zunehmenden elektronenschiebenden Gruppen bei Alkenepoxidierungen eine vermehrte Umsetzung der trans-Alkene, d. h. eine erhöhte Stereoselektivität. Mit Eisen- und Chromporphyrinen wurden bevorzugt die cis-Alkene umgesetzt [45]. In Untersuchungen mit verschiedenen Manganporphyrinen und Toluen als Substrat zeigte sich, dass mit verstärkt elektronenziehenden Gruppen im Porphyringerüst die Reaktionen am Aromaten zu- und Seitenkettenoxidationen abnehmen [46]. Es wurden auch elektronenarme und -reiche Eisenporphyrine miteinander verglichen. Erstere waren zwar robuster als Letztere, aber nicht in der Lage, elektronenarme Olefine zu epoxidieren [47]. Ähnliche Aussagen lassen sich beim Vergleich von Porphyrinen der zweiten und der dritten Generation treffen. Für Eisenporphyrine zeigen die der dritten Generation oft eine schlechtere Katalyse hinsichtlich Gesamtausbeute und Umsetzungen pro Zeiteinheit. Für Manganporphyrine zeigen die Katalysatoren der dritten Generation im Allgemeinen eine höhere Ausbeute, aber unter verminderter Regioselektivität [48][49]. In Untersuchungen zum Metabolismus von Dieldrin konnten jedoch nur mit den Mangan- und Eisenporphyrinen der dritten Generation die Biotransformation nachgeahmt werden. Katalysatoren der zweiten Generation zeigten weder mit Mangan noch mit Eisen als Zentralatom eine Aktivität [50]. Den Einfluss des Substrates wies Meunier nach. Die Umsetzungen von Paracetamol und Ellipticin zeigten eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Katalysatorstruktur. Die Umsetzungsrate von Paracetamol sinkt mit dem Übergang von einem Porphyrin der ersten zur zweiten Generation, bei Ellipticin steigt die katalytische Reaktivität. Als Ursache werden bisher nicht vorhersagbare Substrat-Katalysator-Interaktionen auf elektronischer oder sterischer Basis angesehen [51].



Schema 11: Homolytische (a) und heterolytische (b) O-O-Bindungsspaltung

Eine wichtige Rolle in den ablaufenden Reaktionen spielt der Sauerstoffdonator. Während O-Donatoren mit nur einem reaktiven Sauerstoffatom wie Iodosylbenzen und Verwandte, Natriumhypochlorit und N-Oxide direkt zur reaktiven Spezies führen, ist für Peroxide, Persäuren und molekularen Sauerstoff die Spaltung der O-O-Bindung notwendig. Diese Bin-

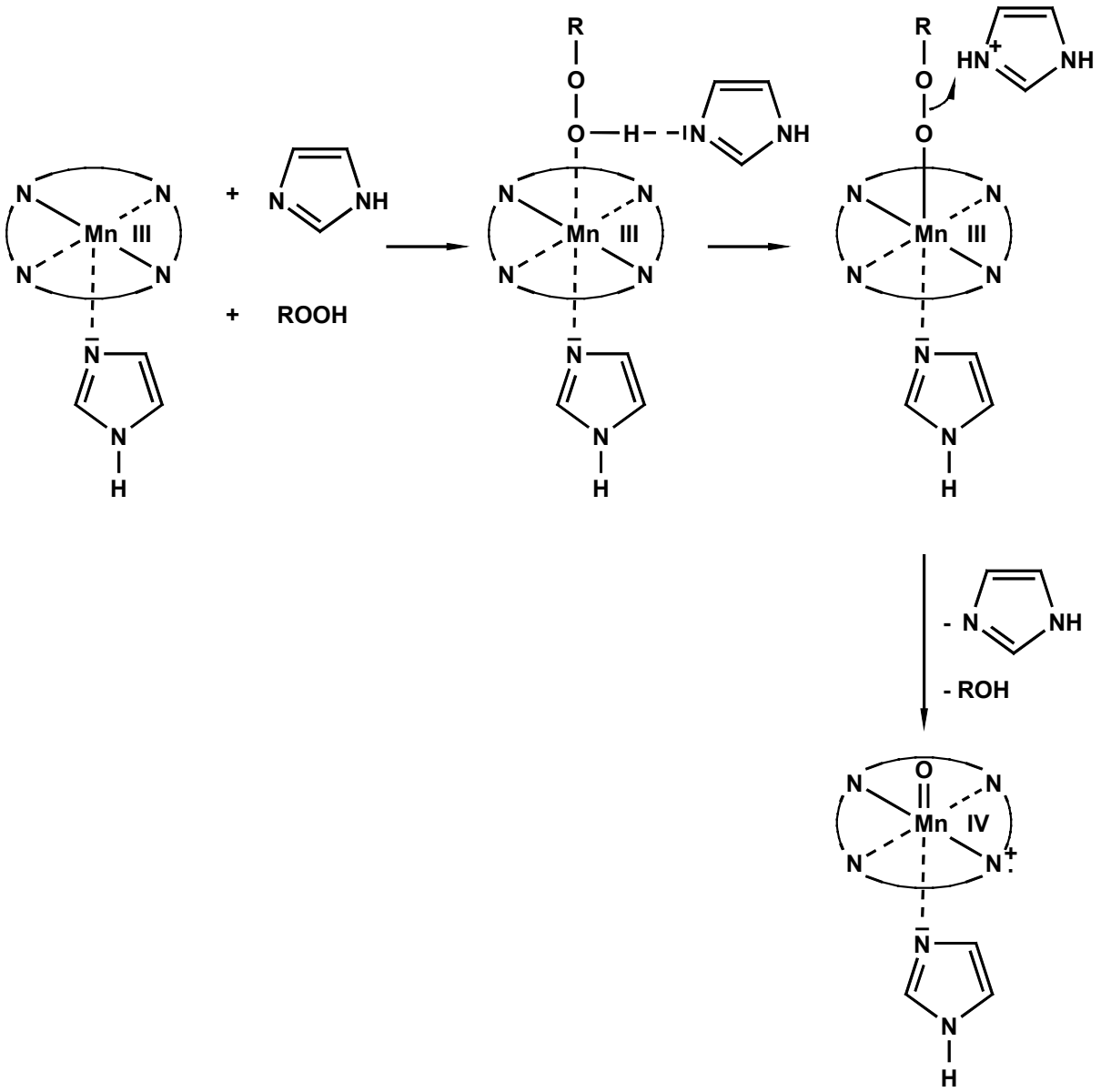
dungsspaltung kann homolytisch oder heterolytisch erfolgen (siehe Schema 11), wobei Letzteres wahrscheinlich in Übereinstimmung zum natürlichen Katalysezyklus steht.
Die homolytische Spaltung führt zu Alkoxylradikalen, im Falle von Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen, welche unerwünschte, Fenton-ähnliche Reaktionen zeigen. Für Persäuren wird allgemein aufgrund der bevorzugten Abgangsgruppe RCOOH die Heterolyse angenommen. Für Peroxide gilt dies mit steigenden pK_a-Werten der Abgangsgruppe ROH, dabei ist ein Übergang von homolytischer zu heterolytischer Spaltung denkbar [52]. Die Art der Bindungsspaltung ist auch von dem Substitutionsmuster des Porphyrinkatalysators und dem Lösungsmittel abhängig. In Untersuchungen zur Epoxidierung von Norbornylen und α-Methylstyren zeigte sich, dass in Dichlormethan die Reaktionen mit Eisen(III) 5,10,15,20-tetramesitylporphyrin über eine heterolytische Bindungsspaltung der Persäure, unabhängig von der verwendeten Persäure, ablaufen. Mit Eisen(III) 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichlorphenyl)porphyrin ist die Spaltung von der Struktur der Persäure abhängig, neben der heterolytischen wird auch die homolytische Bindungsspaltung beobachtet. In Toluen ist die Art der Spaltung für beide Eisenporphyrine von der Struktur der Persäure abhängig [53]. Traylor wies nach, dass die beobachteten Alkoxylradikale auch durch die Reaktion der nach heterolytischer Bindungsspaltung gebildeten reaktiven Spezies mit noch nicht umgesetzten Alkylperoxiden gebildet werden können (siehe Schema 12) [54].



Schema 12: Bildung von Alkoxylradikalen aus Alkylperoxiden durch die reaktive Spezies

Die heterolytische Bindungsspaltung von Peroxiden und Persäuren lässt sich durch die Verwendung sogenannter Co-Katalysatoren erreichen. Dies sind Stickstoffbasen wie Imidazolderivate oder Pyridin, welche als fünfter Axialligand fungieren. Im natürlichen Cytochrom P450 fungiert als fünfter Ligand das Thiolat eines Cysteinrestes. Thiolate sind jedoch sehr oxidationsempfindlich und daher in den biomimetischen Modellsystemen schwer zu realisieren. Hirobe gelang die Synthese eines Porphyrins mit integriertem, relativ oxidationsstabilem Thiolatrest, welches gegenüber dem Imidazol-komplexierten Porphyrinderivat eine erhöhte Aktivität aufwies [4]. In den meisten biomimetischen Modellsystemen werden jedoch weiter-

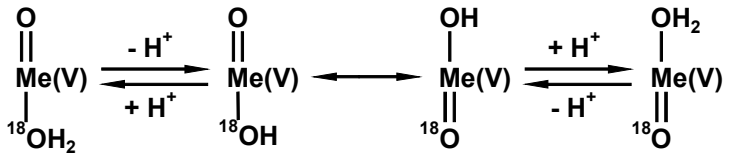
hin Imidazolderivate oder Pyridin eingesetzt. Die Stickstoffbase übernimmt mehrere Aufgaben im katalytischen System. Zum Einen erhöht sie die Elektronendichte am Zentralatom und fördert dadurch die heterolytische Bindungsspaltung. Zum Anderen fungiert sie als Säure-Basen-Katalysator, der den Austritt von Wasser oder Alkohol und damit die Bildung der aktiven Spezies fördert (siehe Schema 13) [55]. Dies führt zu wesentlich erhöhten Umsetzungsraten.



Schema 13: Mechanismen der Katalyse durch Co-Katalysatoren am Beispiel von Imidazol

Der Zusatz von Stickstoffbasen fördert auch Umsetzungen mit Iodosylbenzen [56].
Die Reaktivität des Katalysators im wässrigen Milieu in Abhängigkeit von dem Zentralatom, dem pH-Wert und dem Zusatz eines Co-Katalysators wurde sehr umfangreich im Arbeitskreis von Bruice untersucht. Sowohl Eisen- als auch Manganporphyrine liegen als sechsfach koor-

dinierte Komplexe vor, wobei die fünfte und sechste Koordinationsstelle in Abhängigkeit vom pH-Wert von zwei Wassermolekülen oder einem Wassermolekül und einer Hydroxylgruppe besetzt werden. Die Koordinierung von zwei Hydroxylgruppen konnte im pH-Bereich bis 14 ausgeschlossen werden [57][58]. Die im wässrigen Milieu gebildeten aktiven Spezies sind ebenfalls mit einem Wassermolekül oder einer Hydroxylgruppe koordiniert und zeigen eine Oxo-Hydroxo-Tautomerie, wie in Experimenten mit ^{18}O-angereichertem Wasser nachgewiesen wurde (siehe Schema 14) [59].



Schema 14: Oxo-Hydroxo-Tautomerie

Generell steigt die Reaktivität des Katalysators mit steigendem pH-Wert. Bei pH-Werten kleiner 5 ist die Bildung der aktiven Spezies aus dem Katalysator und Wasserstoffperoxid oder Hydroperoxiden langsamer als der Zerfall oder der Abbau der O-Donatoren. Die Koordinierung einer Stickstoffbase als Co-Katalysator kann zu einer weiteren Erhöhung der katalytischen Aktivität führen. Voraussetzung ist die Koordinierung nur eines stickstoffhaltigen Moleküls, da Wasserstoffperoxid und andere Hydroperoxide die Stickstoffbase nicht aus der Koordination verdrängen können. In Untersuchungen zur Komplexierung von Imidazol mit verschiedenen Mangan- oder Eisenporphyrinen bei verschiedenen pH-Werten im pH-Bereich von 5 – 12 zeigte sich, dass Manganporphyrine nur Monoliganden mit Imidazol bilden. Eisenporphyrine koordinieren auch bei niedrigen Imidazolkonzentrationen zwei Moleküle. Im wässrigen Milieu lässt sich daher nur bei Manganporphyrinen mit einem Zusatz von Imidazol als Co-Katalysator die Reaktivität steigern [60][61].

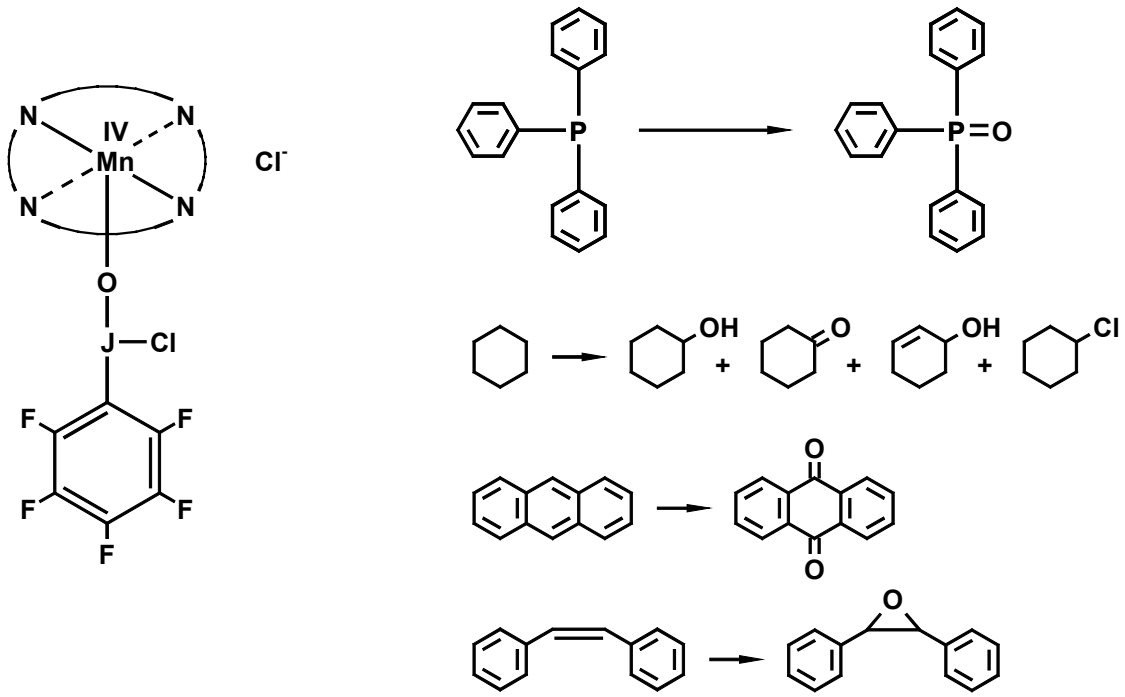
Bei Vorhandensein von Methanol im Lösungsmittelgemisch ist auch die Koordination eines Methanolmoleküls über die Alkoholgruppe möglich [62].

Groves gelang erstmals die Isolierung und Charakterisierung einer reaktiven Spezies. Bei einer Temperatur von – 78 °C isolierte er ein grünes Intermediat der Reaktion von Fe(III)TMPCl und p-Chlorperbenzoesäure in Dichlormethan, welches in der Lage ist Alkane zu oxygenieren. Es handelte sich um ein Oxo-Eisen(IV)-tetramesitylporphyrinkationradikal ($TMP^{+\cdot}$-Fe(IV)=O), in Übereinstimmung mit der Struktur der aktiven Verbindung I der Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase I, HRP I). Bei – 46 °C ließ sich die Bildung der grünen Verbindung verfolgen. Sie verläuft über einen intermediären Alkylperoxo-

Eisen(III)porphyrinkomplex, aus dem nach heterolytischer O-O-Bindungsspaltung die aktive Spezies entsteht [63][64]. Die Reaktion mit Iodosylbenzen führt zu einem roten Intermediat, welches formal den gleichen Oxidationsstatus hat, aber wahrscheinlich eine Oxo-Eisen(V)verbindung darstellt. Sie konnte durch Oxidation in das grüne Oxo-Eisen(IV)porphyrinkationradikal übergeführt werden [65]. In späteren Studien wurden eine Reihe weiterer Oxo-Eisenporphyrinkationradikale mit verschieden substituierten Porphyrinen und mit anderen Sauerstoffdonatoren realisiert und spektroskopisch charakterisiert (NMR-, UV/VIS-, Raman-, IR-, ESR-, Mössbauer-Spektroskopie) [66]. Die katalytischen Aktivitäten der möglichen aktiven Spezies sind verschieden, wobei „aktive Spezies“ bedeutet, dass es sich um eine hochvalente Spezies handelt. Der Katalysator befindet sich in einem höherem als dem Grundzustand. Für elektrochemisch generiertes TSMP-Fe(IV)=O ist die Katalyse der Bildung eines Cyclopentenonderivates aus einem Cyclopentenderivat, in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff, nachgewiesen. Die Porphyrinspezies überträgt dabei jedoch kein Sauerstoffatom, sondern katalysiert die Wasserstoffradikalabstraktion. Zur Übertragung eines Sauerstoffatoms befähigt sind zwei weitere elektrochemisch dargestellte Verbindungen; $TSMP^{+\cdot}$-Fe(IV)=O und $TSMP^{2+}$-Fe(IV)=O. Sie katalysieren in Abwesenheit von Sauerstoff neben der Hydroxylierung auch die Epoxidierung [67]. Ebenfalls katalytisch aktiv in Abhängigkeit vom Substrat sind Peroxo-Eisen(III)porphyrinverbindungen [P-Fe(III)-$(O_2)^-$]. Die Oxidation von Triphenylphosphin gelingt nur in geringem Umfang, die Epoxidierung elektronenarmer Olefine ist mit hohen Ausbeuten möglich, die Epoxidierung elektronenreicher Olefine wird nicht katalysiert [68]. Die Peroxo-Eisen(III)-Komplexe wurden für verschiedene Porphyrine und mit unterschiedlichen Liganden spektroskopisch charakterisiert [69].

Aktive Manganporphyrinspezies wurden ebenfalls untersucht. Oxo-Mangan(IV)porphyrine lassen sich mit Persäuren, Natriumhypochlorit oder elektrochemisch darstellen und spektroskopisch charakterisieren [70]. Im Gegensatz zu den Oxo-Eisen(IV)porphyrinen können sie die Oxidation verschiedener organischer Substrate katalysieren. Groves gelang die Charakterisierung eines Oxo-Mangan(V)porphyrins (P-Mn(V)=O) durch Reaktion des entsprechenden Mangan(III)porphyrins mit Kaliumperoxomonosulfat, m-Chlorperbenzoesäure oder Hypochlorit in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 7,4 oder höher. Durch Zugabe von Natriumnitrit wurde das Oxo-Mangan(IV)porphyrinderivat (P-Mn(IV)=O) gebildet. Im Vergleich der Reaktionen der P-Mn(V)=O und P-Mn(IV)=O katalysierten beide Spezies die Wasserstoffatomabstraktion von 4-Hydroxyphenylessigsäure, aber nur P-Mn(V)=O ist zur Epoxidierung von Carbamazepin fähig [71]. Der durch Reaktion von MnTDCPPCl und Pentafluoriodosylbenzen entstehende Komplex Mn(IV)TDCPP(C_6F_5IOCl)Cl konnte als kristalline, blaue

Verbindung isoliert werden. Er katalysiert die Oxidation von Triphenylphosphin, Cyclohexan und Anthracen und die Epoxidierung von Stilben [72], wobei die Reaktionen den Funktionalisierungsreaktionen Heteroatomoxidation, Oxidation nichtaktivierter Kohlenwasserstoffe, aromatische Oxygenierung und Epoxidierung olefinischer Doppelbindungen entsprechen (siehe Schema 15).

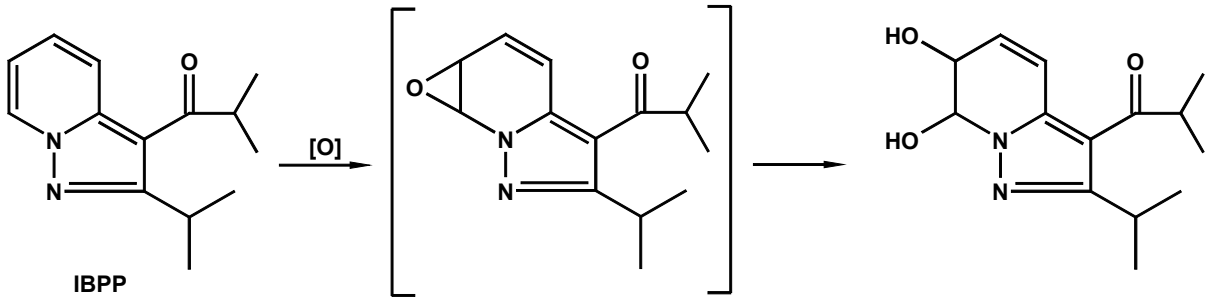


Schema 15: Aktive Manganporphyrinspezies und katalysierte Reaktionen (nach [72])

Mit aktiven Metallporphyrinen gelang die Nachahmung der meisten Cytochrom P450-vermittelten Reaktionen, zum großen Teil mit übereinstimmenden Reaktionsmechanismen. Sie sind in der Lage, Olefine stereospezifisch zu epoxidieren, Kohlenwasserstoffe zu hydroxylieren [9][10], wobei als Initialschritt eine Wasserstoffatomabstraktion erfolgt, Aromaten regiospezifisch zu oxygenieren [11] und Heteroatome zu dealkylieren oder zu oxidieren. Für N-Dealkylierungen werden in Übereinstimmung mit der enzymatischen Reaktion ein Elektronentransfer oder die Abstraktion eines Wasserstoffradikals als initialer Reaktionsschritt diskutiert [73][74][75]. Es gelang auch die Katalyse einer Reihe weiterer Reaktionen, für die die enzymatische Bildung durch Cytochrom P450 bereits nachgewiesen wurden, wie die oxidative Decarboxylierung [76], die Dehydration von Aldoximen [77], oxidative C-C-Bindungsspaltung [78], die Dealkylierung von N-Nitrosodialkylaminen [79] und die Hydroxylactonisierung ungesättigter Carbonsäuren [80].

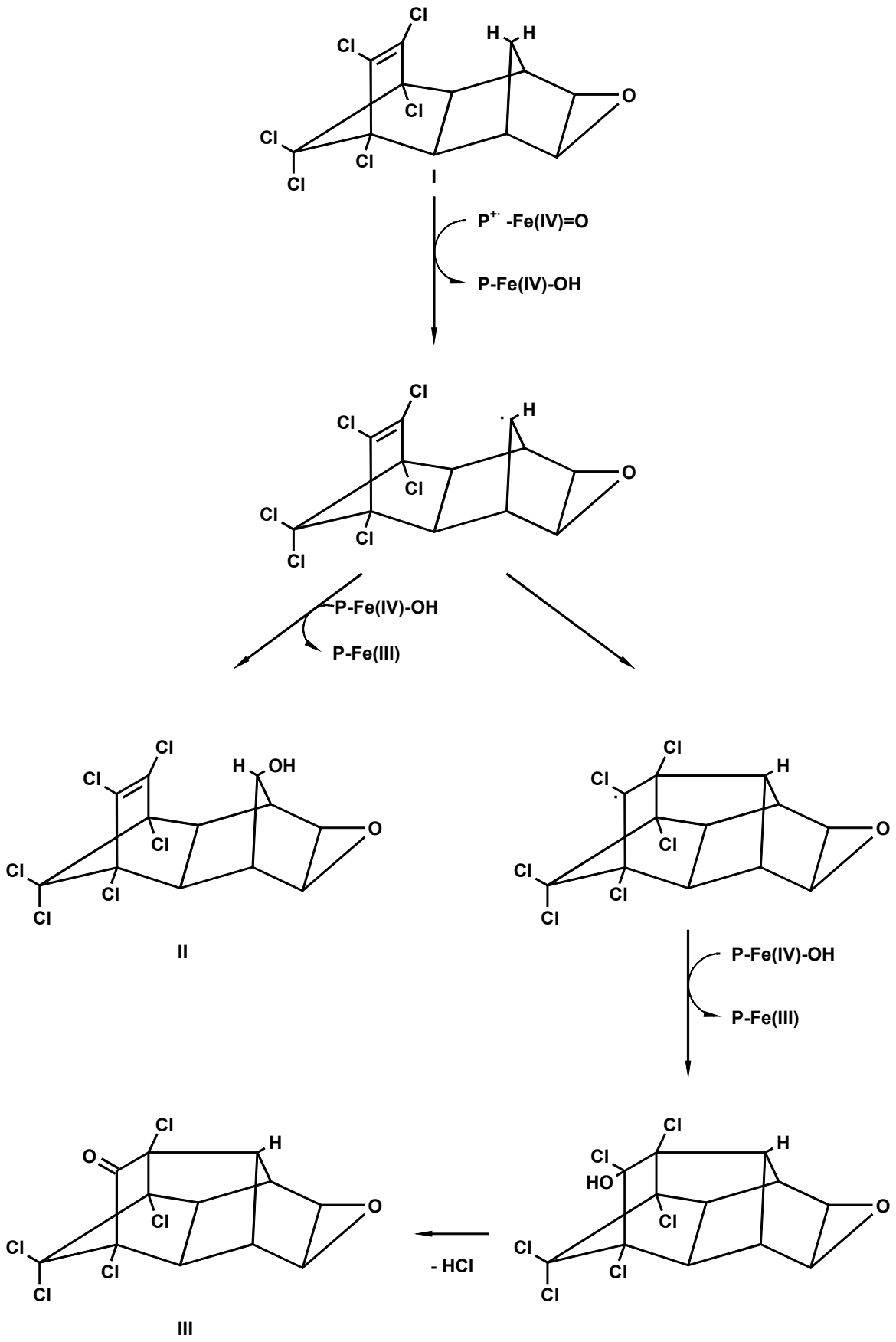
Metallporphyrine werden auch als Katalysatoren in Modellsystemen Cytochrom P450-ähnlicher Enzyme wie Meerrettichperoxidase [81], Chlorperoxidase [82], Ligninperoxidase [83], Tryptophan-2,3-dioxygenase [84] oder NO-Synthase [85] angewendet. Die Modellsysteme dienen zur Produktion von Metaboliten oder Derivaten der Substrate, zur Erkenntnisgewinnung zum Mechanismus von Biotransformationsreaktionen, zum Screening möglicher Metabolite von potentiellen Arzneistoffen oder toxisch wirksamer Stoffe, oder zur Detektion von Chemikalien in der Umweltanalytik [86]. Einige Beispiele zur Anwendung von biomimetischen Systemen auf Metallporphyrinbasis in Metabolismusstudien sollen im Folgenden dargestellt werden.

Als einer der Ersten wies Hirobe die Eignung biomimetischer Systeme zur Erforschung von metabolischen Vorgängen nach. Mit dem Modell MnTPPCl/Natriumhypochlorit/4‘-Imidazolylacetophenon gelang ihm die Darstellung des relativ instabilen 6,7-Epoxids von 3-Isobutyryl-2-isopropylpyrazolo[2,3-a]pyridin (IBPP), welches als Vorstufe des Hauptmetaboliten *in vivo* und *in vitro*, des 6,7-Dihydro-6,7-diols, angesehen wurde (siehe Schema 16). Die Synthese auf klassisch chemischen Wegen mit Wasserstoffperoxid, Natriumhypochlorit oder m-Chlorperbenzoesäure gelang nicht. Weitere Studien führten zu übereinstimmenden Produktspektren der Umsetzungen von IBPP in biomimetischen Systemen und *in vitro* mit Human- und Rattenlebermikrosomen [87][88].



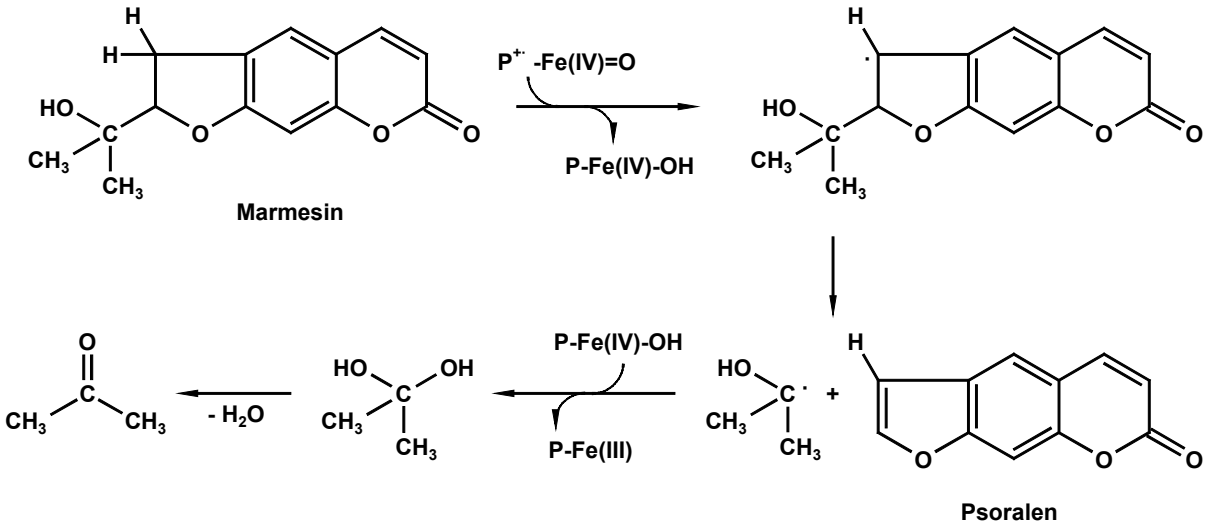
Schema 16: Hauptbiotransformationsweg von IBPP *in vivo*

Der mechanistische Zusammenhang zweier Metabolite (**II**, **III**) von Dieldrin (**I**), einem in zahlreichen Ländern mittlerweile verbotenem Insektizid, wurde mit verschiedenen chemischen Modellsystemen mit Eisen- und Manganporphyrinen der dritten Generation bewiesen (siehe Schema 17). Die initiale Wasserstoffatomabstraktion am C9 führt zum Substratradikal, aus welchem nach Rücktransfer des Hydroxylradikals 9-Hydroxydieldrin (**II**) entsteht. Durch Umlagerung des C9-Radikals zum stabileren tertiären Radikal am C2 und nachfolgendem Rebound entsteht unter Dehalogenierung der Metabolit **III** [50].



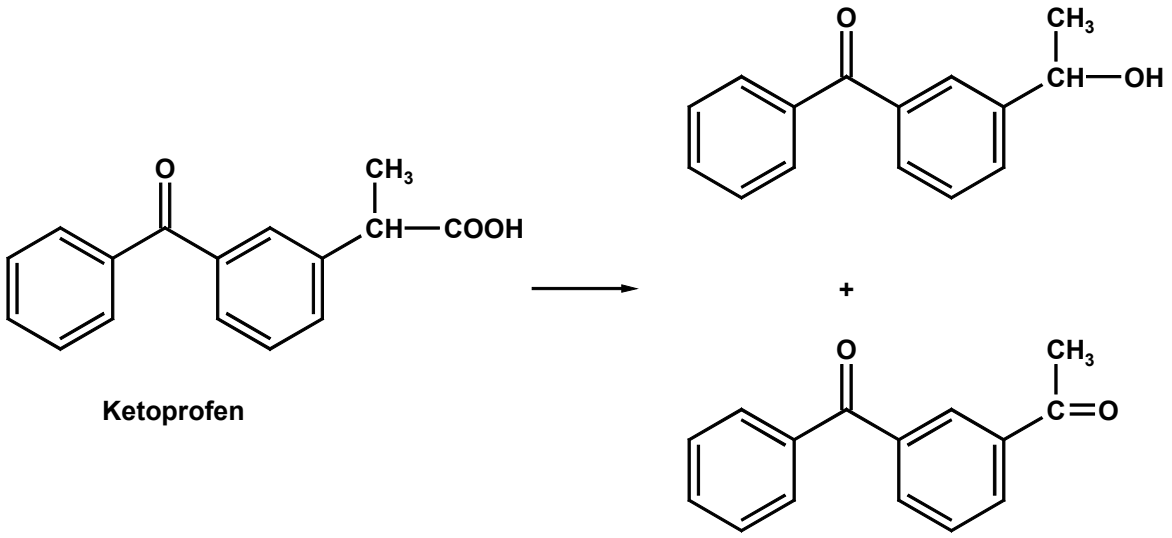
Schema 17 : Bildung der Metabolite II und III aus Dieldrin (I)

Der Nachweis der Dealkylierung von Marmesin zu Psoralen als syn-Eliminierung unter Abspaltung von Aceton (siehe Schema 18) wurde mit Hilfe der biomimetischen Systeme Mn- und FeTPPCl/Iodosylbenzen vollzogen. Dieser Schritt wird im Sekundärstoffwechsel durch die Psoralen-Synthase, ein Cytochrom P450-Enzym, katalysiert. Zunächst wird ein Wasserstoffatom in 3'-Stellung abstrahiert. Durch β-Spaltung entstehen Psoralen und das 2-Hydroxy-2-propylradikal. Aus Letzterem resultiert nach einem Oxygenrebound und Wasserabspaltung Aceton. Der beschriebene Reaktionsablauf ist wahrscheinlich noch für weitere, bisher unverstandene, Ringspaltungen zu Secoverbindungen repräsentativ [89].



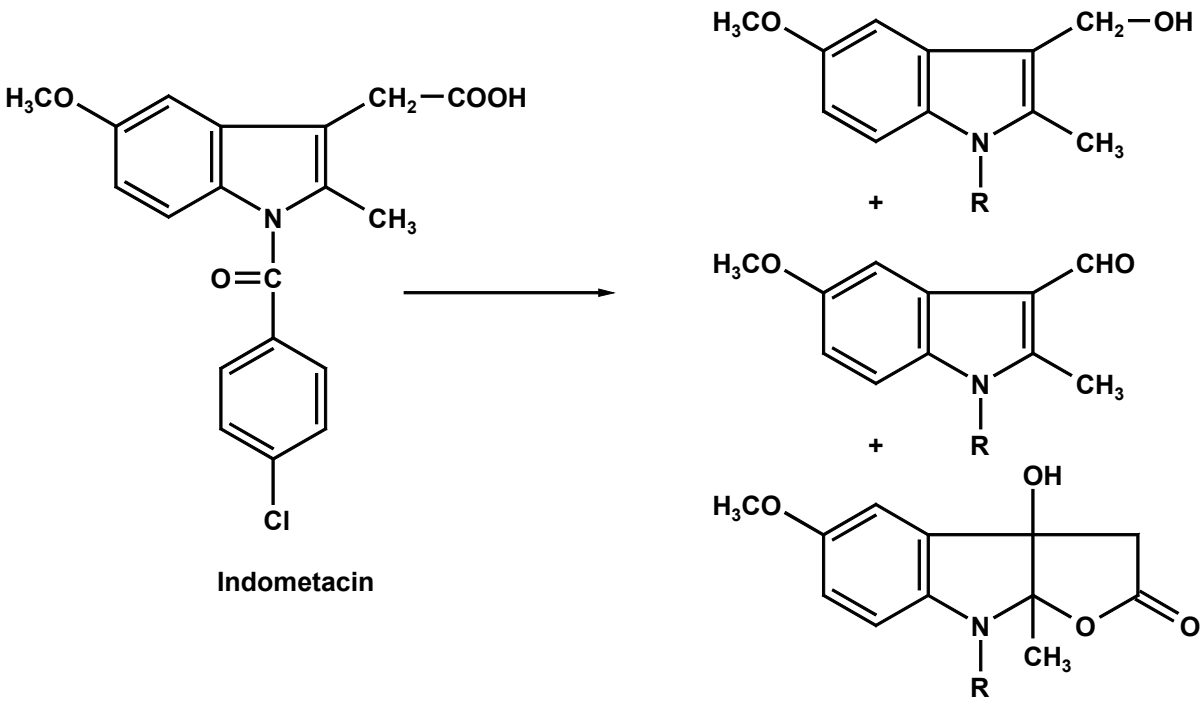
Schema 18: Mechanismus der Bildung von Psoralen aus Marmesin

Das System FeTPFPPCl/Iodosylbenzen katalysiert die oxidative Decarboxylierung von α-Arylsäuren und α,α,α-trisubstituierten Essigsäuren [90]. Neben Kohlendioxid entstehen die entsprechenden Alkohole oder Carbonyle. Ketoprofen wird biomimetisch und *in vivo* zum Alkohol und zum Keton decarboxyliert (siehe Schema 19). Die Metabolite werden von Ratten biliär ausgeschieden. Der gebildete Alkohol zeigt eine signifikante Hemmung der Plättchenaggregation. Der IC_{50}-Wert ist dem von Indometacin vergleichbar. Das gebildete Keton zeigt nur eine leichte Hemmung der Plättchenaggregation. Für beide Metabolite wurde eine Inhibition der Cyclooxygenase nachgewiesen. Indometacin decarboxyliert unter den gleichen biomimetischen Bedingungen zum Alkohol und Aldehyd. Ein neuer Biotransformationsweg wurde bei Umsetzungen mit FeTDClPPCl/Iodosylbenzen entdeckt. Die γ,δ-ungesättigte Carbonsäure wird dabei zum β-Hydroxy-γ-lacton umgewandelt (siehe Schema 20).



Schema 19: Oxidative Decarboxylierung von Ketoprofen

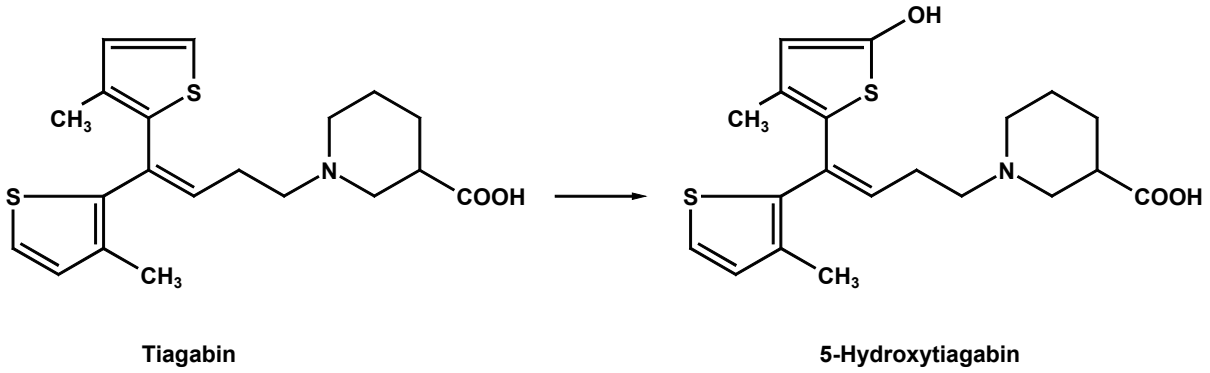
Alle drei Indometacinderivate wurden in Rattenlebermikrosomenansätzen als Metabolite detektiert. Der Alkohol zeigt in Analogie zum Ketoprofenmetaboliten eine Hemmung der Plättchenaggregation und inhibiert die Cyclooxygenaseaktivität. Die Bildung der beschriebenen Indometacinmetaboliten ist Cytochrom P450-abhängig, wie durch die Hemmung der Metabolitenbildung durch Kohlenmonoxidbegasung und durch den Cytochrom P450-spezifischen Inhibitor SKF 525 A gezeigt wurde.



Schema 20: Oxidative Decarboxylierung und Hydroxylactonisierung von Indometacin

Eine Reihe weiterer β,γ- und γ,δ-ungesättigter Verbindungen unterlagen im biomimetischen System der Hydroxylactonisierung [35][80].

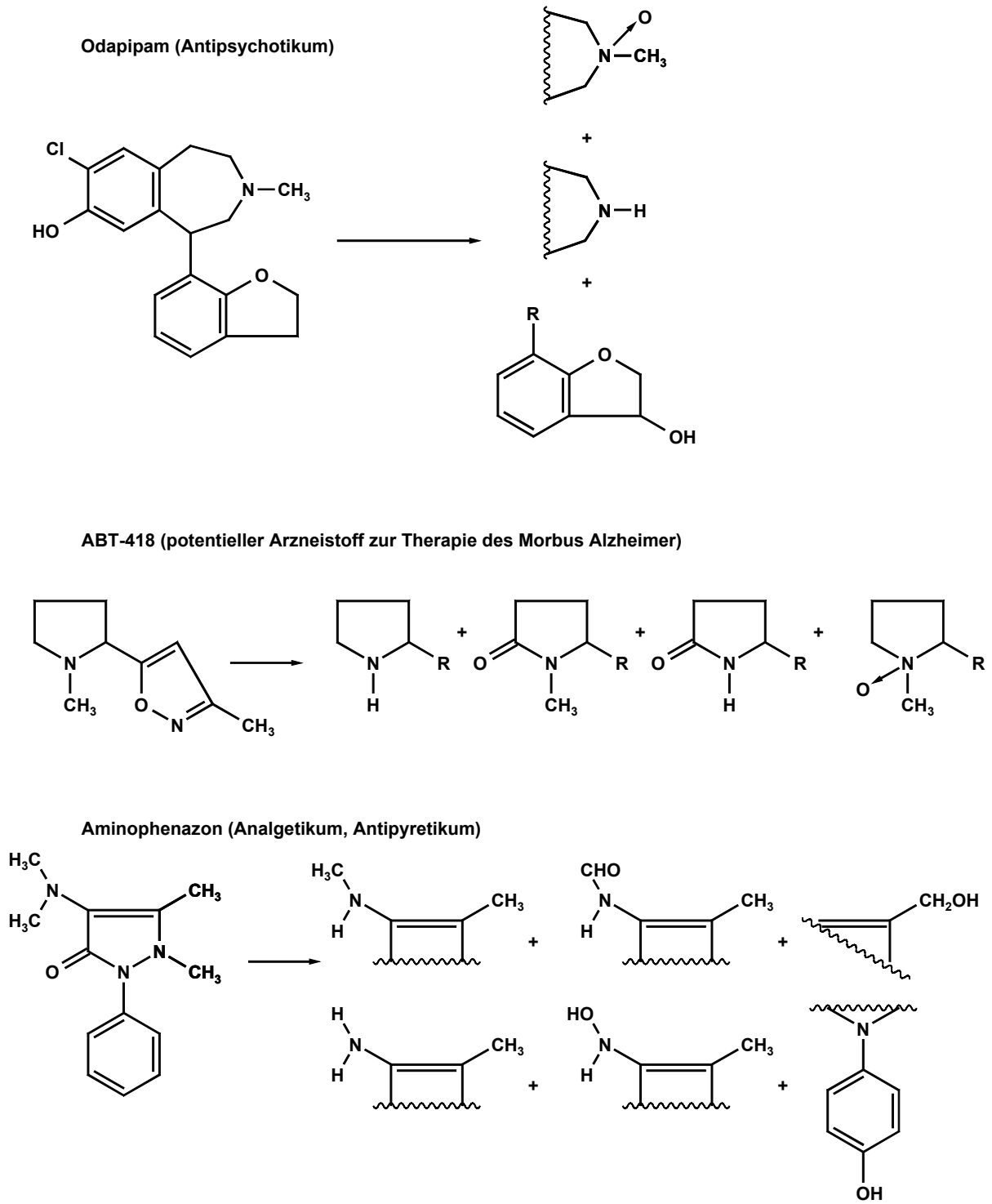
Metabolische Vorgänge führen nicht in jedem Fall zu unwirksameren Derivaten. Die Cytochrom P450 Isoenzyme spielen eine wichtige Rolle in der Umwandlung von Promutagenen zu Mutagenen. Dabei entstehen hochreaktive, elektrophile Intermediate, die mit nucleophilen Zentren der DNA und von Proteinen reagieren. In einer Mutagenitätsstudie wurde daher die Eignung biomimetischer Systeme als Testsysteme für das Screening von Substanzen überprüft. In ihren Strukturen unterschiedliche, bekannte Promutagene wurden mit FeTPPCl und verschiedenen Sauerstoffdonatoren umgesetzt und ihre Aktivierung mit dem Ames-Test untersucht. In Abhängigkeit vom verwendeten O-Donator ließen sich die Promutagene aktivieren. Iodosylbenzen aktivierte vor allem polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe. Aromatische Amine wurden eher von tert-Butylhydroperoxid umgewandelt. Ein heterozyklisches Amin wurde mit allen Sauerstoffquellen aktiviert, die höchste Mutagenität wurde mit Cumylhydroperoxid erzielt. Nicht mutagenisiert wurden die umstrittenen Carcinogene Pyren und Quercetin. Biomimetische Systeme könnten somit in Kurzzeittests für erste Aussagen über mutagene Potentiale angewendet werden [91].



Schema 21: Biomimetische Synthese von 5-Hydroxytiagabin

Routinemäßig angewendet werden biomimetische Modellsysteme in den Forschungslaboratorien der pharmazeutischen Industrie, z. B. bei Novo Nordisk und Abbott. Die Zielstellung ist die Produktion ausreichender Mengen an potentiellen Metaboliten für biochemische und toxikologische Studien, die Testung der möglichen Bildung biologisch aktiver Metabolite von potentiellen Arzneistoffen und die einfache Synthese von Vergleichssubstanzen. Zahlreiche Untersuchungen wurden veröffentlicht. Tiagabin, ein in Phase III der klinischen Prüfung sich befindendes, potentielles Antiepileptikum, wird *in vivo* zum 5-Hydroxytiagabin umgewandelt. Eine mögliche Synthese verläuft über acht Stufen. Mit $FeTDCPBr_8PCl$ und Natriumhypochlo-

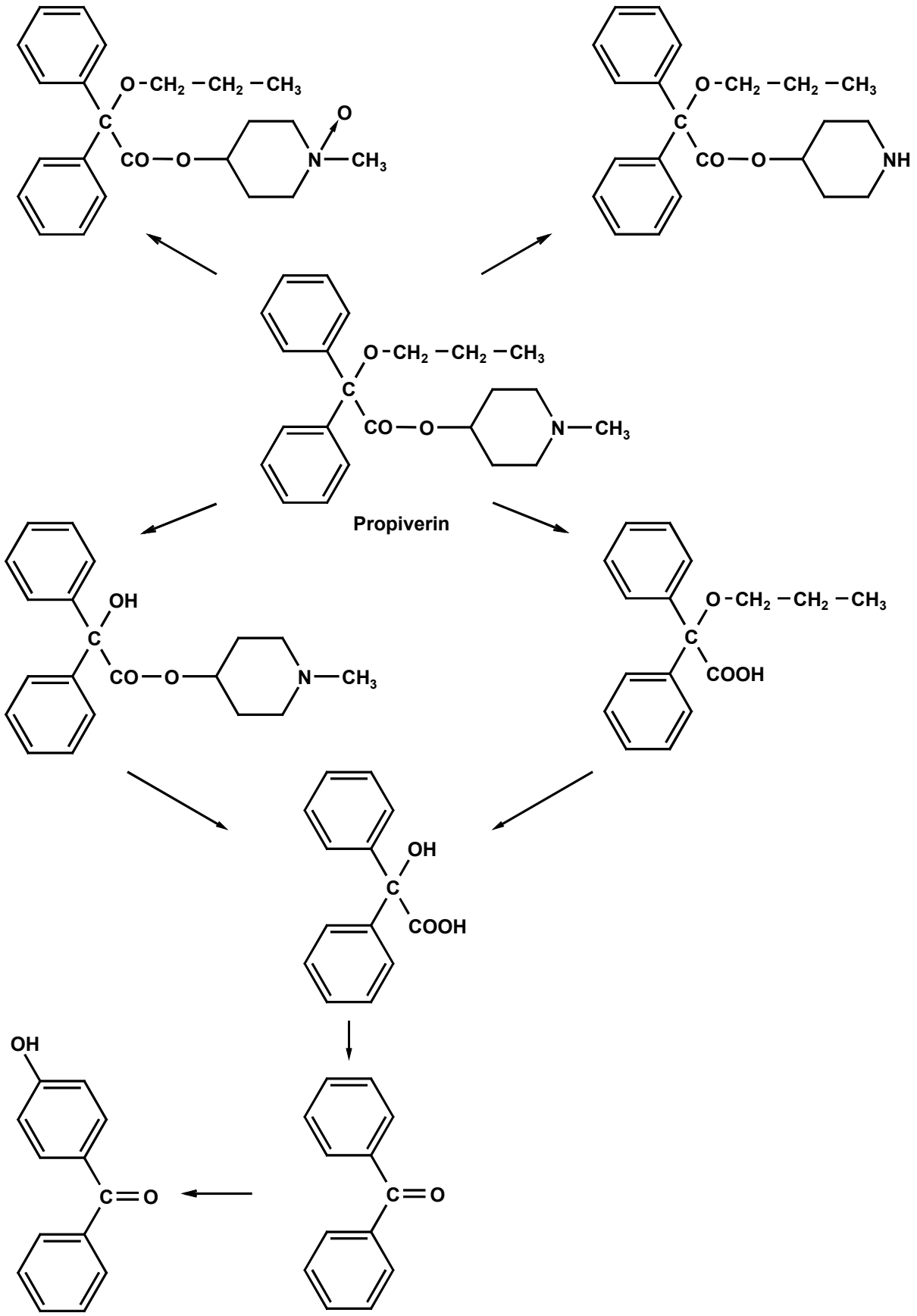
rit oder Wasserstoffperoxid in einem biphasischen System gelang die Synthese in einem Schritt, von Tiagabin ausgehend, mit bis zu 74%iger Ausbeute (siehe Schema 21) [92].



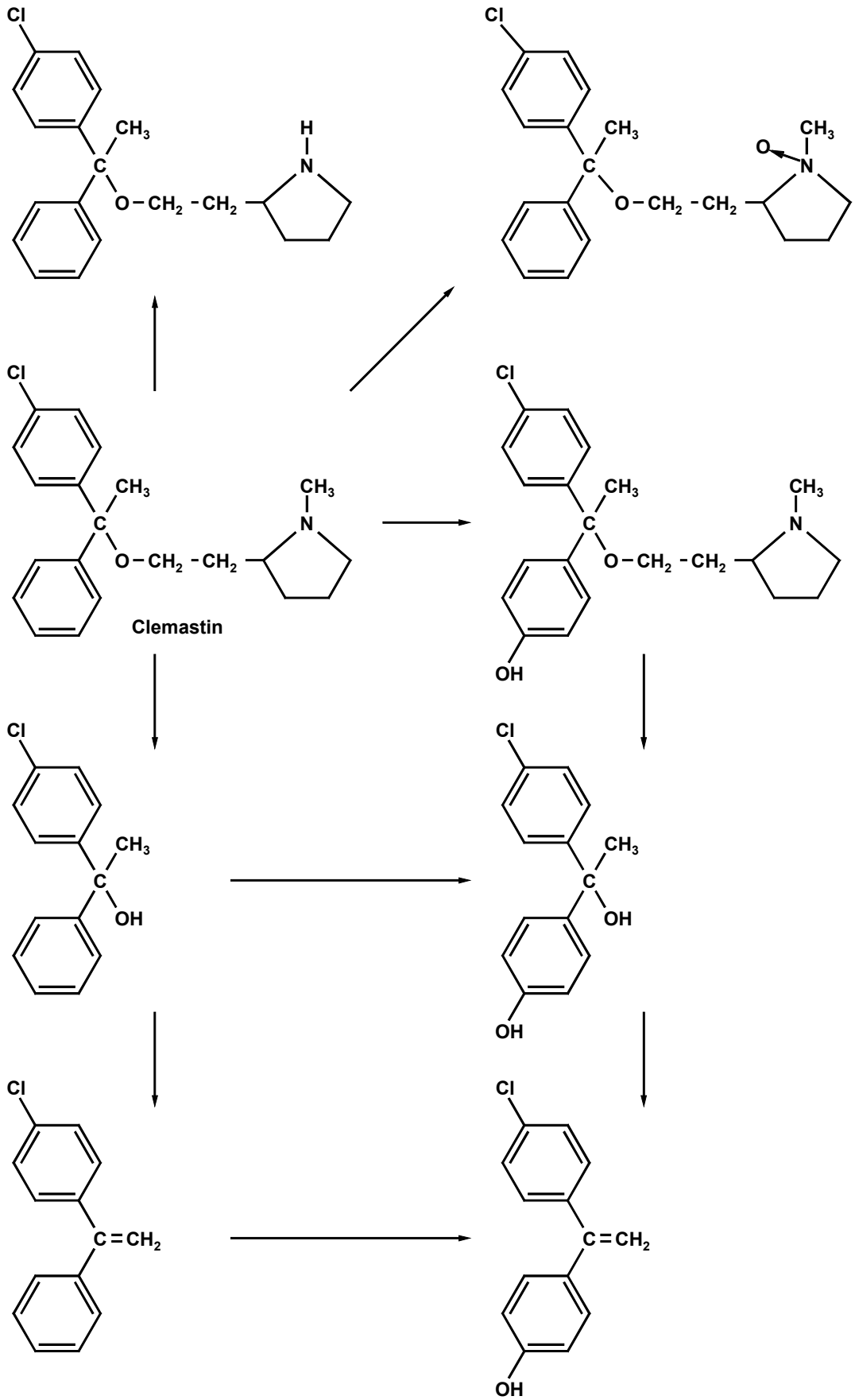
Schema 22: Beispiele einiger routinemäßig untersuchten Arzneistoffe

Unter Erarbeitung eines standardisierten chemischen Protokolls wird in diesen Laboratorien die oxidative Anfälligkeit bekannter und neu entwickelter Arzneistoffe routinemäßig untersucht (siehe Schema 22) [93][94].

Systematisch wurde von Fröhlich das Verhalten von verschiedenen Diphenylmethanderivaten in biomimetischen Systemen untersucht. Ziel dabei war es, mit chemischen Modellen die unterschiedlichen Biotransformationswege ähnlicher Strukturen nachzuahmen. So wird Propiverin, ein basischer Benzilsäureester, ausschließlich an den Ester- und Etherseitenketten metabolisiert. Clemastin dagegen, ein basischer Benzhydrolether, wird *in vivo* als Hauptmetabolisierungsweg an den aromatischen Ringen hydroxyliert. Zunächst wurde an einer Modellsubstanz, 4-Methoxybenzophenon, das chemische Modell hinsichtlich der Aromatenoxygenierung optimiert. Als Katalysatoren wurden zahlreiche Derivate der ersten bis dritten Generation mit Eisen, Mangan, Zink und Cobalt als Zentralatome eingesetzt. Als Co-Katalysatoren wurden verschiedene ungesättigte, fünf- und sechsgliedrige N-Heterozyklen und Ammoniumacetat getestet. Die verwendeten Sauerstoffdonatoren waren Wasserstoffperoxid, Iodosyl- und Pentafluoriodosylbenzen sowie Natriumhypochlorit. Die höchste Aktivität im Hinblick auf die aromatische Oxygenierung zeigte das System MnTPFPPCl/Pyridin/Wasserstoffperoxid mit einem Gesamtumsatz von 70 %, wobei die aromatische Oxygenierung mit 50%iger und die Methyletherspaltung mit 20%iger Ausbeute, jeweils bezogen auf die umgesetzte Menge an Wasserstoffperoxid, ablief. Mit dem gleichen Katalysator und Wasserstoffperoxid zeigten auch Imidazol und 4-tert-Butylpyridin hohe Ausbeuten. Mit Ersterem wird der Gesamtumsatz durch geringere aromatische Hydroxylierung vermindert. Mit Letzterem wurde ein etwas erhöhter Gesamtumsatz von 76 %, bezogen auf verbrauchten O-Donator, erreicht, jedoch vor allem durch verstärkte Methoxygruppenspaltung, während die Aromatenoxygenierung ebenfalls in geringerem Maße erfolgte [95]. Mit den aktivsten Modellsystemen wurden anschließend die Arzneistoffe im nichtwässrigen und im wässrigen Milieu bei verschiedenen pH-Werten umgesetzt. Für Propiverin katalysierte das chemische Modell in Übereinstimmung zum tierischen und menschlichen Metabolismus die Funktionalisierungsreaktionen N-Oxidation, N-Demethylierung, Ether- und Esterspaltung. Zusätzlich traten Decarboxylierung und aromatische Oxygenierung des entstandenen Benzophenons auf (siehe Schema 23) [96][97]. Die N-Dealkylierung wurde nur im menschlichen Metabolismus und im biomimetischen System nachgewiesen. Die Ratte metabolisiert Propiverin auf diesem Weg nicht. Im Modellsystem konnten die Seitenkettenhydroxylierungen nicht gezeigt werden. Sie stellen einen Biotransformationsweg des Menschen und der Ratte dar.



Schema 23: Biomimetisches Produktspektrum von Propiverin



Schema 24: Biomimetisches Produktspektrum von Clemastin im wässrigen Milieu

Für Clemastin wurden mit biomimetischen Ansätzen die N-Demethylierung, N-Oxidation, Etherspaltung und/oder nachfolgende Wasserabspaltung katalysiert. Zusätzlich traten im wässrigen Milieu in Übereinstimmung mit dem Rattenmetabolismus überwiegend phenolische Produkte auf. Hauptumsetzungsprodukte waren die monooxygenierte Ausgangsverbindung und das nach Etherspaltung und Wasserabspaltung entstehende Ethenderivat (siehe Schema 24). Zusätzlich treten bei der Ratte Oxidation der α-Methylgruppe und Folgereaktionen auf. Zum Metabolismus beim Menschen liegen noch keine Erkenntnisse vor. Das strukturell eng verwandte Chlorphenoxamin zeigt ein dem Rattenmetabolismus von Clemastin ähnliches Metabolitenspektrum. Es bildet, in Übereinstimmung mit den biomimetischen Befunden, beim Menschen keine Produkte durch Oxidation der α-Methylgruppe [98].

Insgesamt besteht hinsichtlich der Stoffwandlungswege eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den *in vivo* gebildeten Metaboliten von oxidativen und hydrolytischen Vorgängen und Folgereaktionen und dem biomimetischen Produktspektrum. Insbesondere konnten die unterschiedlichen Biotransformationswege, vor allem hinsichtlich der aromatischen Oxygenierung, für strukturell eng verwandte Arzneistoffe gezeigt werden.

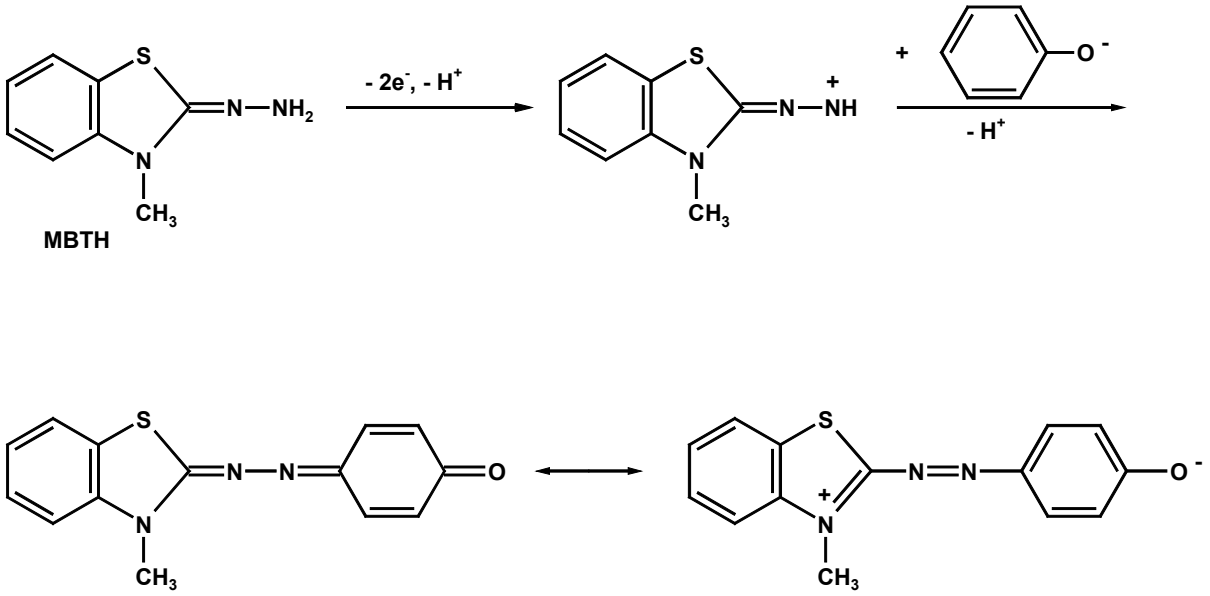
Aufbauend auf diesen Untersuchungen werden im Folgenden biomimetische Umsetzungen von Benzilsäurederivaten mit unterschiedlichen Substitutionsmuster sowie von Estrogenen dargestellt und die Ergebnisse diskutiert.

3 Untersuchungen und Ergebnisse

3.1 Allgemeine Methodik der biomimetischen Umsetzungen basischer Benzilsäurederivate, Produktisolierung und -identifizierung

Die Umsetzungen der Substrate erfolgten im wässrigen und nichtwässrigen Milieu mit verschiedenen Katalysatoren, Co-Katalysatoren und Sauerstoffdonatoren. Als Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, ein Dichlormethan-Acetonitril-Gemisch (im Verhältnis 1 : 1) oder Wasser (pH-Wert = 6 – 8) eingesetzt. Für die Reaktionsansätze im sauren Milieu wurde der Ansatz mit Salzsäure angesäuert (pH-Wert = 1).
Alle Produkte wurden schichtchromatographisch isoliert, dc und hplc charakterisiert und ms und soweit möglich nmr sowie durch Verwendung von Vergleichssubstanzen in ihrer Struktur aufgeklärt.
Die Reaktionsansätze wurden zur Abtrennung des Überschusses an Ausgangsverbindung mittels präparativer Schichtchromatographie unter Verwendung von Fließmittelgemisch II fraktioniert. Die Fraktionen wurden anschließend dc und hplc untersucht. Zur Charakterisierung basischer Derivate wurden die Fließmittelgemische II und III verwendet. Reaktionsprodukte mit sauren Eigenschaften sind in den sauren Fließmittelgemischen IV (für die Denaverinabkömmlinge) und VI eindeutig zuzuordnen, während für die neutralen Derivate (Benzophenone und Methylester) Fließmittelgemisch V zur Anwendung kam. Zur Detektion wurden die Fluoreszenslöschung im UV-Licht bei 254 nm (Detektionsmittel A = Dm A) und die Färbung mit konzentrierter Schwefelsäure mit anschließendem zehnminütigen Erhitzen auf der Heizplatte bei 120 °C (Dm B) genutzt. Während Benzophenonderivate mit Dm B eine Gelbfärbung zeigen, geben Benzilsäurederivate in Abhängkeit von den Substituenten am Aromaten typische Färbungen. An den Aromaten unsubstituierte Benzilsäurederivate färben sich rotviolett. Die 3,4-Dimethoxystruktur führt zu bläulichen und die 3,3‘-Dimethoxysubstitution zu grauvioletten Färbungen. Der Reaktionsmechanismus der Färbungen ist nicht geklärt. Stickstoffhaltige Reaktionsprodukte lassen sich mit Dragendorffs Reagenz (Dm C) orange anfärben. Zur Unterscheidung der phenolischen Produkte wird die oxidative Kupplung von 3-Methylbenzothiazolin-2-on-hydrazon (MBTH) im alkalischen Milieu, mit Kaliumhexacyanoferrat(III) als mildem Oxidationsmittel, genutzt (Dm D). Bei der zugrundeliegenden

Reaktion gibt MBTH zwei Elektronen und ein Proton ab. Das gebildete Kation reagiert mit dem vorliegenden Phenolat in einer elektrophilen Substitutionsreaktion. Je nach Stellung der phenolischen OH-Gruppe führt die anschließende Oxidation zu roten, violetten oder blauen Produkten (siehe Schema 25) [99].



Schema 25: Reaktion von MBTH-Reagenz mit Phenolen

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit Dm D auch rote bis violette Färbungen von an den Aromaten chlorierten Benzilsäurederivaten ohne phenolische Gruppe beobachtet.
Für die Produktspektren der jeweiligen Ausgangsverbindungen wurden verschiedene RP-HPLC-Methoden (I – IV) entwickelt. Die Detektion erfolgte mit einem DAD bei 280 nm bzw. 230 nm.
Für quantitative Aussagen wurden die Mengenverhältnisse von Produktspektren oder Produkten dc nach der Fleckengröße und hplc nach der Fläche abgeschätzt, sofern keine weiteren Angaben zur quantitativen Methode gemacht werden.

3.2 Biomimetische Umsetzungen von am Aromaten substituierten Benzilsäurederivaten und verwandten Verbindungen

Die für die biomimetischen Untersuchungen ausgewählten Substrate, die substituierten Benzilsäurederivate, wurden als potentielle, neue Wirkstoffe zur Therapie des Morbus Parkinson synthetisiert [100]. Im Gegensatz zu den bisher biomimetisch umgesetzten Derivaten sind sie

zweifach an den aromatischen Ringen substituiert und zwar in 3- und 4-Position eines Ringes oder an beiden Ringen in 3- und 3‘-Position. Damit sollte ein Beitrag zur weiteren Optimierung und zur Erprobung des erarbeiteten biomimetischen Systems geleistet werden. Zudem sollen die Ergebnisse neben der Erarbeitung der analytischen Methoden vor allem erste Aussagen über mögliche Metabolisierungswege ermöglichen. In die Untersuchungen wurde 3,4-Dimethoxybenzophenon (**8**) einbezogen, das ein potentielles Biotransformationsprodukt der genannten Verbindungen repräsentiert.

3.2.1 Biomimetische Umsetzungen mit 3,4-Dimethoxybenzophenon (8)

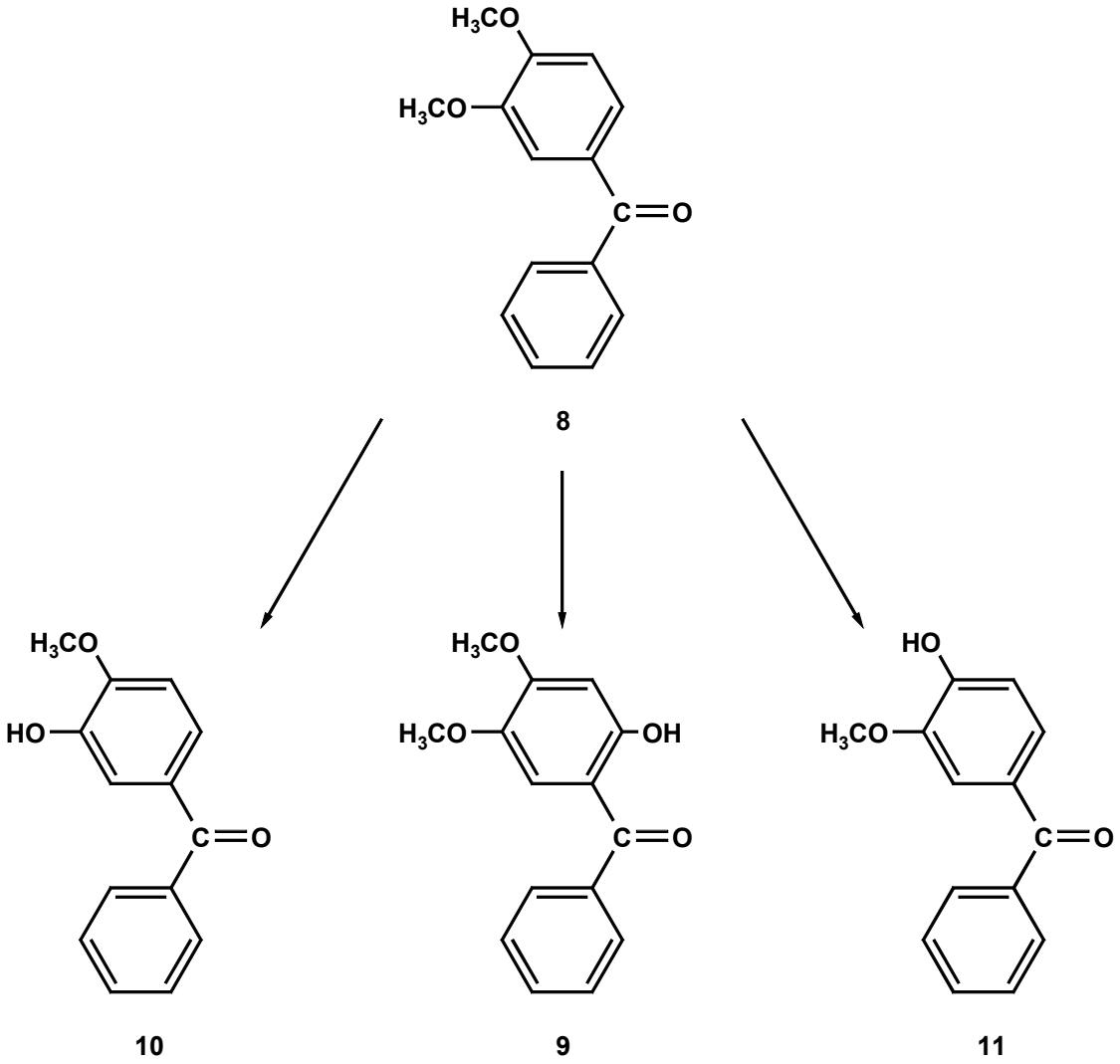
3,4-Dimethoxybenzophenon (**8**) wurde aus Veratrol und Benzoylchlorid synthetisiert (siehe 4.2.2.1) und als Modellsubstrat disubstituierter Diphenylmethanderivate mit verschiedenen biomimetischen Systemen umgesetzt. Bisherige systematische Untersuchungen an substituierten Benzophenonen beschränkten sich auf die an einem aromatischen Ring monosubstituierten Derivate.

Katalysator	Co-Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Reaktionprodukte
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**9**, **10**, **11**
MnTPFPPCl	Pyridin	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**9**, **10**, **11**
MnTPFPPCl	Imidazol	Iodosylbenzen	Dichlormethan/ Acetonitril	**9**, **10**
MnTPFPPCl	Imidazol	tert-Butyl-hydroperoxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**9**, **10**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**10**
$FeTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser	**10**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser	**9**, **10**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser	**10**

Tabelle 1: Biomimetische Umsetzungen von **8**

Die Zusammensetzung der verschiedenen Reaktionsansätze und die entstandenen Produktspektren sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

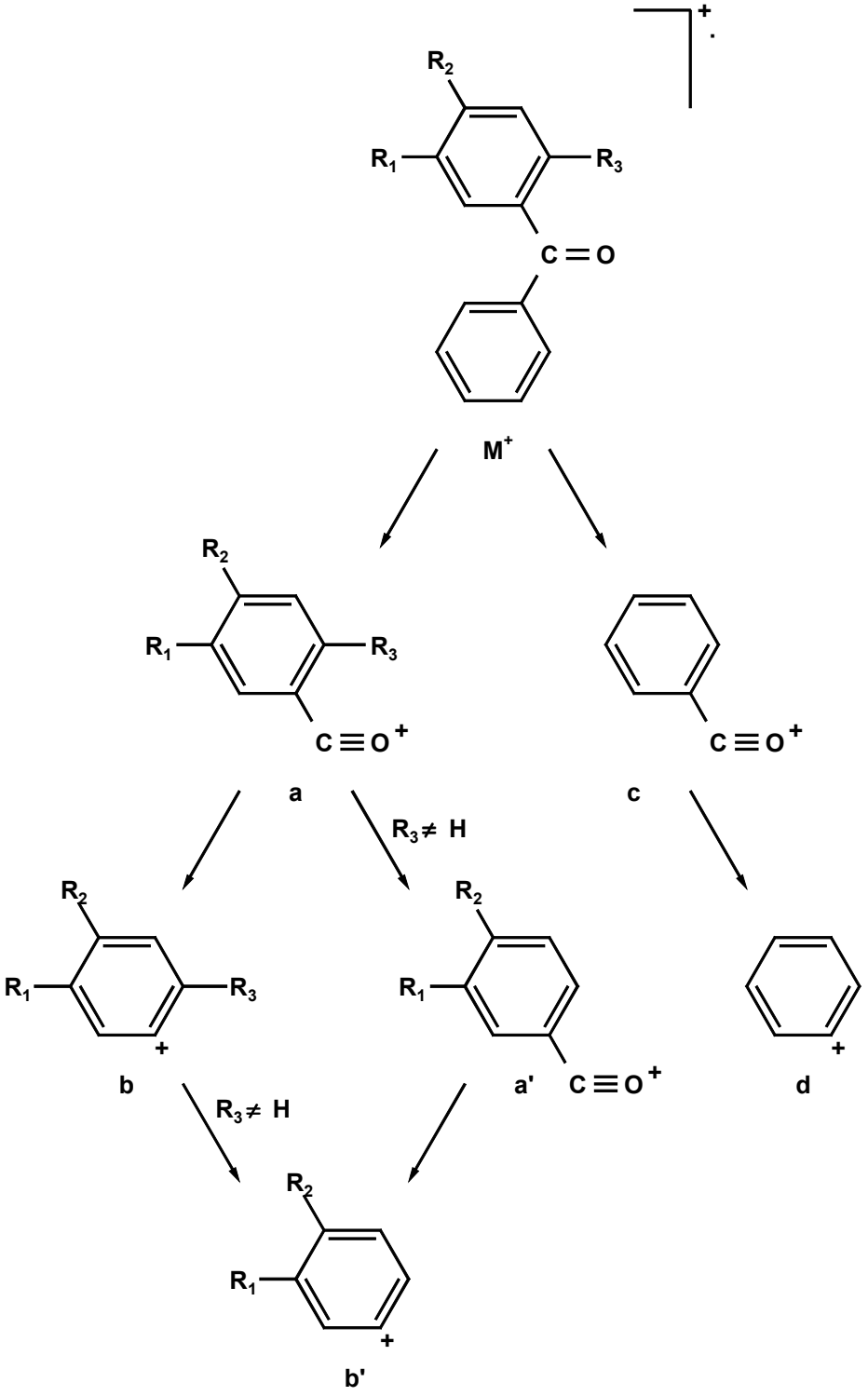
Insgesamt ließen sich drei Produkte isolieren. In allen Reaktionsansätzen ist 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (**10**) nachweisbar, in den Vergleichsansätzen ohne Katalysator in wesentlich geringeren Mengen. Hauptumsetzungsprodukt der Ansätze mit Manganporphyrinkatalysatoren ist 2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzophenon (**9**). Zusätzlich wurde aus den biomimetischen Systemen MnTPFPPCl/Imidazol/Wasserstoffperoxid und MnTPFPPCl/Pyridin/ Wasserstoffperoxid 4-Hydroxy-3-methoxy-benzophenon (**11**) isoliert. Das gesamte Produktspektrum ist in Schema 26 dargestellt.



Schema 26: Produktspektrum der biomimetischen Studie mit **8**

Die dc Trennung der Produkte erfolgte mit Fließmittelgemisch V. Mit Dm D als Phenolreagenz geben **8** eine Gelb-, **9** und **10** eine Rotviolett- und **11** eine Blaufärbung. Die für Benzophenonderivate von Fröhlich entwickelte HPLC-Methode II ist nur bedingt anwendbar, da die Stellungsisomeren mit je einer Hydroxy- und Methoxygruppen gemeinsam eluieren. Besser

geeignet ist die HPLC-Methode IV. Sie erlaubt eine Trennung aller Reaktionsprodukte. Vergleichssubstanzen standen nicht zur Verfügung.



Schema 27: Fragmentierungsverhalten von **8** und Derivaten

Im EI-MS zeigen Benzophenonderivate Molekülionenpeaks in moderaten Intensitäten, so dass die molekulare Zusammensetzung ms leicht ermittelbar ist. Die weitere Fragmentierung entspricht der von Benzilsäuren und ist in Schema 27 für die Verbindungen **8 – 11** dargestellt. Im EI-MS von **9**, dem trisubstituierten Benzophenon, treten zusätzlich die nach formaler Sauerstoffabspaltung um 16 Masseeinheiten verminderten Fragmente **a‘** und **b‘** mit den Massenzahlen m/z 165 und m/z 137 auf. Ein weiterer Unterschied der Fragmentierung von **9** zu den anderen Benzophenonderivaten besteht in der bevorzugten Abspaltung des trisubstituierten Phenylringes. Die Fragmente des unsubstituierten Phenylringes **c** und **d** treten mit hohen Intensitäten auf. Im EI-MS der disubstituierten Benzophenone zeigen die substituierten Phenylfragmente **a** und **b** hohe Intensitäten. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Fragmente der Verbindungen **8 – 11**.

Fragment	**8** m/z (Intensität)	**9** m/z (Intensität)	**10** m/z (Intensität)	**11** m/z (Intensität)
$[M^+]$	242 (26)	258 (23)	228 (26)	228 (26)
a	165 (100)	181 (15)	151 (100)	151 (100)
b	137 (12)	153 (3)	123 (15)	123 (30)
c	105 (29)	105 (81)	105 (26)	105 (16)
d	77 (52)	77 (100)	77 (31)	77 (37)
zusätzliche Fragmente	-	165 (21), **a‘** 137 (23), **b‘**	-	-

Tabelle 2: Übersicht der Fragmente von **8 – 11** im EI-MS

Für die Zuordnung der ^{1}H- und ^{13}C-Signale in den NMR-Spektren wurden ein empirisches Inkrementsystem, die Kopplungskonstanten, die Aufspaltung von Signalen im ^{1}H-NMR aufgrund von Kernkopplungen und die ^{1}H-^{13}C-korrelierten zweidimensionalen Spektren verwendet. Mit dem empirischen Inkrementsystem kann die ^{13}C-Verschiebung von substituierten Benzolen abgeschätzt werden. Dabei wird bei mehreren Substituenten ein additives Verhalten vorausgesetzt. Tabelle 3 zeigt beispielhaft die berechneten, nach [101], und die gemessenen Werte von **8**.

Mit größeren Abweichungen der Verschiebungswerte ist dann zu rechnen, wenn die Substitutionseffekte aufgrund sterischer oder elektronischer Wechselwirkungen nicht additiv sind. Daher wurde das System vor allem zur Festlegung der relativen Lage der Signale untereinander benutzt.

Die Zuordnung im ^{13}C-NMR wird durch die Aufspaltung der Protonensignale im ^{1}H-NMR bestätigt. Für die Zuordnung der Signale des substituierten Ringes wurden die Kopplungskonstanten im Protonenresonanzspektrum ermittelt. Das Proton in 5-Stellung koppelt über drei Bindungen mit dem Proton in 6-Stellung. Das Protonensignal erscheint daher als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8,5 Hz. Das Proton in 6-Stellung koppelt mit einer Kopplungskonstante von 8,5 Hz mit dem benachbarten Proton und über 4 Bindungen mit einer Kopplungskonstante von 2 Hz mit dem Proton in 2-Stellung. Das Signal erscheint als Dublett vom Dublett. Das Proton in 2-Position zeigt ein Dublett mit der annähernd gleichen Kopplungskonstante von 1,9 Hz.

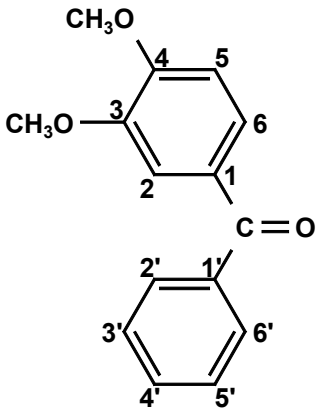


Abbildung 3: Nummerierung von **8**

C-Atom	1	2	3	4	5	6	1‘	2‘/6‘	3‘/5‘	4‘
berechnet	130,6	114,6	145,0	149,0	114,6	121,5	137,8	128,7	128,7	132,7
gemessen	131,6	113,8	150,9	155,5	111,9	127,3	140,1	131,1	129,8	133,6

Tabelle 3: Berechnete und gemessene ^{13}C-Verschiebungen (ppm) von **8**

Die Signale der entsprechenden C-Atome wurden aus dem zweidimensionalen Spektrum abgeleitet (siehe Abbildung 4). Die Signale der Substituenten liegen für **8** für die C=O-Gruppe bei 198 ppm, für die Methoxygruppen bei 3,78 und 3,82 ppm bzw. bei 56,8 und 56,9 ppm. Eine Zuordnung eines Protonensignals zu einem ^{13}C-Signal der Methoxygruppen war im zweidimensionalen Spektrum aufgrund der geringen Unterschiede in den Verschiebungen nicht möglich. Auf die Zuordnung der Substitutionsstelle der einzelnen CH_3O-Signale, z. B. über ein ^{13}C-^{13}C-korreliertes, zweidimensionales Spektrum wurde verzichtet.

Die ^{13}C-Verschiebungen der Substitutionsstellen (siehe Tabelle 3) wurden in DEPT-Experimenten als quartäre Kohlenstoffatome erkannt und mit Hilfe des Inkrementsystems den einzelnen Stellungen zugeordnet. Mit der DEPT-Technik lassen sich gezielt, nach Signalmultiplizität selektierte Teilspektren aufnehmen. Dabei erscheinen die Signale von CH_3- und CH-Gruppen in gewohnter Weise, während die CH_2-Signale negativ erscheinen und die quartären C-Signale verschwinden.

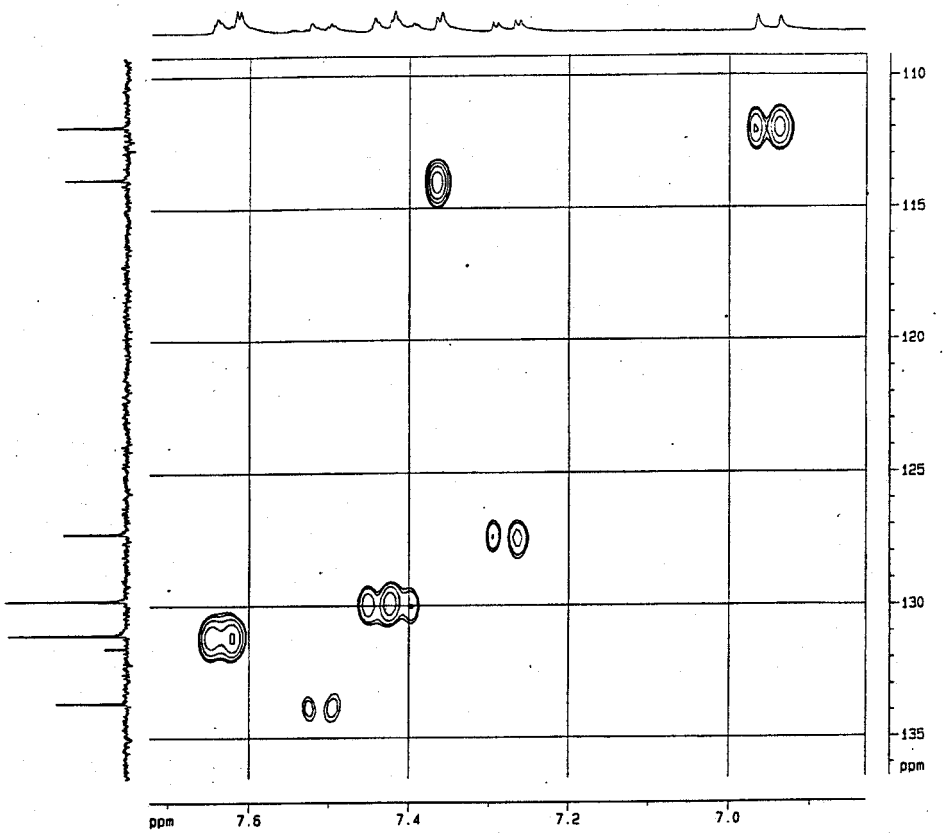


Abbildung 4: ^{1}H-^{13}C-korreliertes, zweidimensionales Spektrum von **8** (Ausschnitt)

Auf der Grundlage der Spektren von **8** ließen sich die Derivate **9 – 11** eindeutig Strukturen zuordnen.

Verbindung **9** ist nach dem MS am substituierten Ring monohydroxyliert. Der Molekülionenpeak und die Fragmentionen unterscheiden sich im Vergleich mit denen von **8** um 16 Masseeinheiten (siehe Tabelle 2). Im ^{1}H-NMR zeigt **9** stark tieffeldverschoben das Singulettsignal eines Protons bei 12,53 ppm, ein charakteristisches Merkmal von 2-Hydroxybenzophenonen. Ursache der Tieffeldverschiebung sind intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen. Die

zwei Protonen des substituierten Ringes treten hochfeldverschoben als Singulettsignale bei 6,9 und 6,5 ppm auf. Daraus lässt sich Position 6 als Hydroxylierungsstelle ableiten. Im ^{13}C-NMR ist in Übereinstimmung mit den berechneten Verschiebungen das Signal von C5 auf 100,7 ppm hochfeldverschoben, während die C2-Resonanz tieffeldverschoben bei 114,4 ppm auftritt. C6 zeigt, durch die Substitution am weitesten ins tiefe Feld verschoben, bei 141,6 ppm Resonanz. Die weiteren Signale im Protonen- und Kohlenstoffresonanzspektrum sind weitgehend unverändert. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein [102]. Nach IUPAC ergibt sich mit der zusätzlichen Hydroxygruppe eine neue Zählweise der Kohlenstoffatome. Die korrekte Bezeichnung von Verbindung **9** lautet 2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzophenon.

Die Verbindungen **10** und **11** haben nach dem MS eine Hydroxymethoxybenzophenonstruktur (siehe Tabelle 2 und Schema 27). Sie entstehen durch oxidative Methyletherspaltung jeweils einer Methoxygruppe. Die Signale der Protonen und Kohlenstoffatome wurden über die Aufspaltung der Protonensignale und die ^{1}H-^{13}C-korrelierten zweidimensionalen Spektren zugeordnet. Für **10** sind im ^{13}C-NMR im Vergleich zu **8** das C2-Signal stark tieffeldverschoben und das C3-Signal hochfeldverschoben. Das Signal des C5-Atoms zeigt nur eine geringe Verschiebung (- 0,3 ppm), ebenso das dazugehörige Proton. Das Proton der OH-Gruppe zeigt im Protonenresonanzspektrum bei 5,75 ppm Resonanz. Nach den Inkrementen ist die starke C2-Verschiebung bei vergleichsweise geringer Änderung des C5-Signals für die 3-Hydroxy-4-methoxyverbindung typisch. Die abgeleitete Struktur wurde durch Literaturdaten bestätigt [103]. Für **11** muss demnach der 4-Methylether gespalten worden sein, so dass es sich um die 4-Hydroxy-3-methoxyverbindung handelt.

3.2.2 Umsetzungen mit N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (1)

3.2.2.1 Biomimetische Reaktionen

Eine Übersicht der Reaktionsansätze und der jeweiligen Produktspektren gibt Tabelle 4. Für die nichtwässrigen Ansätze wurde die freie Base **1** und für die wässrigen Ansätze das Hydrochlorid **1**-HCl verwendet.

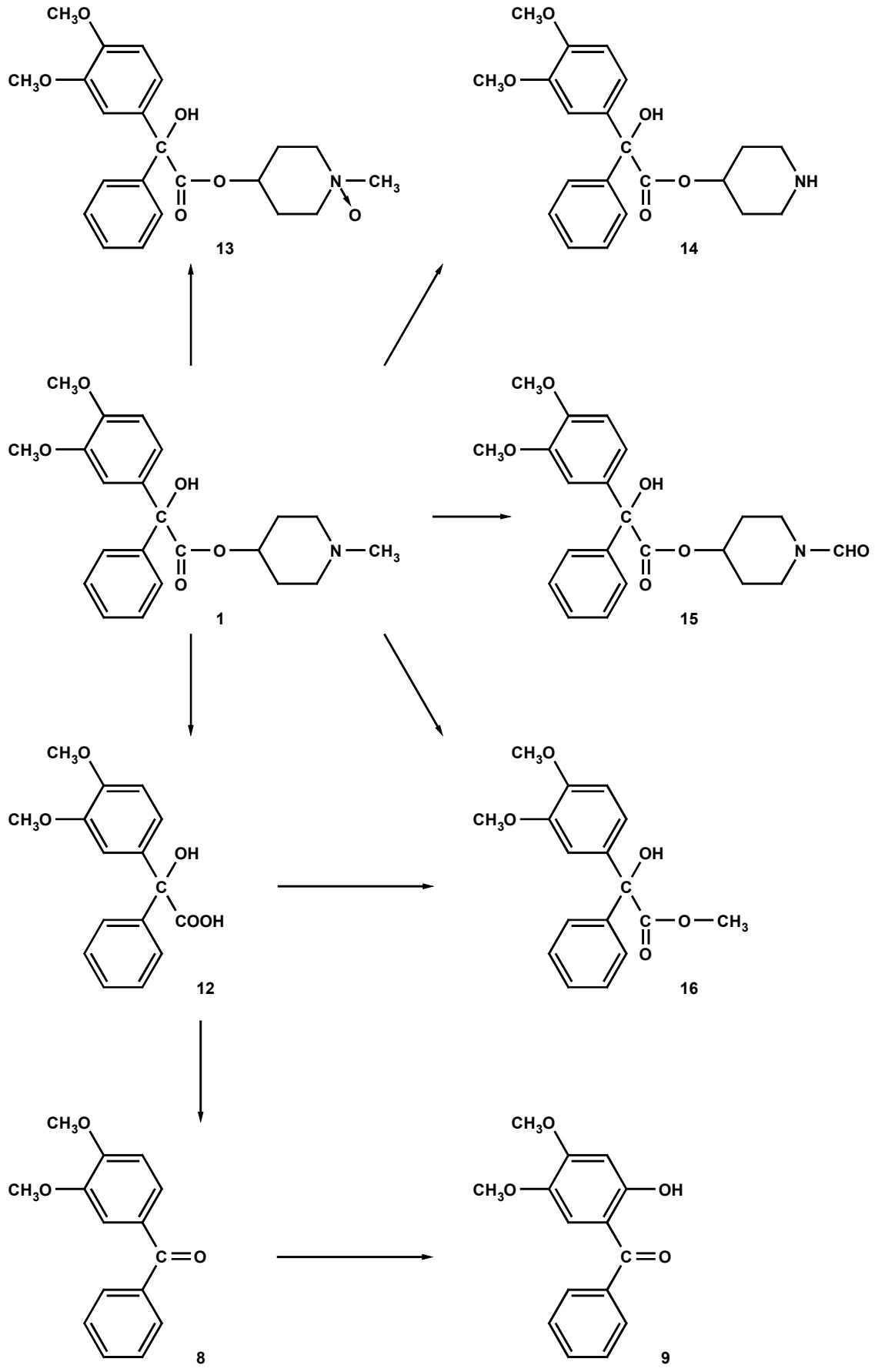
Die gefundenen Produktspektren entsprechen im Wesentlichen den Funktionalisierungsreaktionen Esterspaltung (**12**), N-Oxidation (**13**), N-Dealkylierung (**14**), C-Oxidation (**15**), Decar-

boxylierung (**8**) und aromatische Oxygenierung (**9**). Das Produktspektrum ist in Schema 28 in der Übersicht dargestellt. Es unterscheidet sich für die einzelnen Ansätze z. T. in Art und Menge der Reaktionsprodukte.

Katalysator	Co-Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Reaktionsprodukte
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **9**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
MnTPFPPCl	Pyridin	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
MnTPFPPCl	Imidazol	Iodosylbenzen	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
MnTPFPPCl	Imidazol	tert-Butyl-hydroperoxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
FeTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **16**, **17**
-	-	Iodosylbenzen	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **13**, **16**, **17**
-	-	tert-Butyl-hydroperoxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **13**, **16**, **17**
$FeTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**8**, **9**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**8**, **13**, **14**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**8**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**16**, **17**, **19**, **20**

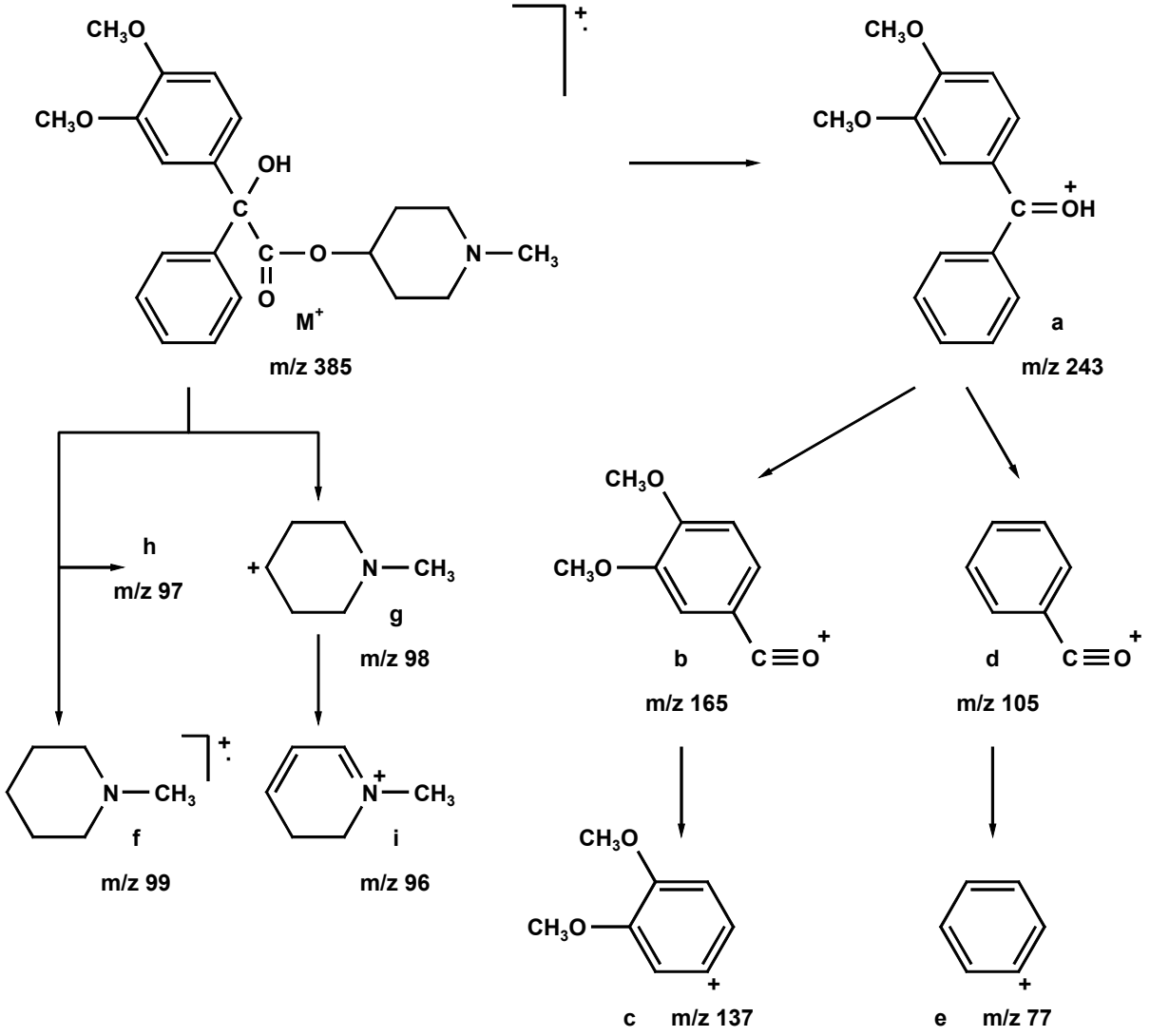
Tabelle 4: Übersicht der biomimetischen Umsetzungen mit **1**

In den Vergleichsansätzen ohne Katalysator treten in sehr kleinen Mengen **8**, **12** und **13** auf. Als Artefakte finden sich Produkte von Um- oder Veresterung (**16**) und Chlorierung (**17**) in Spuren in allen untersuchten Systemen. Im wässrigen Milieu wurde im sauren pH-Bereich zusätzlich eine Reihe von Produkten in höheren Ausbeuten isoliert, die durch Veretherung (**18**), Chlorierung (**19**) oder Chlorierung und Etherspaltung (**20**) gebildet wurden. Die chlorierten Produkte werden auch ohne Katalysatorzusatz in geringen Ausbeuten erhalten. Sie stellen Artefakte dar. Die höchsten Umsetzungen wurden mit den Systemen MnTPFPPCl/Imidazol oder Pyridin/Wasserstoffperoxid erreicht (siehe 3.2.2.2).
Zur Charakterisierung und Trennung siehe 3.1.



Schema 28: Produktspektrum der biomimetischen Umsetzungen mit **1**

Die Fragmentierung im EI-MS entspricht dem Verhalten anderer Benzilsäurederivate. Im Gegensatz zu den unsubstituierten Derivaten, siehe z. B. Denaverin unter 3.3.1, sind die Molekülionenpeaks mit geringen Intensitäten im MS vorhanden. Zusätzliche ms Untersuchungen mit sogenannten weichen Ionisierungstechniken waren daher nicht notwendig. Beispielhaft ist in Schema 29 das Fragmentierungsverhalten von **1** dargestellt.



Schema 29: Fragmentierung von **1** im EI-MS

In den NMR-Spektren lassen sich alle Signale bestimmten Strukturen zuordnen. Die Methylengruppen des Piperidinringes zeigen im Protonenresonanzspektrum bei 1,66 ppm und 1,81 ppm zwei Multipletts, welche mit den ^{13}C-Signalen bei 30,3 ppm und 30,4 ppm korrelieren. Die dem Stickstoffatom benachbarten Methylengruppen treten im Protonenresonanzspektrum bei 2,15 ppm und 2,25 ppm als Multipletts und im ^{13}C-Spektrum bei 52,1 ppm mit einem Signal auf. Die Protonenmultipletts werden zudem von dem Singulett der N-Methyl-

gruppe bei 2,1 ppm überlagert. Im Kohlenstoffresonanzspektrum tritt diese bei 46,1 ppm auf. Die O-Methingruppe ist bei 4,9 ppm bzw. 72,0 ppm zu finden. Die Singuletts der Methoxygruppen bei 3,7 ppm und 3,8 ppm im Protonenresonanzspektrum korrelieren mit den ^{13}C-Signalen bei 55,83 ppm und 55,86 ppm. Die Zuordnung der aromatischen Protonen erfolgte analog der von **8** über die Aufspaltungen der einzelnen Signale. Die entsprechenden Resonanzen des substituierten Ringes liegen bei 6,75 ppm und 110,2 ppm für die Position 5; bei 6,89 ppm und 119,9 ppm für die Position 6 und für die 2-Position bei 6,93 ppm und 110,7 ppm. Die quartären Kohlenstoffatome zeigen bei 142,2 ppm; 148,5 ppm und 148,7 ppm für die Positionen 1, 4 und 3 Resonanz. Der unsubstituierte Phenylring ist durch die Protonensignale von 7,19 – 7,37 ppm in Korrelation mit den ^{13}C-Signalen bei 127,4 ppm; 127,96 ppm und 128,0 ppm gekennzeichnet. Die Substitutionsstelle zeigt bei 134,4 ppm Resonanz. Weitere Signale zeigen sich im ^{13}C-NMR bei 80,7 ppm für das zentrale C-Atom, bei 174,0 ppm für die Carboxylgruppe und im Protonenresonanzspektrum bei 4,3 ppm für die Hydroxygruppe. Letzteres ist nicht in allen Spektren der Derivate erkennbar.

Die freie Säure **12** ist dc im Fließmittelgemisch VI identifizierbar. Hplc ist sie mit Methode IV erkennbar, jedoch von der Demethylverbindung **14** nicht basisliniengetrennt. Die Trennung ist mit verändertem Gradientenverlauf möglich, allerdings unter verschlechterten Trennergebnissen der anderen Derivate. Die NMR-Spektren sind durch die fehlenden Signale des Piperidinringes gekennzeichnet, während die Signale der aromatischen Ringe, der Methoxysubstituenten und des zentralen C-Atoms im Vergleich zu **1** nur leicht verschoben sind. Die Carbonsäure tritt zum tiefen Feld verschoben bei 177,7 ppm auf. Die Protonen der Hydroxy- und der Säuregruppe geben im Protonenresonanzspektrum ein sehr breites Signal von 4,7 ppm bis 6,3 ppm. Im MS ist der Molekülionenpeak als [M^+]-Peak mit der Massenzahl m/z 288 mit geringer Intensität vorhanden. Als weitere Fragmente treten **a** – **e** mit vergleichbaren Intensitäten zu **1** auf (siehe Schema 29). Die Fragmente **f** – **i** des Piperidinringes fehlen.

Das N-Oxid von **1** (**13**) liegt in zwei isomeren Formen, mit axialem oder äquatorialem Sauerstoff, vor (siehe Abbildung 5). Sie sind dc im Fließmittelgemisch III und hplc mit Methode IV sowie nmr unterscheidbar. Das Protonensignal der N-Methylgruppe liegt für trans-**13** im Vergleich zu cis-**13** im tieferen Feld. Nach dc Abschätzung der Fleckengröße und Farbintensität mit Dm C liegt das cis-Isomere im Überschuss vor. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen mit 1-Alkyl-4-tert-Butylpiperidin-N-oxiden. Diese liegen bevorzugt in der trans-Form mit axialem Sauerstoff vor [104]. Die ^{13}C-Signale der N-Methylgruppe und der N-Methylengruppen (δ = 59,9/58,6 ppm und δ = 60,4/64,1 ppm) sind als Folge der Entschirmung durch das Sauerstoffatom im Vergleich zu **1** (δ = 46,1 ppm und δ = 52,1 ppm) stark ins tiefe Feld

verschoben (um 13,8/12,5 ppm und 8,3/12,0 ppm). Die Methylengruppensignale des Piperidinringes sind dagegen aufgrund des γ-Effektes um 5 ppm bzw. 6 ppm ins hohe Feld verschoben. Die Methingruppe zeigt bei 66,6 ppm (- 5) bzw. bei 69,1 ppm (-3) Resonanz. Die Effekte sind ebenfalls im ^{1}H-NMR erkennbar. Die N-Methyl- und N-Methylengruppensignale finden sich im tiefen Feld bei 2,80/2,89 ppm (+ 0,7/0,8) bzw. 2,45/2,66 ppm (+ 0,3/0,4) und 2,9/3,1 ppm (+ 0,8/0,9). Die Protonensignale der Methylen- und Methingruppen sind bei 1,60/2,45 ppm; 1,64/2,24 ppm hochfeldverschoben und bei 5,1/4,7 ppm (± 0,2) zu finden. Die weiteren Signale der Protonen und Kohlenstoffatome sind nur geringfügig verändert. Das Signal der Hydroxygruppe war nur für die cis-Verbindung als breites Signal bei 4,2 ppm vorhanden. Die Fragmentierung im normal aufgelösten EI-MS ist von der von **1** nicht unterscheidbar. Die Fragmente **a** – **i** (siehe Schema 29) treten mit ähnlichen Intensitäten auf. Der Molekülionenpeak ist nicht erkennbar. Im hochaufgelösten EI-MS lässt sich der M^{+}-Peak bei der Massenzahl m/z 401,1843 in Übereinstimmung mit der isotopenreinen, theoretischen Massenzahl m/z 401,1831 für $C_{22}H_{27}NO_6$ nachweisen.

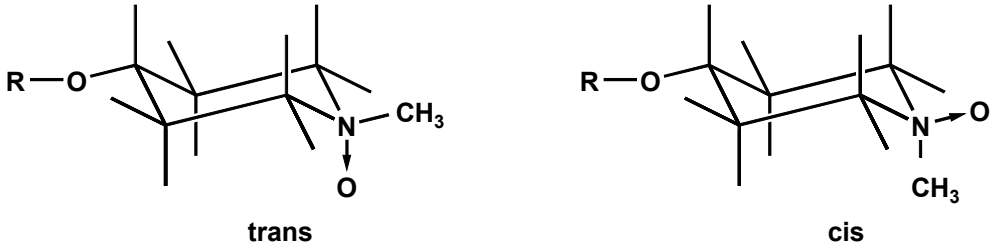


Abbildung 5: Isomeren von **13**

Die N-Demethylverbindung **14** ist im Fließmittelgemisch III und mit Dm C detektierbar. Strukturbeweisend sind im Vergleich mit den spektralen Daten von **1** der Molekülionenpeak mit der Massenzahl m/z 371 sowie die um 14 Masseeinheiten verringerten Fragmente des Piperidinringes **f** – **i**. In den NMR-Spektren fehlen die Signale der N-Methylgruppe. Das ^{13}C-Signal der N-Methylengruppen ist im Vergleich zu **1** um 2 ppm hochfeldverschoben. Die Protonensignale sind um 0,5 ppm tieffeldverschoben. Die weiteren Signale sind nur leicht verschoben oder unverändert. Das Protonensignal der NH-Gruppe ist in deuteriertem Chloroform oder Methanol nicht erkennbar.

Das N-Formylderivat **15** ist dc in den Fließmittelgemischen II und VI und mit Dm A, Dm B (hellblau) und Dm C (orange) detektierbar. Im MS ist das Fragment **f** mit der Massenzahl m/z 113 strukturbeweisend. Die weiteren Fragmente des Piperidinringes **g** – **i** fehlen (vergleiche Schema 29). Der Molekülionenpeak erscheint in sehr geringer Intensität (< 0,5) bei der

Massenzahl m/z 399. Die Fragmente **a** – **e** entsprechen in ihren Massenzahlen und Intensitäten denen von **1**. Daraus lässt sich zunächst nur eine zusätzliche Ketofunktion am Piperidinring ableiten. Die Oxidation der N-Methylgruppe wird in den NMR-Spektren nachgewiesen. Im tiefen Feld tritt bei 161,0 ppm ein zusätzliches Carbonylsignal für den Formylrest auf. Das Signal der N-Methylgruppe ist nicht mehr vorhanden. Im Protonenresonanzspektrum ist die N-Formylgruppe als Singulettsignal bei 7,9 ppm erkennbar.
Für die N,N-Dialkylformamidstruktur sind zwei Konformere möglich (siehe Abbildung 6).

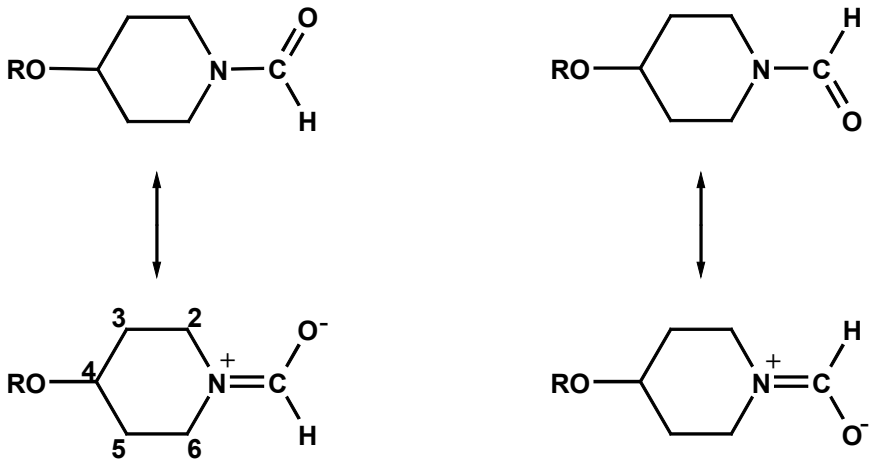


Abbildung 6: Konformationsisomere von **15**

Die Methylen- und die N-Methylengruppen sind nicht mehr chemisch äquivalent. Im ^{13}C-NMR erhält man für jedes C-Atom ein Doppelsignal (siehe Abbildung 7). Die N-Methylengruppe in cis-Stellung zum Formylsauerstoff ist zur trans-Stellung hochfeldverschoben [105]. Die Signale der N-Methylengruppen sind im Gegensatz zur Ausgangsverbindung **1** um 10 bzw. 14 ppm ins hohe Feld verschoben. Die Protonensignale erscheinen tieffeldverschoben bei 3,16 ppm und 3,45 ppm (+ 1 ppm). Die weiteren Signale liegen unverändert und nur im ^{13}C-NMR zum großen Teil als Doppelsignale vor.
Da die Alkylsubstituenten am Stickstoffatom übereinstimmen, erhält man für die N-Methylengruppen in cis- und trans-Stellung der (*E*)- und der (*Z*)-Verbindung identische Signale in den ^{1}H- und ^{13}C-NMR. Eine Ableitung des Verhältnisses der (*E*)- zur (*Z*)-Verbindung ist daher nicht möglich. Erwartungsgemäß zeigen die ^{1}H- und ^{13}C-Resonanzen der N-Methylengruppen annähernd gleiche Signalintensitäten.

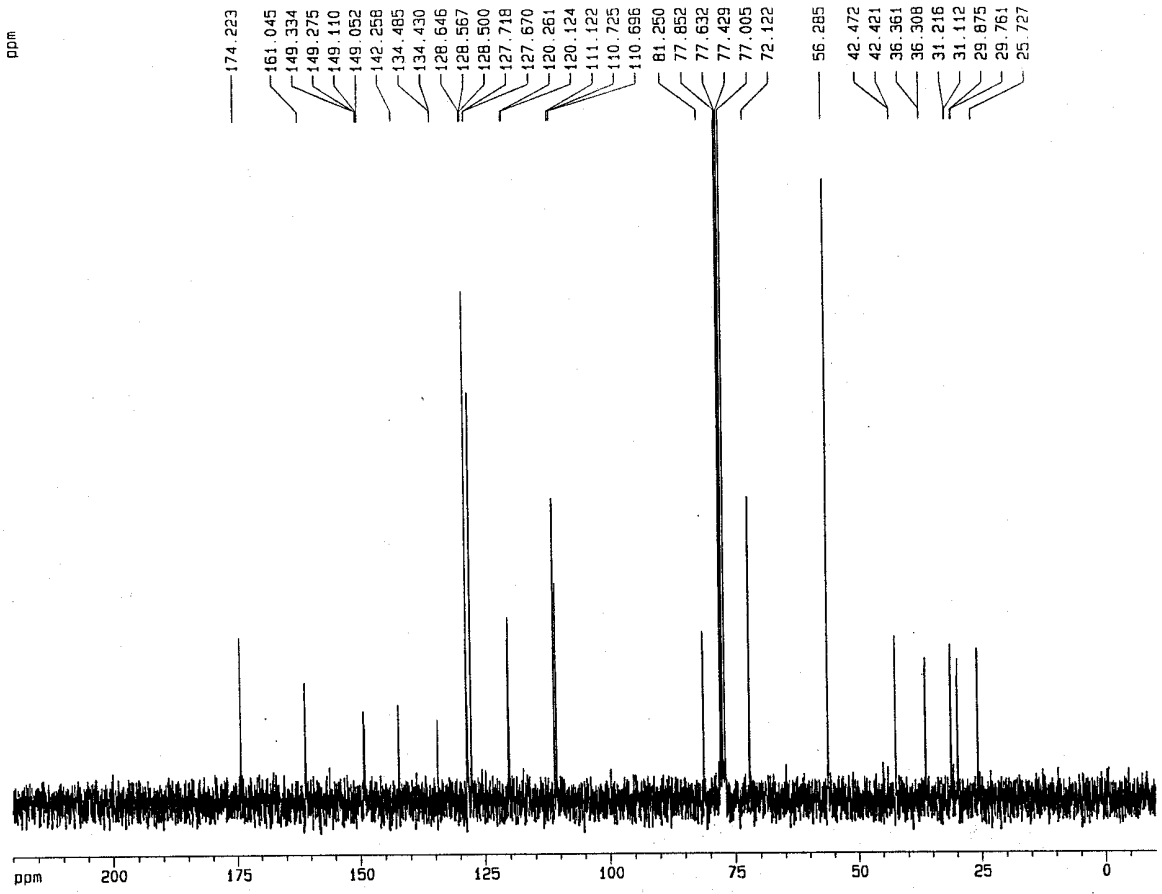


Abbildung 7: ^{13}C-Spektrum von **15**

Der als Artefakt auftretende Methylester **16** zeigt hohe R_F-Werte in allen verwendeten Fließmittelgemischen. In der HPLC eluiert **16** bei 14,4 min (Methode IV) nach den anderen Benzilsäurederivaten, vor den Benzophenonen. Die NMR-Spektren zeigen für die Aromaten mit Substituenten, das α-C-Atom, die Carboxyl- und Hydroxygruppe mit **1** übereinstimmende Signale. Zusätzlich tritt im Protonenresonanzspektrum zwischen den Signalen für die Methoxygruppen ein Singulett (3H) des Methylesters bei 3,78 ppm auf. Im ^{13}C-NMR zeigt die Methylgruppe, im höheren Feld als die Methoxygruppen, bei 53,2 ppm Resonanz. Das MS unterscheidet sich von dem von **1** durch die fehlenden Piperidinfragmente und den Molekülionenpeak bei der Massenzahl m/z 302. Alle weiteren Fragmente stimmen in ihren Massenzahlen und Intensitäten mit denen von **1** überein (vergleiche Schema 29).

Aus den wässrigen Ansätzen im sauren Milieu wurde Verbindung **18** isoliert. Sie lässt sich dc sowohl mit Dm B hellblau, als auch mit Dm C orange anfärben, woraus ein basischer 3,4-Dimethoxybenzilsäureester als Grundstruktur abgeleitet werden kann. Im MS ist der Molekülionenpeak, um 14 Masseeinheiten zur Ausgangsverbindung erhöht, bei der Massenzahl m/z 399 zu finden. Als Basispeak tritt Fragment **a** bei m/z 257 (+ 14) auf, während die Frag-

mente **b** – **i** in ihren Massenzahlen denen von **1** entsprechen (vergleiche Schema 29). Als Struktur wird daher N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxy-O-methylbenzilat vorgeschlagen (siehe Abbildung 8). Bestätigt wird dies durch ein zusätzliches Signal für eine Methoxygruppe bei 3,1 ppm im Protonenresonanzspektrum. Alle weiteren Signale stimmen mit denen von **1** überein. Es wird kein Signal einer OH-Gruppe gefunden.

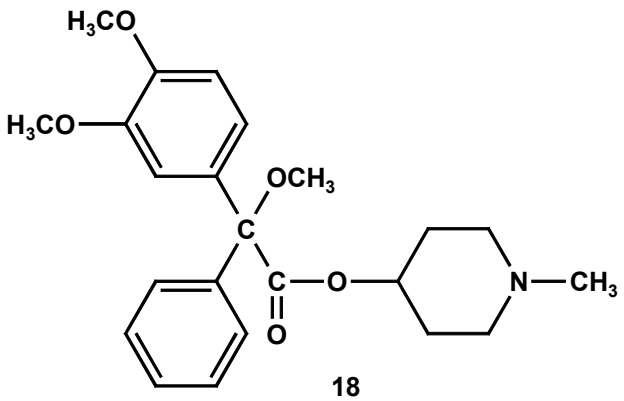


Abbildung 8: Strukturvorschlag für **18**

Für eine Reihe weiterer isolierter Verbindungen waren aufgrund der geringen Mengen nur ms Untersuchungen möglich.

Aus den nichtwässrigen Ansätzen wurde dc bei R_F = 0,43 ein in sehr geringen Mengen vorliegendes Substanzgemisch **17** isoliert, welches mit Dm B eine Hellblau-, mit Dm C eine Orange- und mit Dm D eine Rotviolettfärbung gibt. Da die einzelnen Substanzen nur in Spuren vorliegen, wurde auf die Isolierung einzelner Verbindungen verzichtet und das Gemisch ms untersucht. Aus den Fragmenten lassen sich mehrere Grundstrukturen ableiten (vergleiche Schema 29). Die Fragmente **f** – **i** waren für den N-Methylpiperidin- (m/z 99, 98, 97, 96) und den N-unsubstituierten Ring (m/z 85, 84, 83, 82) vorhanden. Die auftretenden Massenzahlen bei m/z 277 und 199 sprechen für eine Monochlorsubstitution des 3,4-Dimethoxyphenylringes. Sie werden von den Isotopenpeaks bei m/z 279 und 201 begleitet und stellen die Fragmente **a** und **b** dar. Ein Hinweis auf eine monochlorierte Verbindung mit einer phenolischen und einer Methoxygruppe ist die Massenzahl m/z 185 (Fragment **b**), begleitet vom Isotopenpeak bei m/z 187. Das entsprechende Fragment **a** bei m/z 263/265 war nicht vorhanden. Strukturbeweisend für eine O-Demethylierung sind die gefundenen Massenzahlen m/z 229, m/z 151 und m/z 123, die den Fragmenten **a** – **c** eines Hydroxymethoxybenzilsäurederivates entsprechen. Hinweise auf eine Substitution des freien Phenylringes gibt es nicht. Die Fragmente **d** und **e** treten mit den Massenzahlen m/z 105 und m/z 77 auf. Da die Verbin-

dungen in den Fließmittelgemischen II und III einen höheren R_F-Wert als **12** aufweisen, wird der intakte Ester angenommen. Die ableitbaren Strukturen sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Die Strukturbestätigung steht noch aus.

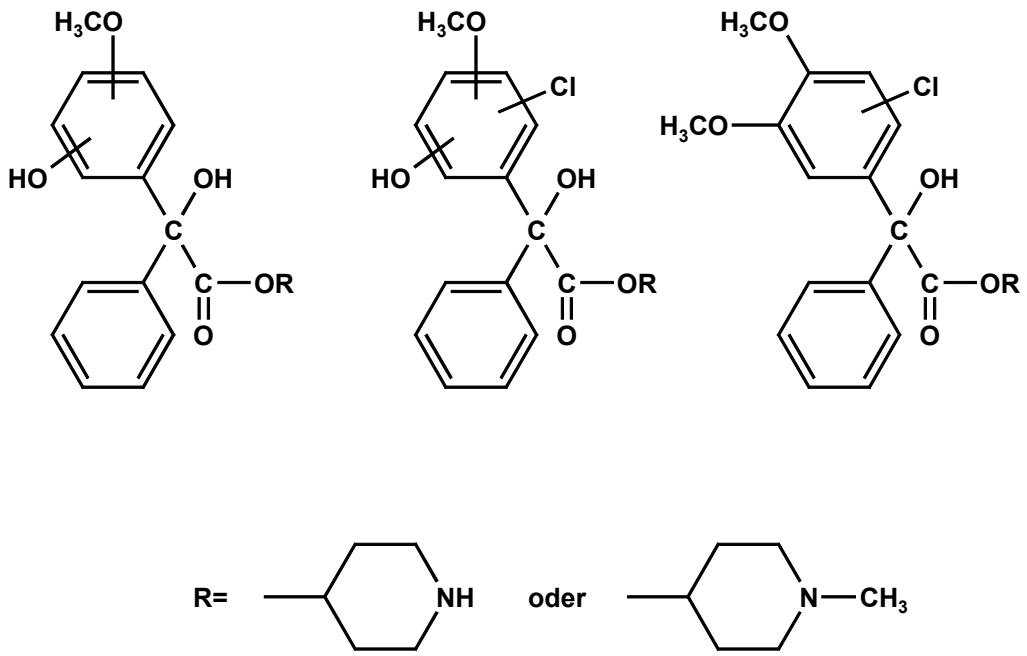


Abbildung 9: Nachweisbare Strukturelemente des Substanzgemisches **17**

Aus dem wässrigen Ansatz im sauren Milieu wurden ebenfalls chlorierte Produkte isoliert. Mit einem höheren R_F-Wert als **1** im Fließmittelgemisch II wurde das Substanzgemisch **19** isoliert. Es lässt sich mit Dm B hellblau anfärben und reagiert positiv mit Dm C.

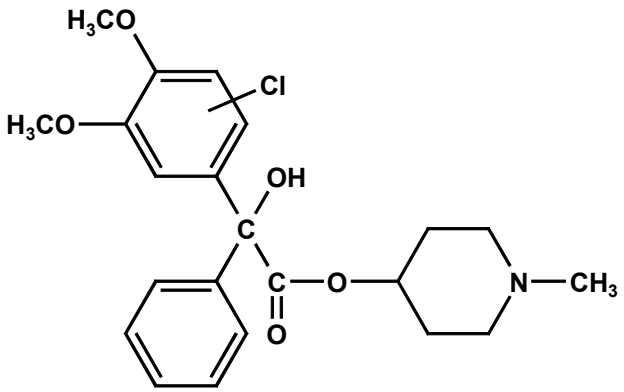


Abbildung 10: Struktur der monochlorierten Verbindungen in **19**

Im MS sind die Fragmente **a** – **i** der monochlorierten Ausgangsverbindungen, begleitet von den jeweiligen, um zwei Masseeinheiten erhöhten Isotopenpeaks, erkennbar (vergleiche Schema 29). Der entsprechende Molekülionenpeak bei m/z 420/422 ist nicht vorhanden.

Basispeak ist Fragment **d** des unveränderten Phenylringes. Neben den bekannten Fragmenten tritt eine Reihe weiterer Massenzahlen mit moderaten Intensitäten auf, die keinen Strukturelementen zugeordnet werden konnten. Hplc sind mehrere Peaks mit Retentionszeiten zwischen 13,0 und 15,0 min unterscheidbar. Es kann sich bei **19** um die Stellungsisomere der monochlorierten Verbindung oder um bisher unbekannte Derivate handeln. Abbildung 10 gibt die Struktur der monochlorierten Ausgangsverbindung wieder.

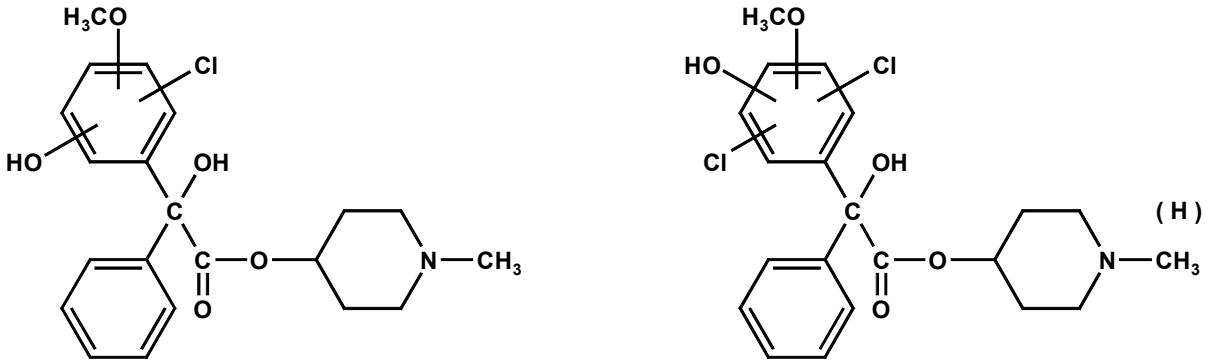


Abbildung 11: Nachweisbare Strukturen in **20**

Unter **20** werden mehrere chlorierte Verbindungen zusammengefasst. Sie unterscheiden sich z. T. in ihren R_F- und R_T-Werten, sind jedoch nicht eindeutig zuzuordnen. Neben der Hellblaufärbung mit Dm B und der Orangefärbung mit Dm C zeigen sie rotviolette bis violette Färbungen mit Dm D, ein Hinweis auf phenolische Strukturen. Aus dem MS sind drei Grundstrukturen ableitbar (siehe Abbildung 11): eine Methoxygruppe der Ausgangsverbindung wurde gespalten und der substituierte Aromat einfach oder zweifach chloriert. Die monochlorierten Verbindungen liegen als N-Methyl-4-piperidinylester vor. Für die dichlorierten Verbindungen ist zusätzlich der 4-Piperidinylester möglich. Durch das Auftreten des Molekülionenpeaks bei m/z 439 ist die Dichlorierung und die Spaltung einer Methoxygruppe nachgewiesen. Das charakteristische Isotopenmuster zweier Chloratome zeigt sich bei Fragment **a** mit den Massenzahlen m/z 297, 299 und 301 mit den Intensitätsverhältnissen von 10 : 7 : 1. Die Fragmente **b** und **d** – **i** sind vorhanden. Fragment **c** fehlt (vergleiche Schema 29). Die Fragmente **f** – **i** des N-demethylierten Piperidinrestes mit m/z 85, 84, 83 und 82 lassen sich ebenso nachweisen. Für die entsprechenden monochlorierten Verbindungen ist nur der N-Methylpiperidinrest nachweisbar. Neben dem Molekülionenpeak bei m/z 405/407 treten Fragment **a** bei m/z 263/265, Fragment **b** bei m/z 185/187 und die Fragmente **d** – **i** auf. Fragment **c** wird nicht gebildet. Das Verhältnis der Intensitäten der Isotopenpeaks monochlorhaltiger Fragmente ist 10 : 3.

Zur Struktur und den analytischen Eigenschaften der Benzophenonderivate **8** und **9** siehe unter 4.2.2.1.

3.2.2.2 Quantitative Bestimmungen

Neben der qualitativen Erfassung sollen für einen Teil der verwendeten Systeme die Umsetzungen quantifiziert und verglichen werden. Da für die meisten Reaktionsprodukte keine Vergleichssubstanzen in gesicherter Qualität, hinsichtlich Reinheit und Gehalt, vorlagen, wurde die Umsetzung über die Abnahme des Gehaltes an Ausgangsverbindung **1** im Reaktionsansatz verfolgt. Dies hat zudem den Vorteil, dass eine Trennung der Derivate von dem Überschuss an Ausgangssubstanz nicht nötig ist und eine mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen wird. Die Quantifizierung erfolgte über die Flächen des Substanzpeaks in der HPLC mit Methode IV. Die Bestimmungsmethode wurde validiert (siehe 4.5.4).

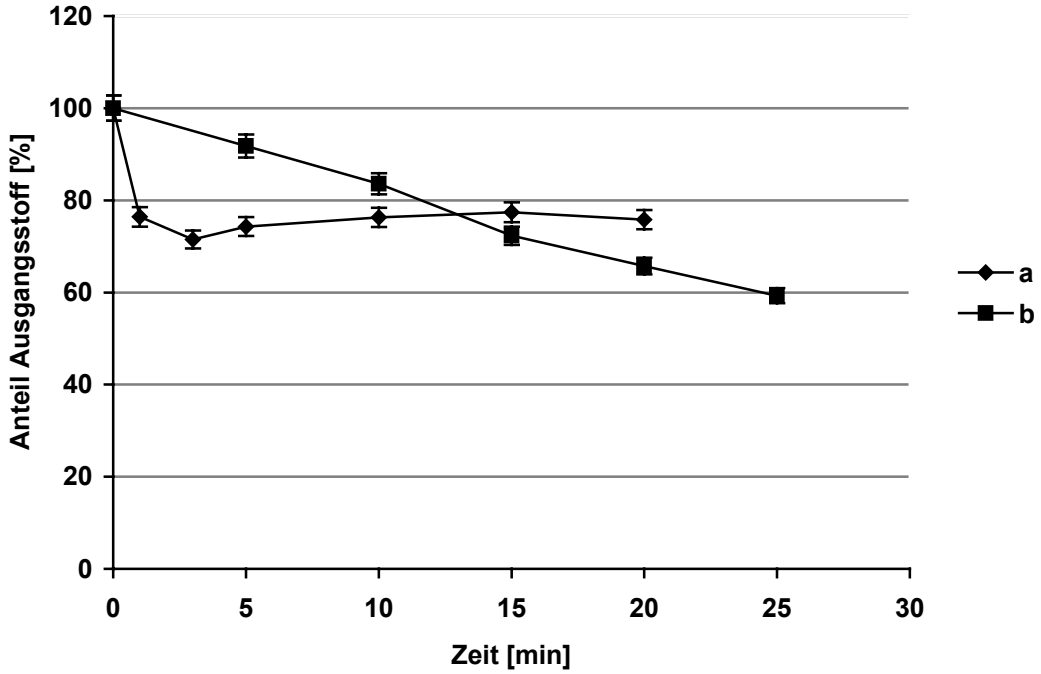


Abbildung 12: Prozentuale Abnahme der Fläche des Peaks von **1** a) bei sofortiger Zugabe und b) bei zeitlich gestaffelter Zugabe des O-Donators

Vor der Zugabe des Wasserstoffperoxids wurden je zwei Proben entnommen, ihre Flächen doppelt bestimmt und der Durchschnittswert gleich 100 % gesetzt. Die durchschnittliche prozentuale Abnahme der Flächen, berechnet aus den Doppelbestimmungen zweier Proben,

wurden als Maß der Umsetzung benutzt. In Vorversuchen wurde der zeitliche Ablauf der Umsetzungen bei sofortiger, vollständiger Zugabe des Sauerstoffdonators (Bolus-Methode) und bei zeitlich gestaffelter Zugabe der gleichen Gesamtmenge erfasst. Die Umsetzungen sind in Abbildung 12 zu verfolgen. Es ist erkennbar, dass bei sofortiger Zugabe bereits nach der ersten Minute die Umsetzung abgeschlossen ist. Bei der Zugabe von Teilmengen ist nach jeder Zufuhr eine weitere Abnahme der Fläche zu beobachten, unter Zunahme der Flächen aller Umsetzungsprodukte. Der Katalysator ist also noch aktiv und nicht zerstört worden.
Insgesamt wurde eine höhere Umsetzung bei gleicher Menge an Wasserstoffperoxid erreicht. Der weitere Verlauf bei portionsweiser Zugabe höherer Mengen wurde nicht verfolgt. Möglicherweise bietet sich hier jedoch eine Möglichkeit zur Steigerung der Umsetzungsraten.

Biomimetisches System	Prozentuale Umsetzung	Flächen der Reaktionsprodukte			
		12 und **14**	**13**	**15**	**8**
MnTPFPPCl/Imidazol [a]	45,2 %	678,4	770,4	1111,0	137,2
MnTPFPPCl/Imidazol [b]	43,9 %	671,6	705,1	812,9	108,3
MnTPFPPCl/Imidazol [c]	48,9 %	1034,4	719,9	638,9	208,1
MnTPFPPCl/Pyridin [b]	48,3 %	420,0	762,3	963,9	108,3
FeTPFPPCl/Imidazol [b]	14,9 %	0	90,2	270,3	0
- [b]	0,7 %	0	0	0	0
$MnTPFPS_4PCl$/Imidazol [d]	23,2 %	353,0	0	374,1	456,4
$MnTPFPS_4PCl$/Imidazol [e]	7,9 %	76,2	0	0	76,9
$FeTPFPS_4PCl$/Imidazol [d]	10,7 %	47,4	0	0	112,1
- [d]	2,5 %	0	0	0	0
- [e]	0 %	0	0	0	0

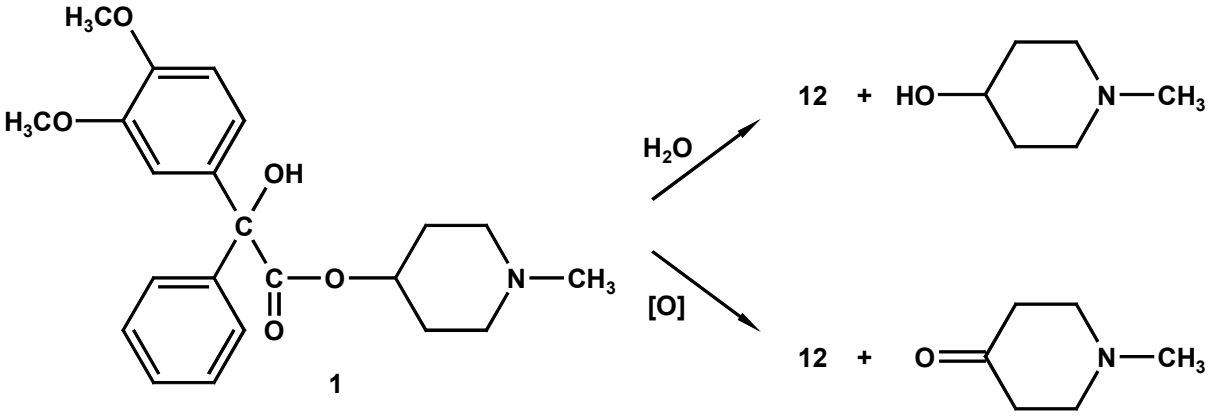
Tabelle 5: Prozentuale Umsetzung von **1** in biomimetischen Systemen ([a] in Dichlormethan/ Acetonitril 1 : 1, [b] in Acetonitril, [c] in Acetonitril/Methanol 1 : 1, [d] in Wasser pH-Wert = 7 – 8, [e] in Wasser pH-Wert = 1)

In Tabelle 5 sind die prozentualen Umsetzungen von **1** unter den Bedingungen der Bolus-Methode in ausgewählten Systemen dargestellt. Beispielhaft werden für je eine Bestimmung die Flächen der Reaktionsprodukte aufgeführt, um den Einfluss der Parameter auf die einzel-

nen Reaktionen zu verdeutlichen. Aus dem Vergleich der Umsetzungen lässt sich in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten ableiten, dass Manganporphyrine eine höhere Aktivität als die entsprechenden Eisenporphyrine zeigen und Pyridin als Co-Katalysator stärker wirksam als Imidazol ist. Im nichtwässrigen Milieu zeigt die Zusammensetzung des organischen Lösungsmittels einen geringen Einfluss auf den Gesamtumsatz. Mit steigender Polarität des Lösungsmittels werden jedoch vermehrt **12** und **14** gebildet. Verbindung **15** entsteht in geringerem Ausmaß. Erstmals wurden Umsetzungen im wässrigen Milieu quantifiziert. Sie liegen in diesen Untersuchungen deutlich unterhalb der effektivsten Systeme im nichtwässrigen Milieu, vergleichbar der Katalyse mit dem Eisenporphyrin.
Das wasserlösliche Eisenporphyrin zeigt eine deutlich geringere Aktivität als das entsprechende Manganporphyrin. Die Verringerung des pH-Wertes führt zu einer Abnahme der Umsetzungen. Dc ist eine vermehrte Bildung von chlorierten Nebenprodukten mit abnehmendem pH-Wert zu beobachten.

3.2.2.3 Untersuchungen zur oxidativen Esterspaltung

In den letzten Jahren gelang der Nachweis, dass *in vivo* eine oxidative Esterspaltung möglich ist [31][32]. Da in biomimetischen Ansätzen die Esterspaltung im Gegensatz zu den Vergleichsansätzen wesentlich erhöht ist, sollte der Reaktionsmechanismus hinsichtlich hydrolytischer oder oxidativer Spaltung untersucht werden.



Schema 30: Mögliche Reaktionswege der Esterspaltung

Eine Unterscheidung ist über die Erfassung der Reaktionsprodukte möglich. Auf hydrolytischem Weg entsteht neben der Säure das N-Methylpiperidinol. Die oxidative Spaltung führt zum entsprechenden Piperidonderivat (siehe Schema 30).

Es wurde eine GC-MS-Methode erarbeitet, die eine Trennung des N-Methyl-4-piperidons vom N-Methyl-4-piperidinol ermöglicht. Zusätzlich wurde 4-Piperidinol in die Untersuchungen mit einbezogen, da die Esterspaltung von **14** ebenfalls möglich ist. In Abbildung 13 ist das Chromatogramm einer Lösung von N-Methyl-4-piperidon und N-Methyl-4-piperidinol in Acetonitril nach Extraktion mittels Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction, SPME) zu sehen. 4-Piperidinol zeigt die gleiche Retention wie N-Methyl-4-piperidinol.

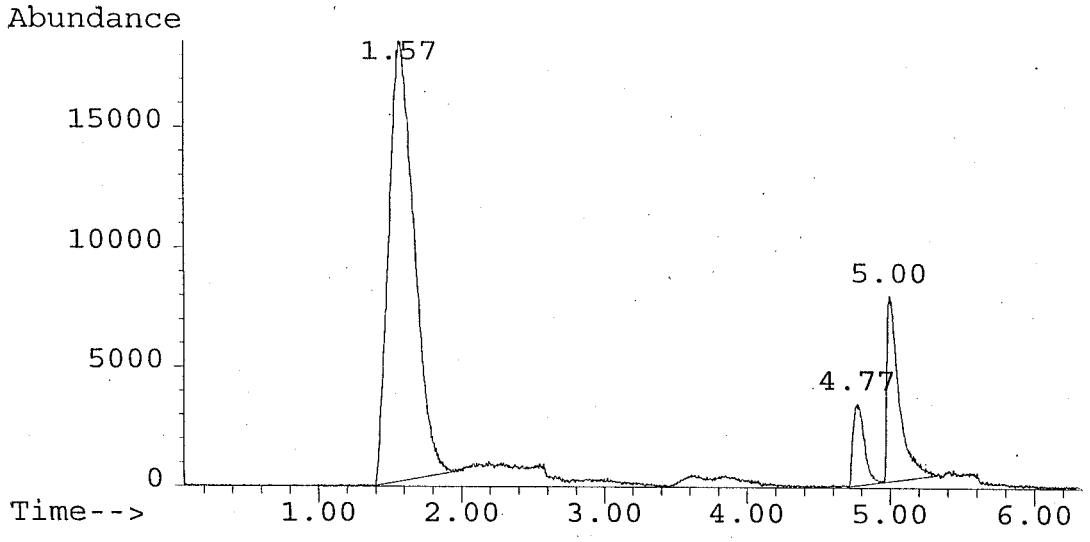


Abbildung 13: Gaschromatogramm einer Vergleichslösung von N-Methylpiperidin-4-ol (R_T = 5,00 min) und -4-on (R_T = 4,77 min)

Mittels der erarbeiteten Methode wurden in dem biomimetischen System MnTPFPPCl/Imidazol/Wasserstoffperoxid nach der Umsetzung von **1** N-Methyl-4-piperidon und N-Methyl-4-piperidinol in etwa gleichen Mengen über die R_T-Werte und die Massenspektren nachgewiesen. Die Spaltung des Esters erfolgt zu etwa gleichen Teilen auf hydrolytischem und oxidativem Weg. In Vergleichsansätzen mit N-Methyl-4-piperidol wurde die Bildung des N-Methyl-4-piperidons durch Oxidation des Alkohols ausgeschlossen.

Die charakteristischen Fragmente des MS von 4-Piperidinol waren nicht vorhanden. Damit kann die Bildung von **12** aus **14** ausgeschlossen werden.

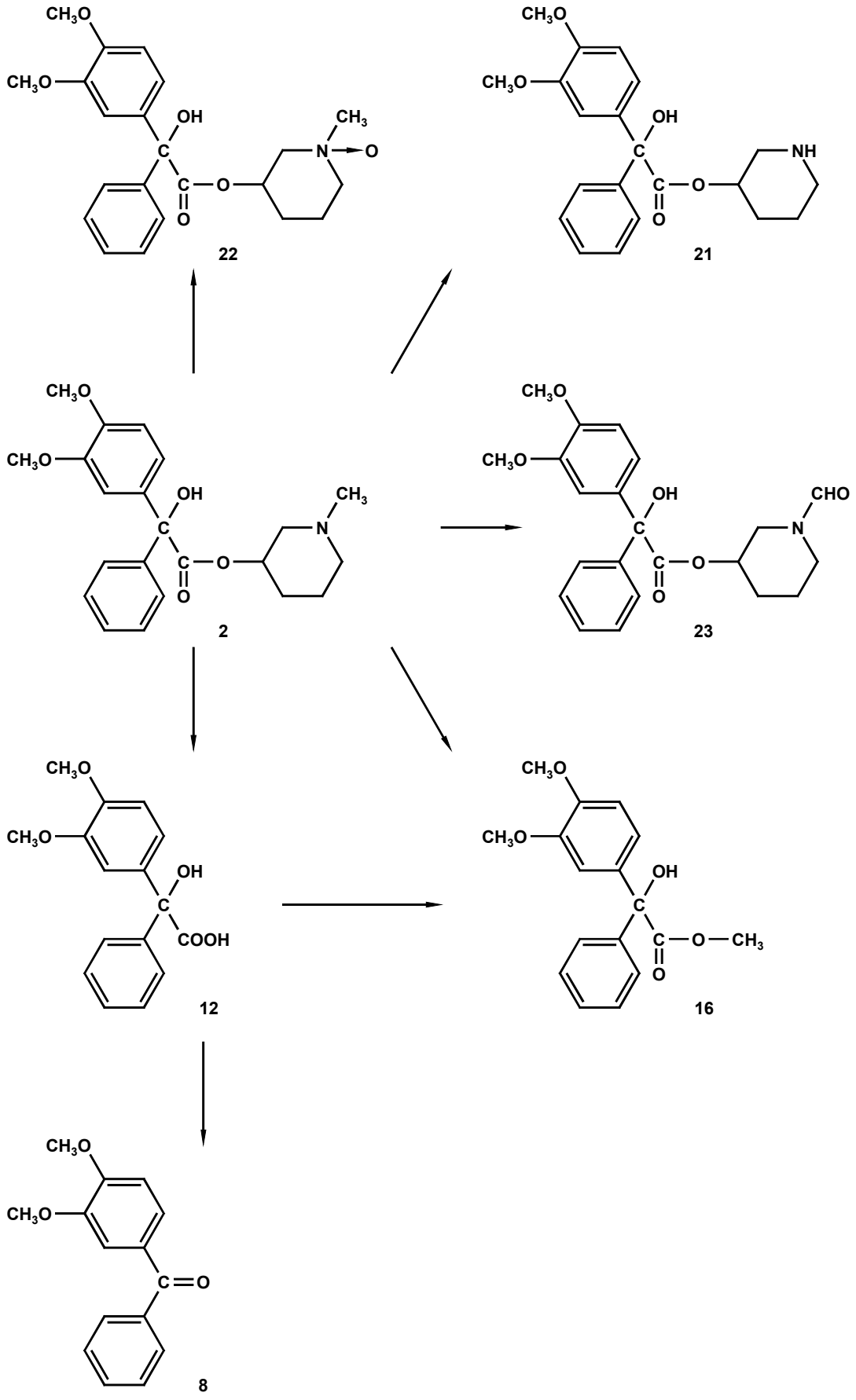
Zum Vergleich verschiedener Systeme sollten die Piperidinderivate quantifiziert werden. Da die direkte Aufgabe der Proben eine zu hohe Probenbelastung der GC-Trennsäule darstellt, war die Isolierung der Piperidinderivate aus dem Ansatz notwendig. Eine Trennung mittels DC führte nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen. Da die Verbindungen eine geringe Molmasse und einen niedrigen Schmelzpunkt aufweisen, schien eine Extraktion mittels SPME erfolgversprechend. Mit einer Polyacrylatfaser gelang in der Headspace-Technik die selektive

Extraktion der Piperidinderivate in ausreichender Menge. Problematisch war die Wahl des verwendeten Lösungsmittels, da chlorierte Verbindungen die Faser irreversibel zerstören. Unter 3.2.2.2 wurde nachgewiesen, dass die Verwendung von reinem Acetonitril an Stelle des Dichlormethan-Acetonitril-Gemisches zu qualitativ und quantitativ vergleichbaren Umsetzungen führt. Bei Verwendung von Acetonitril-Methanol-Gemischen sind geringe Beeinflussungen der Umsetzungen zu erkennen, insbesondere wurden vermehrt **12** und **14** gebildet. Für die zu untersuchenden Ansätze wurde daher Acetonitril als Lösungsmittel gewählt. Ein weiteres Problem lag darin, dass die gefundenen Konzentrationen der Piperidinderivate unter der geschätzten Konzentration an **12** lagen und die Mengenverhältnisse nicht plausibel in Übereinstimmung zu bringen waren. Untersuchungen mit Lösungen, die einen definierten Gehalt an N-Methyl-4-piperidinol und N-Methylpiperidon enthielten, und die reinem Acetonitril oder dem Ansatz vor und nach Zugabe des Wasserstoffperoxids zupipettiert wurden, zeigten, dass die Wiederfindungsraten der Piperidinderivate in den biomimetischen Ansätzen dramatisch abfallen. Da dies unabhängig von einer möglichen Oxidation durch Wasserstoffperoxid ist, wird eine irreversible Bindung der Piperidine, möglicherweise an den Katalysator, angenommen. Eine Quantifizierung ist daher auf diesem Weg nicht möglich. Die Bestimmung der entstandenen Säure war ebenfalls nicht erfolgreich, da **12** nicht in ausreichender Reinheit synthetisiert werden konnte und zudem in Lösungen instabil ist.

3.2.3 Umsetzungen mit N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (2)

Die biomimetischen Umsetzungen von **2** erfolgten in verschiedenen, in Tabelle 6 zusammengefassten Reaktionsansätzen. Die Produktspektren sind ebenfalls in Tabelle 6 aufgeführt. Für die wasserfreien Ansätze wurde die freie Base verwendet, im wässrigen Milieu das Hydrochlorid.

Die Reaktionsprodukte werden durch die Funktionalisierungsreaktionen N-Oxidation, N-Demethylierung, C-Oxidation, Esterspaltung und Decarboxylierung gebildet. Das Produktspektrum ist in Schema 31 in der Übersicht dargestellt. In den Vergleichsansätzen ohne Katalysator konnten neben der Ausgangssubstanz keine weiteren Produkte nachgewiesen werden, mit Ausnahme des als Artefakt in allen Ansätzen nachgewiesenen Substanzgemisches **24** (siehe unten). Im nichtwässrigen Milieu wurde zusätzlich in Spuren das N-Oxid **22** detektiert. Insgesamt wurde in den biomimetischen Reaktionsansätzen im Vergleich zu den Untersuchungen mit **1** wesentlich weniger Ausgangsverbindung katalytisch umgesetzt.



Schema 31: Biomimetisches Produktspektrum der Umsetzungen von **2**

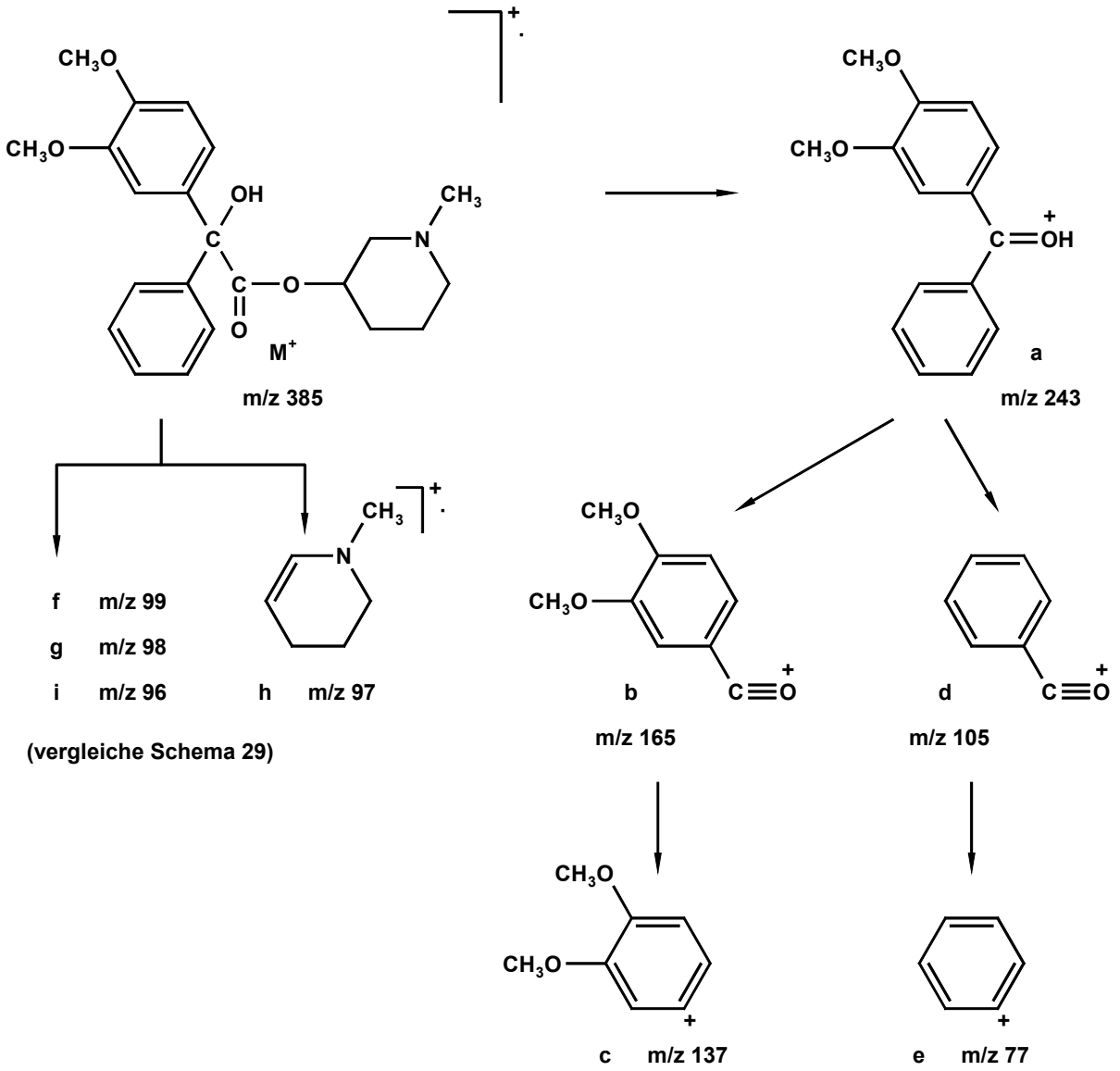
Katalysator	Co-Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Reaktionsprodukte
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**8**, **12**, **16**, **21**, **22**, **23**, **24**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**22**, **24**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**8**, **21**, **22**, **24**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**8**, **21**, **24**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**24**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**24**

Tabelle 6: Übersicht der biomimetischen Umsetzungen mit **2**

Die Fragmentierung im EI-MS entspricht der anderer Benzilsäurederivate. Unterschiedlich zu den Fragmentierungen von **1** oder Propiverin ist der Zerfall des Piperidinringes. Während für 4-Piperidinylringe Fragment **f** die höchste Intensität zeigt, ist dies bei 3-Piperidinylringen Fragment **h**, welches für **2** sogar den Basispeak bildet. In Schema 32 ist die Fragmentierung von **2** dargestellt.

Mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken lassen sich die Strukturelemente von **2** und seinen Derivaten eindeutig nachweisen. Für **2** zeigen die Methylenprotonen bei 1,32/1,75 ppm bzw. 1,47/1,62 ppm Resonanz und korrelieren mit den ^{13}C-Signalen bei 28,4 ppm bzw. 22,3 ppm. Die N-Methylenprotonen treten bei 2,11/2,36 ppm bzw. 2,11/2,59 ppm als Multipletts zusätzlich mit dem Signal der N-Methylgruppe bei 2,13 ppm auf. Im Kohlenstoffresonanzspektrum lassen sich die Signale bei 58,6 ppm bzw. 55,1 ppm den N-Methylengruppen und bei 46,1 ppm der N-Methylgruppe zuordnen. Die Methingruppe des Piperidinylringes ist bei 4,9 ppm als Multiplett im ^{1}H-NMR und im ^{13}C-NMR bei 72,1 ppm zu finden. Die aromatischen Methoxygruppen treten als zwei Singuletts bei 3,7 ppm bzw. 3,8 ppm im ^{1}H-NMR auf und korrelieren mit den Kohlenstoffsignalen bei 55,79/55,84 ppm. Die Zuordnung der Aromatensignale erfolgte analog der von **8** und **1**. C5 zeigt ein Protonensignal bei 6,73 ppm in Korrelation zum ^{13}C-Signal bei 110,2 ppm. Für C2 liegen die Signale bei 6,98 ppm und 110,7 ppm, für C6 bei 6,94 ppm und 119,7 ppm. Die quartären Kohlenstoffatome zeigen Resonanz bei 142,4 ppm für C1, bei 148,5 ppm für C4 und bei 148,6 ppm für C3. Die Resonanzen des unsubstituierten Ringes liegen bei 7,19 – 7,32 ppm und 127,3/127,9/128,0 ppm, für das quartäre C-Atom bei 134,5 ppm. Weitere Kohlen-

stoffsignale bei 80,7 ppm und 173,7 ppm lassen sich dem zentralen C-Atom und dem Carboxyl-C-Atom zuordnen. Die OH-Gruppe ist als sehr breites Signal bei 4,6 ppm erkennbar.



Schema 32: Fragmentierung von **2** im EI-MS

Die N-Demethylverbindung **21** wurde dc im Fließmittelgemisch III mit Dm C und hplc mit Methode IV bei einem R_T = 12,3 min charakterisiert. Im EI-MS ist der Molekülionenpeak nur mit schwachen Intensitäten erkennbar. Strukturbeweisend sind die Piperidinylfragmente mit den um jeweils 14 Masseeinheiten erniedrigten Massenzahlen m/z 85, 84, 83 und 82, wobei Fragment **h** eine wesentlich geringere Intensität als beim Zerfall von **2** aufweist. Die weitere Fragmentierung entspricht der von **2** (vergleiche Schema 32). Basispeak ist Fragment **d**. In den NMR-Spektren fehlen die Signale für die N-Methylgruppe. Starke Verschiebungen im Vergleich zu **2** treten nur für die N-Methylengruppen auf. Ihre Protonensignale sind ins tiefe

Feld auf 2,57 ppm bzw. 2,72/2,82 ppm verschoben. Die ^{13}C-Signale finden sich im hohen Feld bei 45,4 ppm (+ 9,7) bzw. 49,1/49,2 ppm (+ 9,5). Leicht verschoben sind auch die Signale der Methingruppe bei 4,8 ppm (- 0,1) im Protonenresonanzspektrum und 71,3 ppm (+ 0,8) im ^{13}C-NMR. Die weiteren Signale sind unverändert. Einige ^{13}C-Signale treten als Doppelsignale auf. Die Signale der OH- oder NH-Gruppe sind nicht erkennbar.

Für das N-Oxid **22** zeigt sich dc (Fließmittelgemisch III) mit Dm C und hplc (Methode IV) jeweils nur ein Peak. In den NMR-Spektren treten einige Signale als Doppelsignale auf, was auf zwei isomere Formen des N-Oxids oder die unterschiedlichen Diastereomerenpaare hinweisen kann. Die Intensitätsunterschiede sind sehr verschieden und reichen von 1 : 2 bis 2 : 1 für jeweils unterschiedliche Signale sowohl im ^{1}H- als auch im ^{13}C-NMR. Strukturbeweisend treten die Signale des Piperidinringes im Vergleich mit den spektralen Daten von **2** stark verschoben auf. Die N-Methylgruppe zeigt am stärksten tieffeldverschoben bei 2,93/2,97 ppm (+ 0,8) und 59,48/59,54 ppm (+ 13,3) Resonanz. Die Signale der N-Methylengruppen sind weniger stark verschoben. Die N-Methylengruppe in 6-Position des Piperidinringes tritt bei 2,88/3,06 ppm (+ 0,8) im Protonenresonanzspektrum und bei 66,1 ppm (+ 11,0) im ^{13}C-NMR auf. Die Signale der N-Methylengruppe in 2-Position liegen für beide Isomere bei 3,60 ppm (+ 1,5/0,8) und bei 67,3 ppm (+ 8,7). Die dem Stickstoff näherliegende Methylengruppe in Position 5 ist im Protonenresonanzspektrum bis zu + 0,5 ppm auf 1,52/2,11 ppm und im Kohlenstoffresonanzspektrum um - 3,8 ppm auf 18,52/18,55 ppm verschoben. Ähnlich sind auch die Resonanzen der Methingruppe auf 5,4 ppm (+ 0,5) und 68,32/68,36 ppm (- 3,7) verschoben. Für die Methylengruppe in 4-Position des Heterozyklus finden sich die Protonensignale bei 1,23/1,88 ppm und die ^{13}C-Signale bei 26,95/27,05 ppm (- 1,4). Nur geringfügig haben sich die Resonanzen der anderen Atome geändert. Im ^{13}C-NMR treten sie doppelt auf, ebenso die Signale der aromatischen H-Atome des substituierten Ringes im Protonenresonanzspektrum. Das Signal der OH-Gruppe ist nicht vorhanden. Die Massenspektroskopie ist zur Strukturklärung von **22** nicht geeignet. Im EI-MS treten der Molekülionenpeak und das nach Abspaltung des Sauerstoffs vom N-Oxid zu erwartende Fragment mit der Massenzahl m/z 385 nicht auf. Die erkennbaren Fragmente **a – e** entsprechen dem Zerfallsmuster von 3,4-Dimethoxybenzilsäurederivaten, mit Fragment **d** als Basispeak (siehe Schema 32). Als Schlüsselbruchstück des N-Methyl-3-piperidinylrestes ist Fragment **h** mit hoher Intensität im MS vorhanden.

Die Menge an isolierbarer Verbindung **23** war für NMR-Untersuchungen zu gering. Zur Struktursicherung waren deshalb nur die ms Daten verwendbar. Im EI-MS tritt der Molekülionenpeak bei der Massenzahl m/z 399 auf, dem die Summenformel $C_{22}H_{25}NO_6$ entspricht.

Die Fragmente **a** – **e** entsprechen der Fragmentierung des 3,4-Dimethoxybenzilsäurerestes (siehe Schema 32). Das Fragment mit der Massenzahl m/z 113 stellt möglicherweise das um 16 Masseeinheiten erhöhte Fragment **f** dar (vergleiche Schema 29). Als Struktur wird eine N-Formylgruppe angenommen (siehe Abbildung 14).

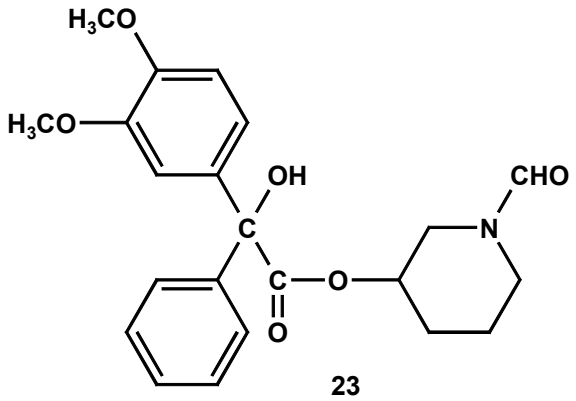


Abbildung 14: Postulierte Struktur von **23**

Es ist alternativ eine Lactamstruktur denkbar. Dc hat die Substanz im Fließmittelgemisch VI einen R_F-Wert von 0,63. Ihr R_T-Wert mit Methode IV ist 12,9 min.

Auf die analytische Untersuchung des Substanzgemisches **24** wurde verzichtet, da es sich hierbei um durch Artefakte gebildete Substanzen handelt, die in allen Ansätzen in Spuren nachgewiesen wurden. Das Gemisch ist dc durch den R_F-Wert von 0,53 im Fließmittelgemisch II und die Färbung mit Dm B (hellblau) und Dm D (rotviolett) gekennzeichnet. Ähnliche Substanzgemische wurden bei den biomimetischen Umsetzungen mit **1** und **3** detektiert und in ihren Strukturen untersucht. In Analogie zu diesen Untersuchungen werden auch für **24** an den Aromaten chlorierte Verbindungen angenommen.

Zur Struktur und analytischen Charakterisierung von **12**, **8** und **16** siehe unter 4.2.2.1.

3.2.4 Umsetzungen mit N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (3)

Die Zusammensetzung der Reaktions- und Vergleichsansätze und die gefundenen Produkte der Umsetzungen mit **3** sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Im nichtwässrigen Milieu werden die Produkte durch Katalyse der Funktionalisierungsreaktionen Esterspaltung (**25**), N-Oxidation (**26**), N-Dealkylierung (**27**), C-Oxidation (**28**) und oxidative Decarboxylierung (**29**) gebildet. Weiterhin traten Produkte von Um- oder Veresterung (**30**), Methylierung (**31**) und in

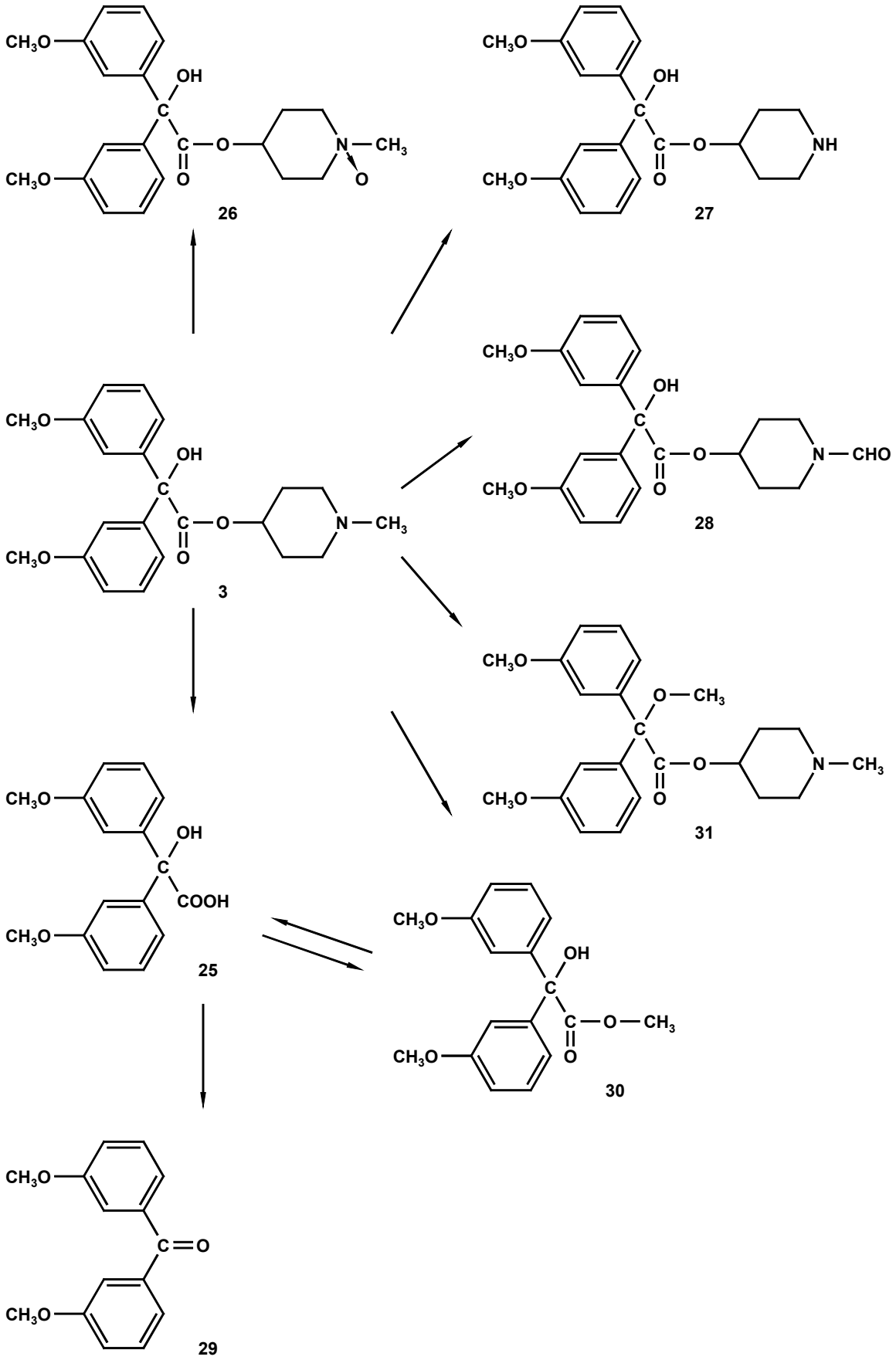
Spuren von unbekannten Reaktionen auf. Hauptumsetzungsprodukte im nichtwässrigen Milieu sind **26**, **27** und **28**.

Katalysator	Co-Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Produkte
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**25**, **26**, **29**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **32**, **33**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**25**, **28**, **33**, **34**, **35**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 6 – 8	**25**, **33**, **34**
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser pH-Wert = 1	**33**, **34**
-	-	-	Wasser pH-Wert = 1	**33**

Tabelle 7: Biomimetische Reaktionsansätze mit **3**

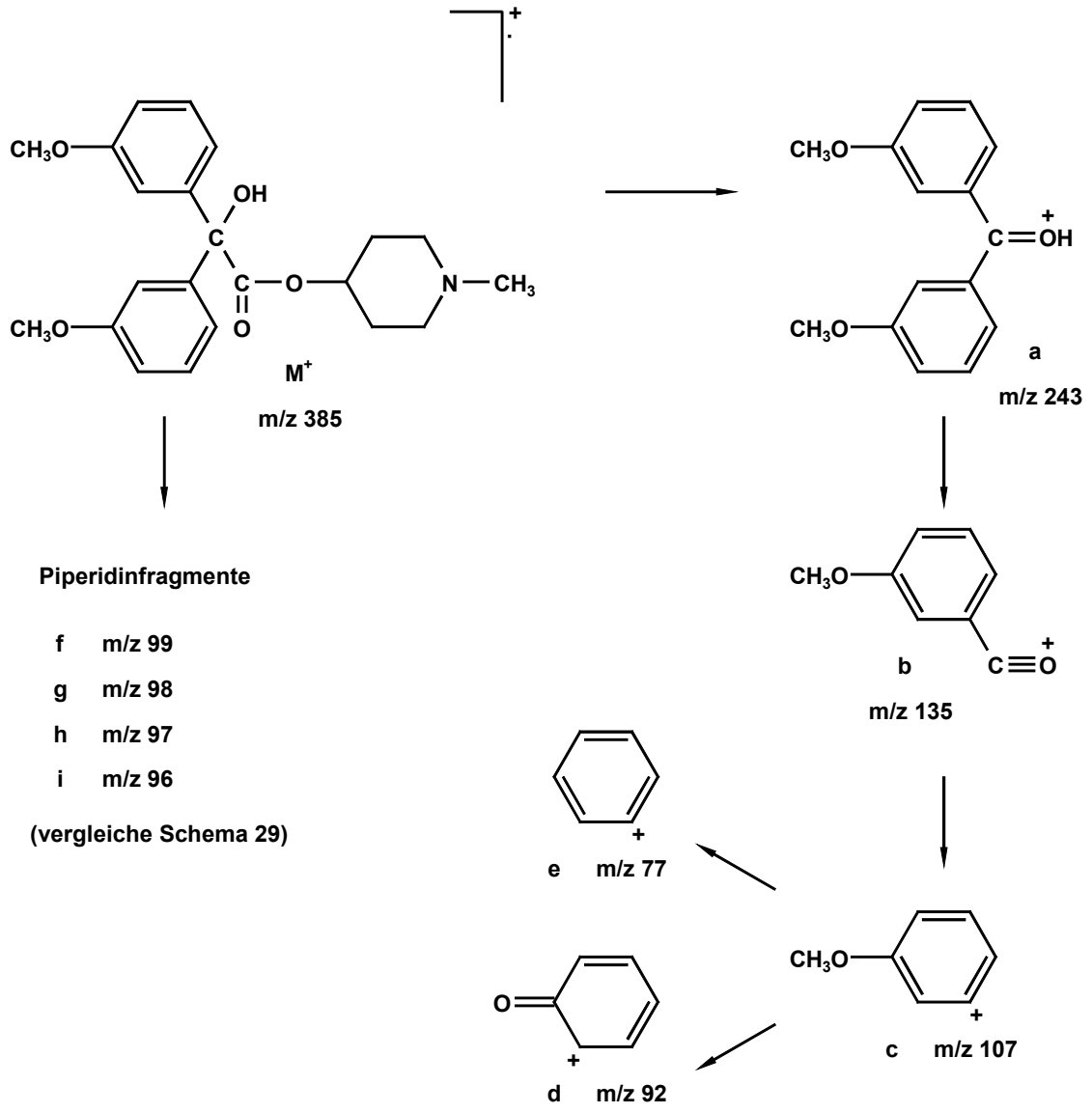
Im Vergleichsansatz ohne Katalysator sind in geringerem Umfang N-Oxidation (**26**), Esterspaltung (**25**) und Decarboxylierung (**29**) zu beobachten. Eine Übersicht der katalysierten Reaktionen und ihrer Produkte gibt Schema 33. In den wässrigen Umsetzungen sind, in geringerer Ausbeute und in Abhängigkeit vom pH-Bereich, analoge Produktspektren nachweisbar. Im neutralen pH-Bereich können mit Ausnahme von **30** und **31** alle Produkte isoliert werden. Hauptumsetzungsprodukte sind jedoch **25** und **28**. Zusätzlich tritt in Spuren ein am aromatischen Ring monohydroxyliertes Produkt auf (**32**). Es konnte jedoch nur im Gemisch mit einem nach Methoxygruppenspaltung entstehenden Derivat (**33**) isoliert werden.

Verbindung **33** lässt sich in allen wässrigen Ansätzen nachweisen und ist daher als ein Artefakt anzusehen, der nicht durch die Reaktion mit dem Katalysatorsystem oder Wasserstoffperoxid entsteht. Im Vergleichsansatz im neutralen pH-Bereich ohne Katalysator lässt sich wenig freie Säure **25** und in Spuren neben **33** auch monochloriertes **33** (**34**) nachweisen. Im sauren Milieu ist die Umsetzungsrate nochmals vermindert. Neben wenig **25** und **28** wurden in Spuren nach Methyletherspaltung **33** und nach Methyletherspaltung und Chlorierung mono- und dichlorierte Derivate (**34**, **35**) identifiziert. Letztere traten im Vergleichsansatz ebenfalls auf.



Schema 33: Biomimetisches Produktspektrum von **3** im nichtwässrigen Milieu

Zur hplc Charakterisierung wurde eine Methode neu entwickelt. Die Trennung aller Derivate war mit einer RP 18-select B-Säule als stationäre Phase und einem Acetonitril-Phosphatpuffer (pH-Wert = 7,50)-Gemisch als mobile Phase im Gradientenverlauf möglich (Methode III). Es eluieren zuerst Derivate mit sauren Eigenschaften, dann neutrale Produkte und abschließend basische Verbindungen.



Schema 34: Zerfallsschema von **3** im EI-MS

Die Ausgangsverbindung **3** zeigt im EI-MS den Molekülionenpeak [M^+] mit der Massenzahl m/z 385 in geringer Intensität. Als strukturbeweisende Fragmente treten auf (siehe Schema 34): Fragment **a** bei m/z 243 für die Benzilsäurestruktur; Fragment **b** bei m/z 135 und Fragment **c** bei m/z 107 für die Methoxyphenylringe. Fragment **d** bei m/z 92 stellt möglicherweise

ein durch Abspaltung eines Methylradikals von **c** entstehendes Zerfallsprodukt des methoxylierten Ringes dar. Der Piperidinylrest zerfällt zu den Fragmenten **f** – **i** mit den Massenzahlen m/z 99, 98, 97 und 96 (vergleiche Schema 29 und 32).

Die Zuordnung der Signale der aromatischen Kohlenstoffatome im ^{13}C-NMR erfolgte nach den mit Hilfe eines Inkrementsystems berechneten [101] Verschiebungen (siehe Tabelle 8).

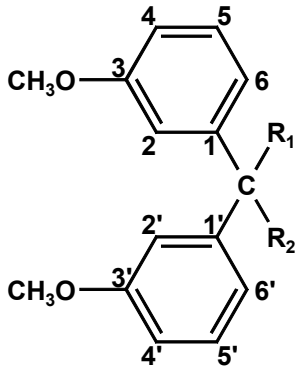


Abbildung 15: Nummerierung von **3**

C-Atom	1, 1‘	2, 2‘	3, 3‘	4, 4‘	5, 5‘	6, 6‘
berechnet [ppm]	151,5	110,1	159,4	110,4	129,0	117,1
gemessen [ppm]	143,5	113,4	159,3	113,4	128,9	119,9
Protonensignale [ppm]	-	6,95	-	6,76	7,16	6,94

Tabelle 8: Berechnete und gemessene Verschiebungen von **3**

Aus dem zweidimensionalen ^{1}H-^{13}C-korrelierten Spektrum lassen sich die Protonensignale entsprechenden Strukturelementen zuordnen. Die Methylengruppen des Piperidinylringes zeigen im Protonenresonanzspektrum zwei Multipletts bei 1,64 ppm und 1,79 ppm in Korrelation zu dem Signal bei 30,3 ppm im Kohlenstoffresonanzspektrum. Das Multiplett der N-Methylengruppe zeigt Resonanz bei 2,2 ppm und korreliert mit dem Signal bei 52,0 ppm. Die N-Methylgruppe zeigt Verschiebungen von 2,1 ppm bzw. 46,0 ppm, die Methingruppe von 4,9 ppm bzw. 72,2 ppm. Die Methoxygruppen sind bei 3,7 ppm und 55,2 ppm zu finden. Ein weiteres Signal bei 4,5 ppm ist das Resonanzsignal der freien OH-Gruppe. Die Verschiebungen bei 80,7 ppm und 173,6 ppm sind dem α-C-Atom und dem Carboxyl-C-Atom zuzuordnen.

Die freie Säure **25** ist durch ihren R_F-Wert von 0,55 im Fließmittelgemisch VI und die Violettgraufärbung mit Dm B bei gleichzeitig fehlender Anfärbbarkeit mit Dm C gekennzeichnet.

In der HPLC eluiert sie mit Methode III bei 3,8 min. Im EI-MS ist der strukturbeweisende Molekülionenpeak als [M^+]-Peak bei der Massenzahl m/z 288 gezeigt. Die weiteren Fragmente **a** – **e** entsprechen in ihren Massenzahlen und Intensitäten denen von **3** (siehe Schema 34). Die Piperidinringfragmente sind nicht vorhanden. Basispeak ist Fragment **b**. In den NMR-Spektren fehlen die Signale der basischen Seitenkette. Die Resonanz der Carboxylgruppe im ^{13}C-NMR ist einer freien Carbonsäure entsprechend im tiefen Feld bei 177,6 ppm zu finden. Im Vergleich zu Verbindung **3** ist das Signal der 1-Position der Aromaten ins hohe Feld auf 142,4 ppm (- 1,1) verschoben. Deutlich getrennt sind die Kohlenstoffsignale der C2/C2‘- und C4/C4‘-Atome bei 113,2 ppm und 113,8 ppm. Die Zuordnung ist über ein zweidimensionales, ^{1}H-^{13}C-korreliertes Spektrum möglich. Das Protonensignal des C4/C4‘ ist aufgrund der benachbarten Protonen an C5/C5‘ in ein Dublett aufgespalten. Es zeigt bei 6,80 ppm Resonanz. Die Protonensignale der C2/C2‘- und C6/C6‘-Gruppen fallen bei 6,98 ppm zusammen. Die Gruppen sind jedoch im ^{13}C-NMR unterscheidbar. Alle weiteren Signale sind nur geringfügig verschoben. Die Protonen der freien Säure- und Hydroxylgruppe sind unter den gewählten Bedingungen nicht messbar.

Für das N-oxid **26** lassen sich hplc bei R_T = 8,3 und 8,7 min zwei Isomere, in Analogie zu den N-Oxiden von **1** (**13**) (siehe Abbildung 5), detektieren. Sie wurden dc im Fließmittelgemisch II getrennt und ms und nmr untersucht. Im EI-MS lassen sie sich von **3** nicht unterscheiden. Sie zeigen keinen Molekülionenpeak. Das Fragment mit der höchsten Massenzahl tritt nach Abspaltung des Sauerstoffs bei m/z 385 mit geringer Intensität, dem Molekülionenpeak von **3** entsprechend, auf. In den NMR-Spektren unterscheiden sich die Isomere deutlich. Die Protonensignale der N-Methylgruppe des trans-Isomers sind zu denen des cis-Isomers tieffeldverschoben. In Übereinstimmung mit Verbindung **13** stellt das Isomer mit äquatorialem Sauerstoff von **26** die stabilere Verbindung dar. Im Vergleich zu den Spektren von **3** sind die Kohlenstoffresonanzen der N-Methylgruppe um 13,8 ppm bzw. 12,7 ppm und die der N-Methylengruppe um 8,4 ppm bzw. 12,1 ppm tieffeldverschoben. Die entsprechenden Protonensignale verschieben sich auf 2,81/3,05 ppm für die N-Methyl- und auf 2,61 – 2,81/ 3,22 – 3,25 ppm für die N-Methylengruppen. Die Resonanzen der Methylengruppe treten kaum verändert bei 1,58/1,79 ppm und 2,42/2,42 ppm bzw. 24,4/25,8 ppm auf. Die Resonanzen der Methingruppe sind auf 5,0/4,8 ppm (± 0,1) bzw. 66,5/69,3 ppm (- 5,7/2,9) verschoben. Die Signale der Protonen und Kohlenstoffatome des Benzilsäurerestes treten nur leicht verändert und für beide Isomere auf. Die Signale der Hydroxygruppe sind in den Spektren nicht erkennbar.

Die N-Demethylverbindung **27** lässt sich mit Dm A, Dm B (violettgrau) und Dm C (orange) im Fließmittelgemisch III von anderen Produkten differenzieren. In der HPLC eluiert sie bei 14,7 min (Methode III) nach allen anderen bekannten Derivaten. Im EI-MS beweisen die im Vergleich zu **3** um jeweils 14 Masseeinheiten verringerten Massenzahlen des Molekülionenpeaks [M^+] bei m/z 371und der Fragmente **f** – **i** bei m/z 85, 84, 83 und 82 die Struktur (siehe Schema 34). Die weiteren Fragmente unterscheiden sich nicht von **3**. In den ^{13}C- und ^{1}H-NMR fehlen die Signale der N-Methylgruppe. Das ^{13}C-Signal der N-Methylengruppen ist in Folge der Entschirmung durch die im Vergleich zu **3** fehlende N-Methylgruppe stark ins hohe Feld auf 43,4 ppm (- 8,6) verschoben. Die zugehörigen Protonen sind um 0,5 ppm tieffeldverschoben und in zwei Multipletts bei 2,6 ppm und 2,8 ppm aufgespalten. Deutlich unterscheidbar sind die Signale der C2/C2‘- und C4/C4‘-Kohlenstoffatome bei 113,2 ppm und 113,4 ppm. Die Resonanzen der weiteren Protonen und C-Atome sind wenig verändert. Für die OH- und NH-Protonen sind keine Signale vorhanden.

Für Verbindung **28** wurde eine N-Formylstruktur nachgewiesen. Sie lässt sich dc mit Dm A, Dm B (violettgrau) und Dm C (orange) detektieren. Im EI-MS fehlen die Piperidinfragmente bei den Massenzahlen m/z 99, 98, 97 und 96. Es tritt jedoch mit hoher Intensität Fragment **f** bei m/z 113 auf, typisch für den N-Formylpiperidinring. Der entsprechende Molekülionenpeak fehlt im Spektrum. Die Fragmente **a** – **e** entsprechen in ihren Massenzahlen und Intensitäten denen von **3** (vergleiche Schema 34). Den Beweis der N-Formylstruktur liefern die NMR-Spektren. Das N-Formylsignal findet sich im ^{13}C-NMR mit den Signalen der C3/C3‘-Gruppen bei 159,4 ppm, das entsprechende Protonensignal bei 7,9 ppm. Aufgrund der zwei möglichen Konformeren (siehe auch Abbildung 6) treten die Signale der C-Atome des Heterozyklus doppelt auf. Die Methylengruppensignale erscheinen bei 29,3/30,7 ppm in Korrelation mit dem Multiplett von 1,6 – 1,8 ppm. Die N-Methylengruppen geben aufgrund der zusätzlichen Formylgruppe hochfeldverschobene Signale im ^{13}C-NMR bei 35,8/42,0 ppm (- 16,2/10,0). Die Resonanzen der Protonen sind ins tiefe Feld auf 3,1/3,5 ppm verschoben. Die größeren Verschiebungen ins hohe Feld zeigen die Kohlenstoffatome in cis-Stellung zum Formylsauerstoff. Da die Signale der Konformere deckungsgleich sind, lässt sich das Verhältnis der (*E*)- zur (*Z*)-Verbindung aus den Signalintensitäten nicht ableiten, sowohl die ^{13}C-Signale der Methylen- als auch die der N-Methylengruppen zeigen erwartungsgemäß annähernd gleiche Signalintensitäten. Die weiteren Signale sind im ^{1}H- und ^{13}C-NMR kaum verändert, zum Teil treten Kohlenstoffsignale doppelt auf.

3,3‘-Dimethoxybenzophenon (**29**) gibt im Gegensatz zu den anderen isolierten Derivaten mit Dm B eine Gelbfärbung. Mit der HPLC-Methode III hat die Verbindung einen R_T-Wert von

11,3 min. Im EI-MS ist der Molekülionenpeak mit der Massenzahl m/z 242 in moderaten Intensitäten zu finden. Die weitere Fragmentierung entspricht, mit Ausnahme des fehlenden Fragmentes **a**, der des entsprechenden 3,3‘-Dimethoxybenzilsäurerestes (vergleiche Schema 34). Basispeak ist Fragment **b**. Die Signale der Methoxygruppen finden sich bei 55,4 ppm im Kohlenstoff- und bei 3,8 ppm im Protonenresonanzspektrum. Von den aromatischen Protonen zeigen nur die Protonen am C4/C4‘ ein Dublett bei 7,05 ppm, während die restlichen Protonen ein Multiplett von 7,25 – 7,32 ppm bilden. Die dazugehörenden Kohlenstoffsignale liegen für C2/C2‘ bei 114,3 ppm, für C4/C4‘ bei 118,8 ppm, für C6/C6‘ bei 122,8 ppm und für C5/C5‘ bei 129,2 ppm. Die Resonanzen der quartären C-Atome in Position 1 und 1‘ treten bei 138,9 ppm auf. Die der methoxygruppensubstituierten C-Atome C3 und C3‘ liegen bei 159,5 ppm. Die größte ^{13}C-Verschiebung zeigt die α-Carbonylgruppe mit 196,2 ppm.

Der Methylester (**30**) zeigt dem Benzophenon **29** ähnliche chromatographische Eigenschaften. Im Fließmittelgemisch V hat er einen R_F-Wert von 0,58 und ist mit Dm B violettgrau anfärbbar. Mit der HPLC-Methode III eluiert die Verbindung nach 10,2 min. Im EI-MS ist der Molekülionenpeak mit geringer Intensität gezeigt. Die Fragmente **a** – **e** sind bei übereinstimmenden Massenzahlen in ihren Intensitäten denen von **3** (siehe Schema 34) vergleichbar. Die Piperidinringfragmente fehlen im MS. In den ^{1}H- und ^{13}C-NMR treten neben den Signalen der Methoxygruppen bei 3,7 ppm bzw. 55,2 ppm die Signale einer weiteren Methylgruppe bei 3,8 ppm bzw. 53,6 ppm auf. Die restlichen Resonanzen entsprechen, bis auf die fehlenden Signale des Piperidinrestes, den Spektren von **3**. Das Protonensignal der freien OH-Gruppe ist hochfeldverschoben bei 4,1 ppm zu finden.

Für die folgenden Derivate konnten aufgrund der geringen Substanzmengen keine NMR-Untersuchungen durchgeführt werden.

Verbindung **31** konnte aus den nichtwässrigen Ansätzen isoliert werden. Sie lässt sich dc mit Dm A, Dm B (violettgrau)und Dm C (orange) detektieren. Im EI-MS tritt strukturbeweisend Fragment **a** um 14 Masseeinheiten erhöht bei m/z 257 (**a‘**) auf (siehe Abbildung 16), welches nach Abspaltung der CH_2-Gruppe nochmals bei m/z 243 erscheint. Der weitere Zerfall führt zu den Fragmenten **b** – **e**. Die Fragmente **f** – **i** treten mit den Massenzahlen des N-Methyl-4-piperidinylrestes m/z 99, 98, 97 und 96 auf (siehe Schema 34). Basispeak ist ein Fragment mit der Massenzahl m/z 105, für das keine Zusammensetzung oder Struktur bekannt ist. Aufgrund der anderen Fragmente wird für Verbindung **31** die in Abbildung 16 dargestellte Struktur des N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxy-O-methylbenzilates angenommen. Der Molekülionenpeak der postulierten Struktur ließ sich im EI-MS jedoch nicht nachweisen. Der Strukturbeweis steht noch aus.

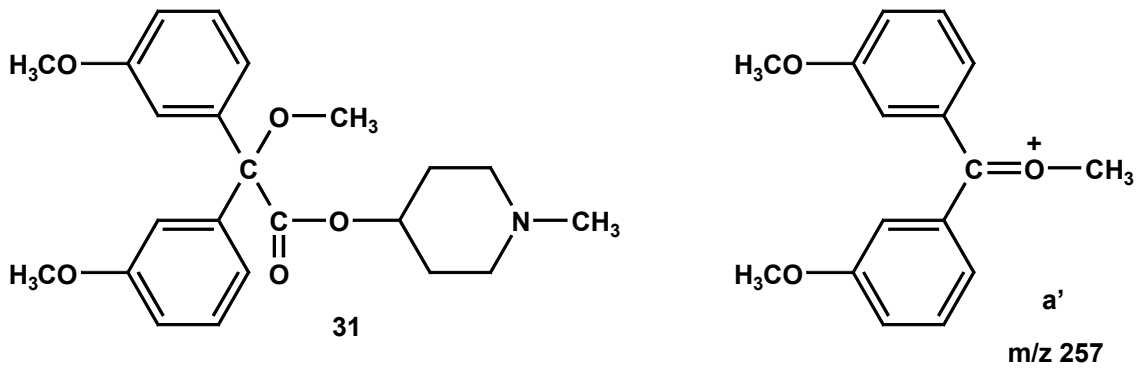


Abbildung 16: Postulierte Struktur von **31** und strukturbeweisendes Fragment **a‘**

In den wässrigen Ansätzen trat mit einem R_F-Wert von 0,30 im Fließmittelgemisch II ein Substanzfleck auf, der sich mit Dm B grauviolett, mit Dm C orange und mit Dm D violett bis rotviolett anfärben ließ. Die ms Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei um Gemische phenolischer Substanzen (**32** – **35**) unterschiedlicher Zusammensetzung handelt.

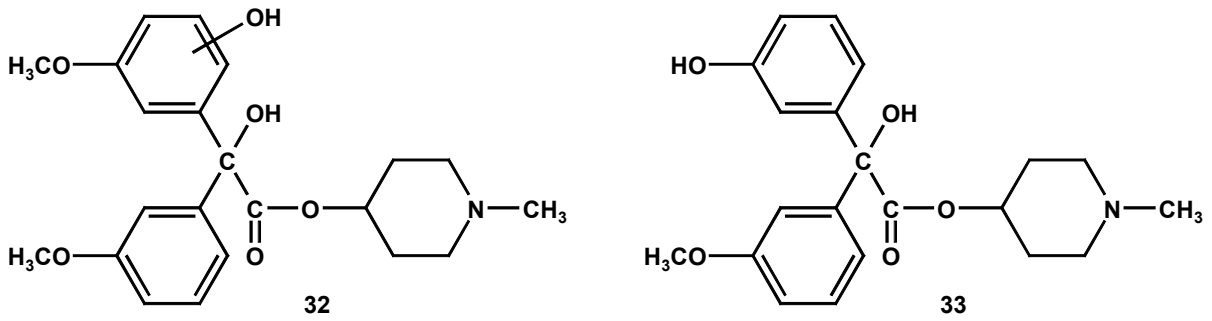


Abbildung 17: Strukturen der Derivate **32** und **33**

Verbindung **32** wurde im Gemisch mit Verbindung **33** aus dem wässrigen Ansatz im neutralen pH-Bereich isoliert. Im EI-MS sind die Molekülionenpeaks einer zusätzlich monohydroxylierten Verbindung (**32**) und des nach Methyletherspaltung entstehenden 3-Hydroxy-3‘-Methoxybenzilsäurederivates (**33**), jeweils mit N-Methyl-4-piperidinol verestert, zu erkennen. Die entsprechenden Fragmente **a** – **i** treten für beide Strukturen auf, wobei die Fragmente **b** und **c** für jede Verbindung doppelt, für den zusätzlich substituierten und den unveränderten Ring auftreten (vergleiche Schema 34). Gemeinsam ist beiden Strukturen das Fragment **b** als Basispeak mit m/z 135, Fragment **c** mit m/z 107, Fragment **d**, Fragment **e** und die Piperidinylfragmente **f** – **i** mit den Massenzahlen m/z 99, 98, 97 und 96. Für **32** liegen die zusätzlichen Fragmente **a** bei m/z 259, **b** bei m/z 151 und **c** bei m/z 123. Für **33** haben die Fragmente die

Massenzahlen m/z 229 (**a**), m/z 121 (**b**) und m/z 93 (**c**). Die Strukturen der Verbindungen zeigt Abbildung 17.

In dem entsprechenden Vergleichsansatz ohne Katalysator wurden **33** und **34** detektiert. Die Struktur der monochlorierten Verbindung **34** wird im EI-MS durch den Molekülionenpeak bei m/z 405 begleitet von dem Isotopenpeak bei m/z 407 bewiesen. Da die Fragmente **b** und **c** auch mit den Massenzahlen m/z 135 bzw. 107 auftreten, muss das zusätzliche Chloratom am phenolischen Ring substituiert sein. Dies wird durch die Massenzahlen der Fragmente **a** – **c** bei m/z 263, m/z 155 und m/z 127 bestätigt. Sie werden von den um zwei Masseeinheiten erhöhten Isotopenpeaks mit ca. einem Drittel der Intensität begleitet. Die Peaks mit den Massenzahlen m/z 99, 98, 97 und 96 beweisen den intakten N-Methylpiperidinylester. Die Fragmente **d** und **e** sind im MS vorhanden. Zur Struktur der Verbindung siehe Abbildung 18.

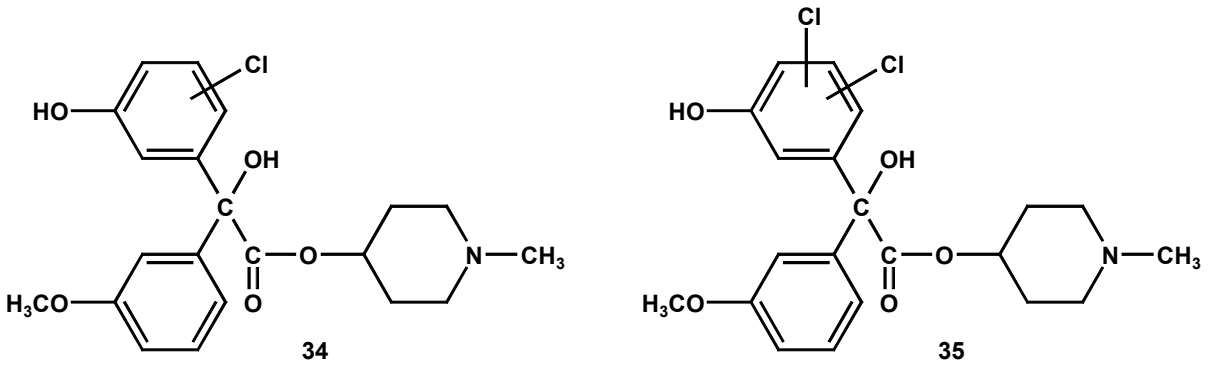


Abbildung 18: Strukturen der chlorierten Verbindungen **34** und **35**

Aus den wässrigen Ansätzen im sauren pH-Bereich wurden neben den Verbindungen **33** und **34** eine weiteres Derivat (**35**) isoliert. Dieses zeigt im EI-MS einen Molekülionenpeak mit der Massenzahl m/z 439. Aus den Fragmenten **a** – **c** mit den Massenzahlen m/z 297, m/z 189 und m/z 161, den Fragmenten **b** – **e** eines unveränderten 3-Methoxyphenylringes sowie den Fragmenten **f** – **i** mit den Massenzahlen m/z 99, m/z 98, m/z 97 und m/z 96 (vergleiche Schema 34) lässt sich die in Abbildung 18 dargestellte Struktur des N-Methyl-4-piperidinyl 2,4,5 oder 6-dichlor-3-hydroxy-3-methoxybenzilates ableiten. Das typische Verhältnis der Isotopenpeaks von dichlorierten Verbindungen von 10 : 7 : 1 ist nur bei dem in moderaten Intensitäten auftretenden Fragment **b** mit den Massenzahlen m/z 189, m/z 191 und m/z 193 gegeben.

Überraschenderweise konnten aus dem Vergleichsansatz ohne Katalysator- und ohne Sauerstoffdonatorzusatz nach der Aufarbeitung (siehe unter 4.3 für wässrige Ansätze) die Verbin-

dungen **33** und **34** nachgewiesen werden, obwohl die Ausgangsverbindung **3** nicht mit diesen verunreinigt ist. Die Verbindungen stellen Artefakte durch die Aufarbeitung dar.
Die ms Untersuchungen erlauben keine Aussagen zur Stellung der einzelnen Substituenten. Es ist daher möglich, dass es sich in den einzelnen Ansätzen um die Derivate der gleichen Grundstruktur, jedoch um unterschiedliche Stellungsisomere handelt. Darauf weisen die unterschiedlichen Retentionszeiten der separierten Fraktionen hin, lediglich für **33** war eine Zuordnung möglich. Die Substanz eluiert nach 11,5 min.

3.3 Umsetzungen mit Denaverin (4)

Denaverinhydrochlorid (Hydrochlorid des 2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)-benzilates, **4**-HCl) ist ein muskulotropes Spasmolytikum, welches vor allem zur Behandlung von spastischen Schmerzen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes eingesetzt wird. Obwohl es seit über 25 Jahren in der Therapie verwendet wird, sind nur wenige Daten zur Biotransformation am Menschen bekannt. Eine der Ursachen liegt in der geringen Wiederfindungsrate von unter 1 % im Urin nach peroraler Applikation [106]. Daher sind neue Methoden nötig, mit denen eventuell neue, unbekannte Metabolisierungswege erkannt werden können.

3.3.1 Biomimetische Untersuchungen

Die unterschiedlichen Reaktionsansätze und ihre Produkte sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Zur Durchführung der Versuche und Isolierung der Reaktionsprodukte siehe 3.1 und 4.3 – 4.5.
Im nichtwässrigen Milieu lassen sich nach der Umsetzung von **4** fünf Derivate nachweisen, welche Produkte der Funktionalisierungsreaktionen Esterspaltung (**36**), N-Demethylierung (**37**), N-Oxidation (**38**) und C-Oxidation (**39**, **40**) sind. Eine Übersicht gibt Schema 35. Ohne Katalysatorzusatz werden **38** und **36** mit sehr geringen Ausbeuten gebildet. Der Austausch von Acetonitril gegen Methanol im Lösungsmittelgemisch hat keinen Einfluss auf Art und Menge der Produkte. Der Einsatz von Iodosylbenzen als Sauerstoffdonator verhindert jede Reaktion. Die Verwendung von Pyridin als Co-Katalysator erhöht die Umsetzung von **4**, aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit wurde jedoch zumeist Imidazol verwendet.

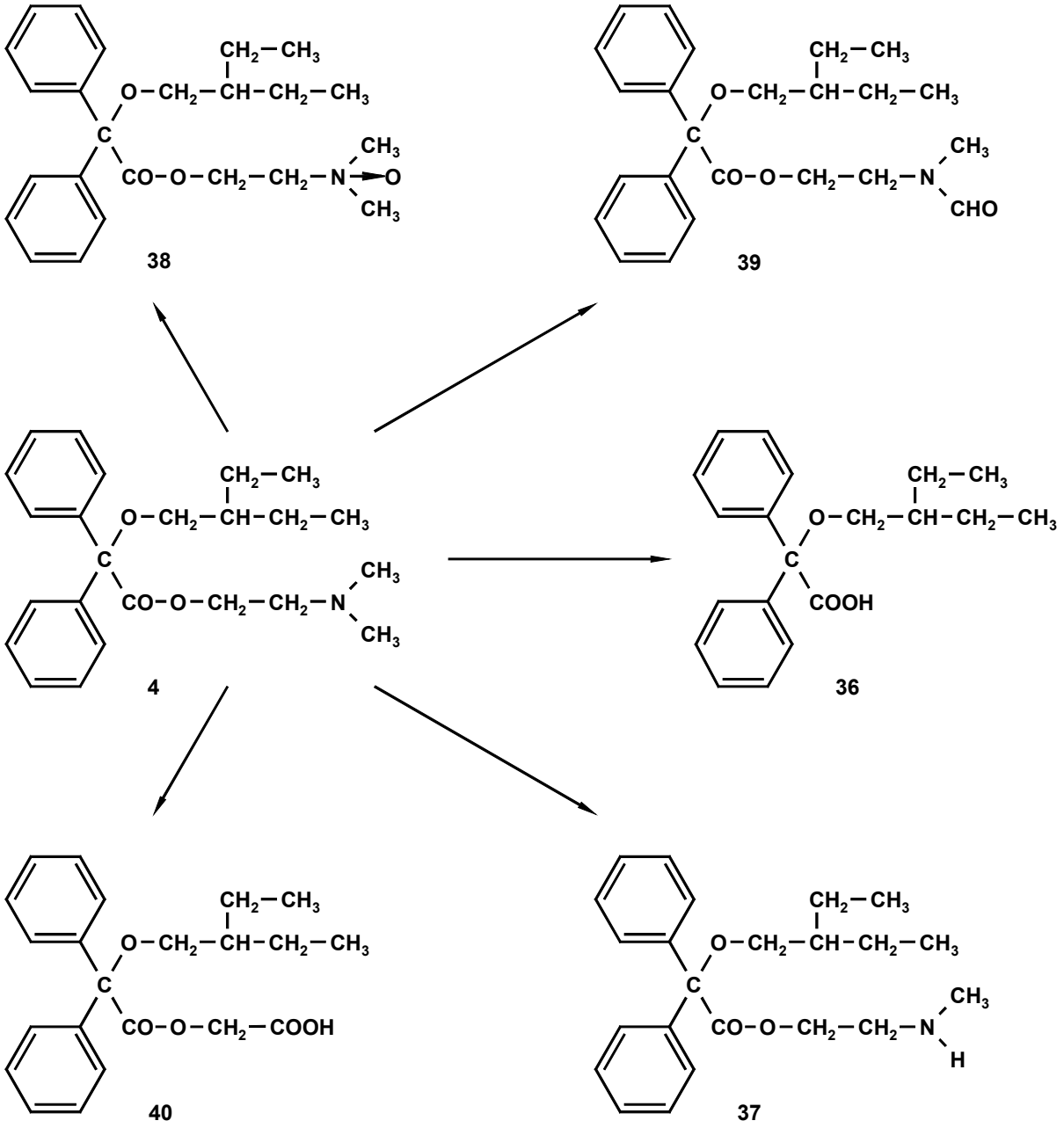
Katalysator	Co-Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Reaktionsprodukte
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**
MnTPFPPCl	Imidazol	Iodosylbenzen	Dichlormethan/ Acetonitril	-
MnTPFPPCl	Pyridin	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**
MnTPFPPCl	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Methanol	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**
FeTPFPPCl	Pyridin	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**
–	Pyridin	Wasserstoff-peroxid	Dichlormethan/ Acetonitril	**36**, **38**
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 1	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, (**44**)
$MnTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 6-8	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, (**44**)
$MnTPFPS_4PCl$	-	-	Wasser, pH-Wert = 1	-
$FeTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 1	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**
$FeTPFPS_4PCl$	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 6-8	**36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, (**44**) , **45**, **46**
-	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 1	-
-	Imidazol	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 6-8	**36**, **38**, **41**, (**44**)
-	-	Wasserstoff-peroxid	Wasser, pH-Wert = 6-8	-

Tabelle 9: Biomimetische Umsetzungen von **4**

Die höchste Ausbeute wird mit dem System MnTPFPPCl/Pyridin/Wasserstoffperoxid erzielt. Der Einsatz des Eisenporphyrinsalzes führt zu geringeren Ausbeuten. Es bestehen je nach eingesetztem System sowohl Unterschiede in der Gesamtausbeute als auch im Verhältnis der verschiedenen Produkte zueinander. Die Hauptumsetzungsprodukte sind jedoch immer **39**, **36** und **38**.

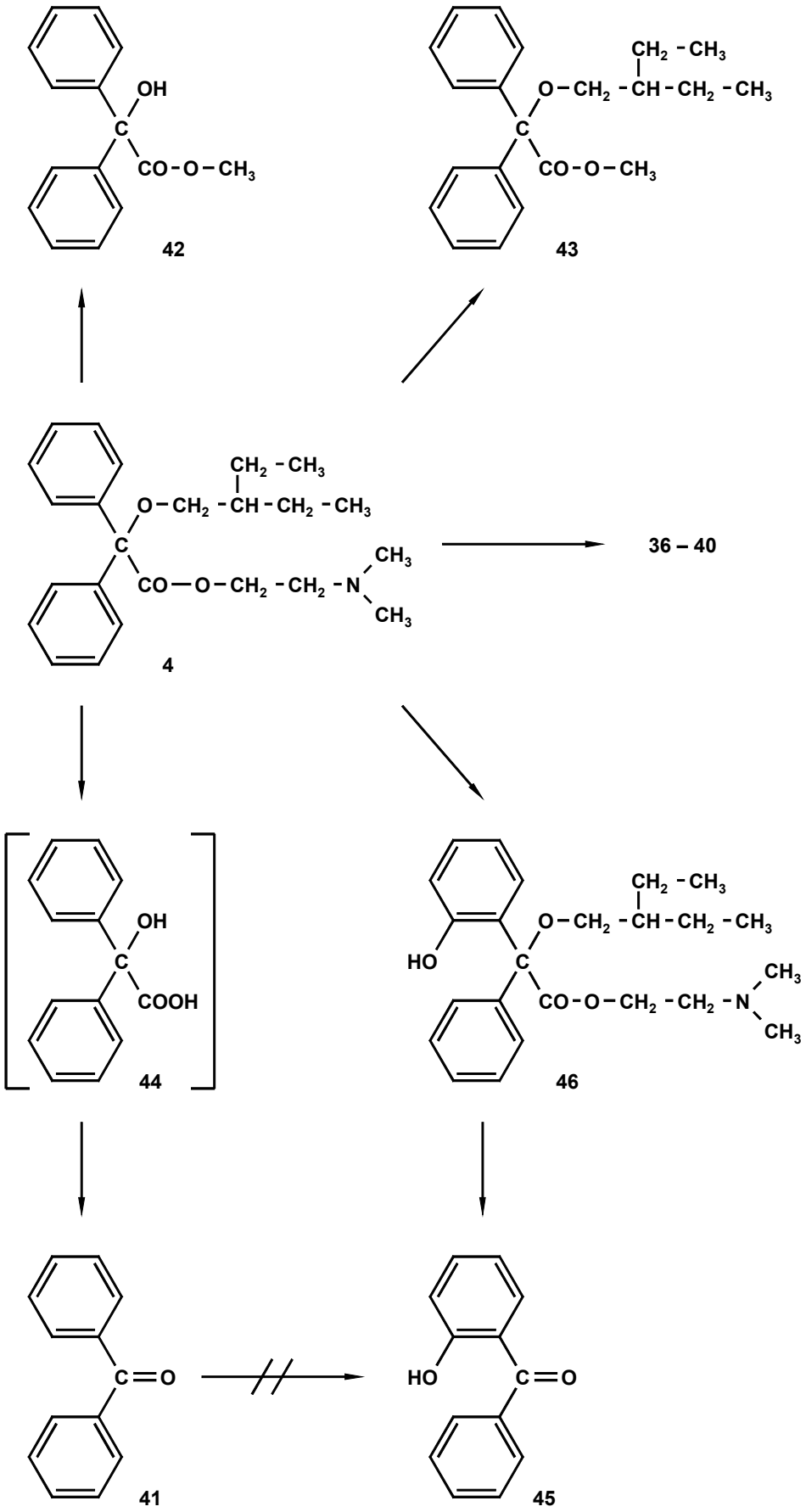
Die Produkte **36 – 40** werden auch bei den Umsetzungen von **4** im wässrigen Milieu nachgewiesen. Weitere Derivate entstehen in Abhängigkeit vom verwendeten Katalysator und vom pH-Wert (siehe Tabelle 9). So lassen sich bei Verwendung des wasserlöslichen Manganporphyrins, unabhängig vom pH-Wert, drei weitere Umsetzungsprodukte isolieren: Benzophenon (**41**) sowie die Methylester der Benzilsäure (**42**) und der O-(2-Ethylbutyl)benzilsäure (**43**),

womit auch das Entstehen der unsubstituierten Benzilsäure (**44**) indirekt nachgewiesen ist (siehe 3.4.1).



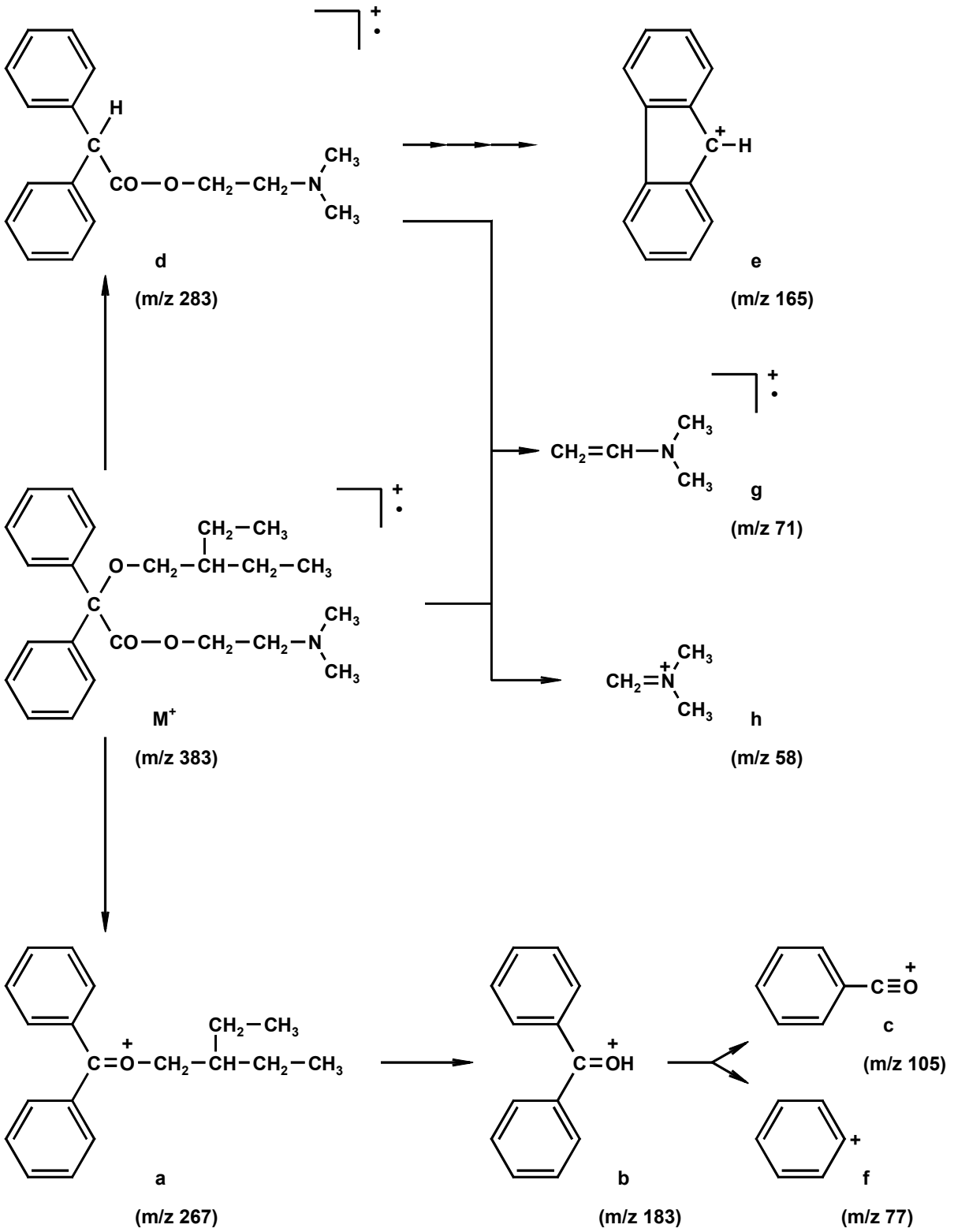
Schema 35: Biomimetische Reaktionsprodukte von **4** im nichtwässrigen Milieu

Ersetzt man im neutralen wässrigen Milieu das Manganporphyrin durch das entsprechende Eisensalz, entstehen neben **36 – 43** zwei weitere Derivate, 2-Hydroxybenzophenon (**45**) und 2-Dimethylaminoethyl 2-(2-Ethylbutoxy)-2-(2-hydroxyphenyl)-2-phenylacetat (**46**). Das Produktspektrum im wässrigen Milieu ist in Schema 36 zusammengefasst.



Schema 36: Biomimetisches Produktspektrum von **4** im wässrigen Milieu

Im Gegensatz zu dem weiten Produktspektrum im neutralen Milieu wird **4** im sauren Milieu von $FeTPFPS_4PCl$/Imidazol/Wasserstoffperoxid nicht umgesetzt. In den Vergleichsansätzen ohne Katalysatorzusatz lassen sich im neutralen Milieu in geringen Mengen **38**, **36** und **41** nachweisen. Im sauren Milieu sowie im Vergleichsansatz mit Katalysator ohne Sauerstoffdonator findet keine Umsetzung statt. Eine Reaktion mit Luftsauerstoff ist ausgeschlossen.
Hplc ist mit der mobilen Phase I die Trennung aller bei der Umsetzung von **4** entstandenen Derivate möglich.
Im MS zeigen mit Ausnahme der Benzophenone alle Umsetzungsprodukte das für Benzilsäuren typische Fragmentierungsmuster (siehe Schema 37). Bei Elektronenbeschuss zeigen sie eine geringe Stabilität. Die Molekülradikalionen treten nicht oder nur mit geringen Intensitäten auf, daher ist die Verwendung sogenannter weicher Ionisierungsmethoden notwendig. Als geeignet erweisen sich die Elektrospray-Ionisierung (ESI) und die Fast-atom-bombardment-Technik (FAB), wobei im ESI-MS der Molekülionenpeak als $[M + H]^+$-Peak, im FAB-MS im Allgemeinen als $[M + Na]^+$-Peak auftritt.
Ein Fragmentierungsweg ist die α-Spaltung am zentralen C-Atom, wobei sich das Oxoniumion **a** bildet. Die Abspaltung der 2-Ethylbutylkette durch Oniumreaktion führt zum relativ stabilen Kation **b**, aus welchem durch weitere Fragmentierung **c** entsteht. Ein weiterer, nur mit geringen Intensitäten auftretender Zerfall, beginnend mit der Alkoxyabspaltung der Etherseitenkette, ist durch das Fragment **d** charakterisiert. Auf beiden Wegen ist die Bildung des Phenylkations **f** möglich. Die Fragmente **g** und **h** stellen die Schlüsselbruchstücke der 2-Dimethylaminoethylstruktur der Esterseitenkette dar. Sie treten mit hoher Intensität auf, wobei **h** den Basispeak bildet (siehe Schema 37).
Die NMR-Spektren zeigen die Signale in den erwarteten Bereichen. Für die Phenylringe treten die entsprechenden Protonensignale im Bereich von 7,33 – 7,44 ppm als Multiplett und die ^{13}C-Signale bei 128,5 ppm, 128,7 ppm, 128,8 ppm und 140,7 ppm für die Substitutionsstelle auf. Für die Etherseitenkette zeigen sich die ^{1}H- bzw. ^{13}C-Signale bei 0,79 bzw. 11,5 ppm für die CH_3-Gruppen. Die CH- und CH_2-Gruppen geben im Protonenresonanzspektrum ein Multiplett bei 1,37 ppm, lassen sich jedoch im ^{13}C-NMR bei 23,8 ppm den CH_2-Gruppen und bei 42,1 ppm der CH-Gruppe zuordnen. Die O-CH_2-Gruppe ist bei 3,38 bzw. 67,2 ppm zu finden. Die N-Methylgruppen zeigen ^{1}H- bzw. ^{13}C-Signale bei 2,63 bzw. 43,2 ppm; die N-Methylengruppe bei 3,2 bzw. 56,2 ppm und die O-Methylengruppe bei 4,51 bzw. 59,7 ppm. Das Resonanzsignal des zentralen C-Atoms liegt bei 87,1 ppm und das der Carboxylfunktion bei 172,0 ppm.



Schema 37: Fragmentierung von **4** im EI-MS

Die freie Säure **36** konnte mittels Vergleichssubstanz dc (Fließmittel IV, Dm B) und hplc (mobile Phase I) nachgewiesen werden. Im EI-MS zeigt **36** die Fragmente **a**, **b**, **c** und **f** bei den entsprechenden Massenzahlen (siehe Schema 37). Im ESI-MS mit negativem Aufnah-

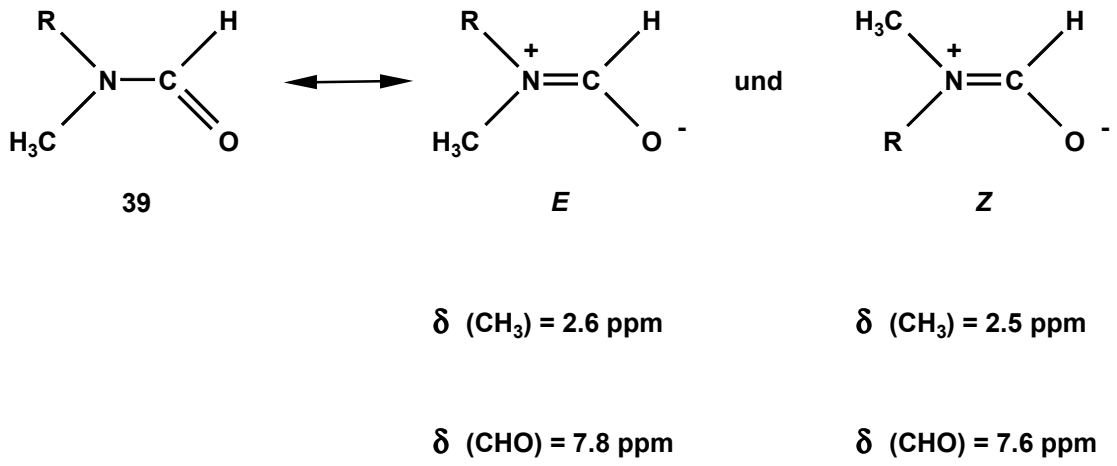
memodus ist der Molekülionenpeak $[M - H]^-$ bei m/z 311 nachweisbar. In den ^{1}H- und ^{13}C-NMR sind sowohl die Signale für die aromatischen Atome als auch die der Etherseitenkette erkennbar. Das α-C-Atom gibt im ^{13}C-NMR bei 86,8 ppm ein Signal, das Carbonsäure-C-Atom bei 173,1 ppm. Das H-Atom der freien Säure ist aufgrund des schnellen Protonenaustausches nicht erkennbar.

Die N-Demethylverbindung **37** lag ebenfalls als Vergleichssubstanz vor. Sie lässt sich dc im Fließmittel III mit Dm C detektieren. Im EI-MS treten strukturbeweisend die Fragmente **a** bei m/z 267 und **g** bei m/z 57 auf (vergleiche Schema 37). Der Molekülionenpeak $[M + H]^+$ lässt sich im ESI-MS bei m/z 370 nachweisen. Im ^{1}H-NMR ist das Signal nur einer N-Methylgruppe mit drei Protonen bei einer Verschiebung von 2,5 ppm vorhanden. Im ^{13}C-NMR sind die Signale der N-Methyl- und N-Methylengruppe um ca. 10 ppm, die der anderen Atome nur leicht hochfeldverschoben.

Die Fragmente im EI-MS des N-Oxids **38** unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Intensitäten von dem Spektrum von **4**. Lediglich im ESI- und FAB-MS lässt sich das N-Oxid durch das Auftreten des Molpeaks $[M + H]^+$ bei m/z 400 nachweisen. Das ^{13}C-NMR zeigt im Vergleich zu **4** eine deutliche Tieffeldverschiebung um 13 bzw. 11 ppm der Signale der N-Methyl- und N-Methylengruppe, während die Signale der O-Methylengruppe der Esterstruktur aufgrund des γ-Effekts um 2 ppm hochfeldverschoben sind. Im ^{1}H-NMR sind die Effekte ebenfalls erkennbar. Das Signal der N-Methylengruppe liegt bei 3,87 ppm (+ 0,67), der N-Methylgruppen bei 3,08 ppm (+ 0,45) und der O-Methylengruppe ebenfalls tieffeldverschoben bei 4,63 ppm (+ 0,12). Von **4** lässt sich **38** dc eindeutig im Fließmittel III unterscheiden, detektierbar ist **38** mit Dm A, B und C.

In der HPLC zeigt **39** einen Doppelpeak mit Retentionszeiten von 15,1 und 15,6 min (mobile Phase I). Dc verhält sich die Substanz ähnlich **4**, der R_F-Wert ist im Fließmittel I etwas höher als der von **4**. Sie ist mit konzentrierter Schwefelsäure und Dragendorffs Reagenz detektierbar. Im MS sind die Fragmente **a** und **b** mit den Massenzahlen m/z 267 und 183 vorhanden, so dass die Aromaten und die Etherseitenkette unverändert vorliegen. Zusätzlich tritt bei m/z 86 ein Fragment auf, welches der Summenformel C_4H_8NO entspricht (vergleiche Schema 37, Fragment **g**). Mit dem $[M + H]^+$-Peak von m/z 398 im ESI-MS wird die Summenformel $C_{24}H_{31}NO_4$ bestätigt. Im ^{1}H-NMR treten zwei Singulett-Signale mit einer Verschiebung von 7,6 und 7,8 ppm (je 1H) und im ^{13}C-NMR zwei Carbonylsignale mit 163,0 und 163,1 ppm zusätzlich auf. Deutlich hochfeldverschoben und ebenfalls doppelt treten die ^{13}C-Signale der N-Methyl- (30,0 und 35,6 ppm, je nur 3H), und der N-Methylengruppe (43,6 und 48,5 ppm) auf, während die Signale der O-Methylengruppe (62,0 und 63,2 ppm) tieffeldverschoben sind.

Im ^{13}C-NMR treten zum Teil auch weitere Signale doppelt auf. Daraus lässt sich eine N-Formylstruktur ableiten, wobei zwei Konformationsisomere auftreten (siehe Schema 38).



Schema 38: Konformationsisomere von **39** mit charakteristischen δ-Werten des ^{1}H-NMR-Spektrums

Nach nmr Untersuchungen von Stewart und Siddall treten die Protonen des trans-Isomers, es entspricht nach der heute gültigen Nomenklatur dem *E*-Isomer, hochfeldverschoben zu denen des cis-Isomers auf [105]. Sie untersuchten weiterhin das Verhältnis der Isomere zueinander und fanden die raumfordernden Substituenten bevorzugt in trans-Stellung zum Carbonylsauerstoff. Aus den relativen Intensitäten der N-Formyl- und N-Methylprotonen im ^{1}H-NMR lässt sich für **39** ein *E*/*Z*-Verhältnis von 2 : 1 bis 1 : 1 ermitteln. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem ermittelten cis/trans-Verhältnis von 40 : 60 für N-Ethyl-N-methylformamid [105]. Die Unterschiede der ermittelten Verhältnisse für **39** können ihre Ursache in unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen NMR-Proben haben. Für Formanilid wurde eine Konzentrationsabhängigkeit demonstriert. Mit sinkender Konzentration stieg der Anteil an dem *E*-Isomer [107]. Nach dem Chromatogramm in der HPLC ist jedoch ein 2 : 1-Verhältnis plausibel, wenn man übereinstimmende Extinktionskoeffizienten zugrunde legt.

Das EI-MS von **40** zeigt lediglich die Fragmentionen **a** und **b** mit den Massenzahlen m/z 267 und 183 für die unverändert vorliegenden Aromaten und Etherseitenkette (siehe Schema 37). Im FAB-MS ist der Molekülionenpeak $[M + Na]^+$ mit der Massenzahl m/z 393 erkennbar. Im CI-MS tritt das Molekülionenradikal nach Wasserabspaltung ($[M + H - H_2O]^+$ mit m/z 353 auf. Die Molmasse beträgt demnach 370 g/mol. Dc verhält sich die Substanz ähnlich den Säuren **36** und **44** (vergleichbare R_F-Werte). Sie lässt sich nicht mit Dragendorffs oder MBTH-Reagenz detektieren. Im ^{13}C-NMR tritt ein zusätzliches Signal eines Carboxyl-C-

Atoms bei einer Verschiebung von 168 ppm auf, während im ^{1}H-NMR lediglich zwei isolierte Methylenprotonensignale für die O-Methylengruppen bei einer Verschiebung von 3,1 und 4,2 ppm erkennbar sind. Die Signale der N-Methyl- und N-Methylengruppen sind nicht vorhanden. Die Ethylstruktur der Esterseitenkette ist also noch vorhanden, wobei ein C-Atom Teil einer Carboxylfunktion ist. Für **40** kann demnach die in Abbildung 19 angegebene Struktur postuliert werden.

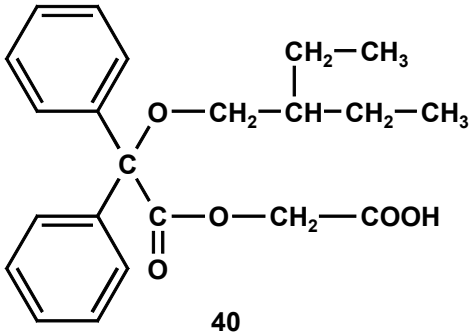


Abbildung 19: Struktur von **40**

Für die folgenden Substanzen war eine Strukturabsicherung durch NMR aufgrund der geringen Mengen an isolierten Derivaten nicht möglich.

Benzophenon (**41**) zeigt im EI-MS einen Molekülionenpeak $[M]^{+}$ bei der Massenzahl m/z 182, welcher eine Masseeinheit unter dem Benzilsäurefragment **b** liegt und damit eine eindeutige Zuordnung zur Grundstruktur erlaubt. Die weiteren Fragmente entsprechen den Fragmenten **c** und **f** der Benzilsäurefragmentierung (siehe Schema 37). Benzophenone lassen sich ebenfalls über ihre UV-Spektren von Benzilsäuren unterscheiden. Letztere zeigen eine starke Phenylabsorption < 230 nm und eine sehr schwache Absorption bei ca. 260 nm. Substanz **41** absorbiert unter den gleichen Bedingungen ebenfalls bei < 230 nm und zusätzlich bei 254 nm mit hoher Intensität. Dc ist **41** im Fließmittel V und durch die Gelbfärbung mit Dm B identifizierbar.

Die Methylester **42** und **43** sind dc ebenfalls in Fließmittel V und durch ihre Rotviolettfärbung mit Dm B charakterisiert. Ihre Strukturen wurden durch ihre FAB-MS und mittels synthetisierter Vergleichssubstanzen dc und hplc abgesichert. Sie zeigen im FAB-MS ein zu den anderen Benzilsäurederivaten verändertes Fragmentierungsverhalten. Neu ist das Auftreten der Alkoxyabspaltung ohne Wasserstoffwanderung mit hohen Intensitäten, so dass ein zu Fragment **d** um eine Masseeinheit verringertes Fragment **i** mit m/z 225 entsteht. Typisch für die Methylester scheint das neue Fragment **k** mit der Massenzahl m/z 197 zu sein (Struktur-

vorstellungen siehe Abbildung 20). Die Molekülionenpeaks erscheinen als $[M + Na]^+$ bei m/z 265 bzw. 349. Basispeak ist jeweils Fragment **b** mit m/z 183.

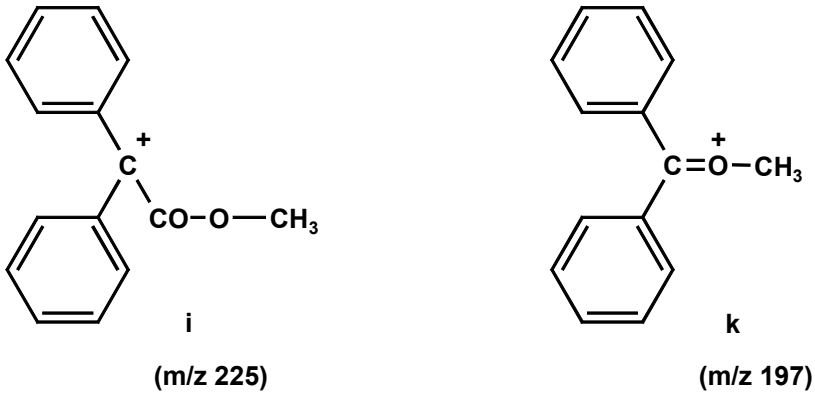


Abbildung 20: Strukturen der Fragmente **i** und **k** im FAB-MS von **42** und **43**

2-Hydroxybenzophenon (**45**) wurde im EI-MS durch den $[M]^+$-Peak bei m/z 198 und das zusätzliche Auftreten von den um jeweils 16 Masseeinheiten erhöhten Massenzahlen der Fragmente **c** und **f** als Hydroxybenzophenon charakterisiert. Durch dc Vergleich mit den möglichen Stellungsisomeren 2-Hydroxy-, 3-Hydroxy- und 4-Hydroxybenzophenon konnte im Fließmittel V die 2-Position der OH-Gruppe gesichert werden. Mit Dm D lässt sich **45** rot anfärben. Das UV-Spektrum (mobile Phase I, DAD, UV-Bereich von 190 - 400 nm) zeigt zwei charakteristische Maxima bei 262 und 330 nm.

Das ringhydroxylierte Denaverinderivat **46** wurde ebenfalls über das EI-MS als phenolisches Produkt charakterisiert. Die Biphenylfragmentionen **a**, **b**, **d** und **g** treten mit um jeweils 16 Masseeinheiten erhöhten Massenzahlen auf (vergleiche Schema 37).

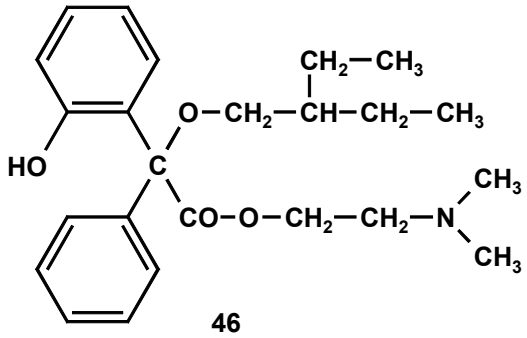


Abbildung 21: Strukturvorschlag für **46**

Die Bruchstücke **c** und **f** treten jeweils doppelt für den phenolischen und phenylischen Ring mit den Massenzahlen m/z 121 und 105 und m/z 93 und 77 auf und sind strukturbeweisend.

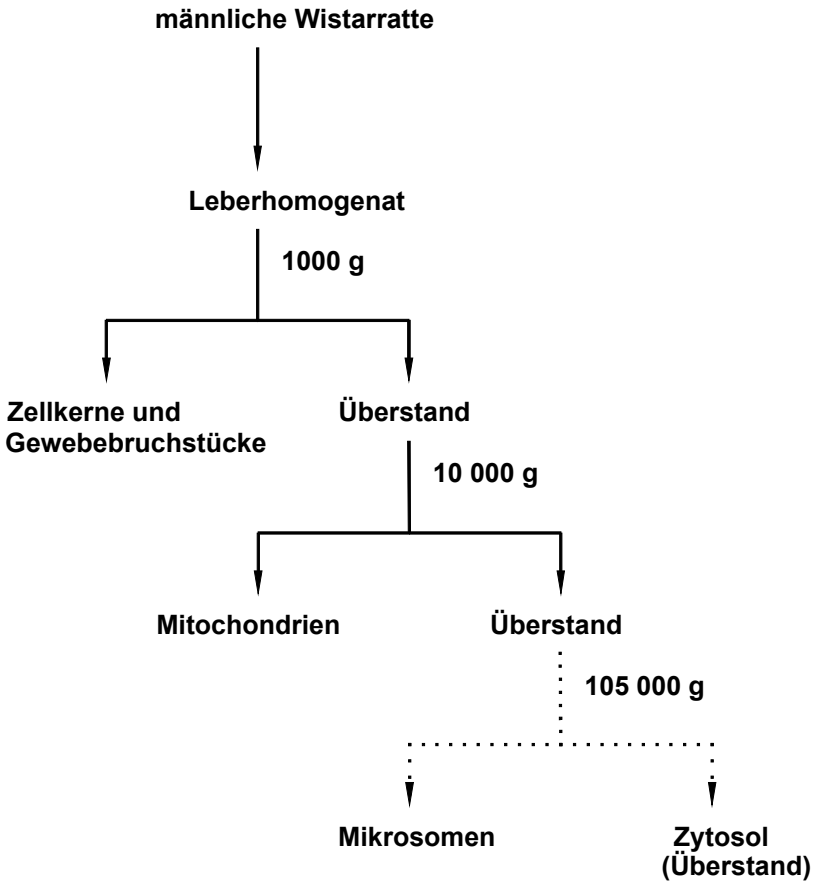
Basispeak ist Fragment **h** mit m/z 58. Im FAB-MS lässt sich der Molekülionenpeak als $[M + H]^+$-Peak bei m/z 400 und als $[M + Na]^+$-Peak bei m/z 422 nachweisen. Dc wurde **46** im Fließmittel I durch Rotfärbung mit Dm D als Phenol detektiert. Im UV-Spektrum ist die Phenylabsorption bathochrom auf ca. 230 nm verschoben, zusätzlich tritt ein intensives Maximum bei 278 nm auf. Für **46** kann demnach die in Abbildung 21 angegebene Struktur postuliert werden. Die Stellung der OH-Gruppe wurde aus dem Auftreten von **45** abgeleitet.

3.3.2 Orientierende Untersuchungen mit einem biologischen Modell

Im Fremdstoffmetabolismus nimmt die Leber einen herausragenden Platz ein. Sie verfügt über ein fast komplettes metabolisches Enzymmuster und eine hohe biotransformatorische Aktivität. Viele biologische Modelle basieren daher auf Leberpräparationen im weiteren Sinne. Die verwendeten Testsysteme reichen von der isolierten, perfundierten Leber über isolierte kultivierte Hepatozyten und subzelluläre Fraktionen bis zu den isolierten, gereinigten Enzymen. Diese verschiedenen Modelle unterscheiden sich in ihren biologischen Organisationsstufen, was sich auch auf die ablaufenden Biotransformationswege auswirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Vergleich mit dem chemischen Modellsystem als einfaches biologisches Modell die Rattenlebermikrosomenfraktion gewählt. Mikrosomen sind subzelluläre Fraktionen, die bei der Isolierung von endoplasmatischem Retikulum als Membranvesikel entstehen. Neben den Cytochrom P450 Isoenzymen sind auch andere Enzyme, wie die Epoxidhydrolase, die Glucuronyl-, die Sulfo- und die Methyltransferase in der Lebermikrosomenfraktion nachgewiesen worden. Zusätzliche Enzymaktivitäten sind aufgrund des ebenfalls im 10 000 g-Überstand vorhandenen Zytosols zu erwarten. Die gewählte Fraktion ist relativ einfach zu präparieren und zu handhaben (siehe Schema 39). Nach Zellaufschluss durch schonende Homogenisierung werden die Zellkerne und Gewebebruchstücke durch Zentrifugieren bei 1000 g gefällt. Der Überstand wird erneut, üblicherweise bei 9000 g, zentrifugiert, wobei Mitochondrien und weitere Zellorganellen sedimentieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde bei 10 000 g zentrifugiert, wodurch die Zentrifugierungsdauer verkürzt werden konnte. Im Überstand verbleiben die mikrosomale und die zytosolische Fraktion.

Die für 1 h bei 37 °C inkubierten Ansätze werden gefriergetrocknet, dreimal mit einem Dichlormethan/2-Propanol-Gemisch (3 : 1) extrahiert und die Extrakte im Vakuum eingeengt.

Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen. Die Isolierung und Identifizierung der Metaboliten erfolgte analog zu den biomimetisch gewonnenen Umsetzungsprodukten dc und hplc.



Schema 39: Gewinnung der Rattenlebermikrosomenfraktion

In den inkubierten Ansätzen konnten die Verbindungen **36 – 38** durch dc und hplc Vergleich mit Vergleichssubstanzen nachgewiesen werden. Weitere Metaboliten wurden dc durch Rotfärbung mit Dm B in geringen Mengen nachgewiesen, ließen sich jedoch nicht isolieren. Sie unterscheiden sich in ihrem chromatographischen Verhalten von allen aus den chemischen Umsetzungen und der Rattenbiotransformation bekannten und als Vergleichssubstanzen vorliegenden Derivaten (siehe 3.4.2 und 4.2.2.3).

Die freie Säure **36** wurde in Vergleichsansätzen ohne Zusatz des 10 000 g-Überstandes in vergleichbaren Mengen isoliert. Damit ist **36** kein Produkt enzymatischer Aktivität, sondern als Artefakt zu bewerten.

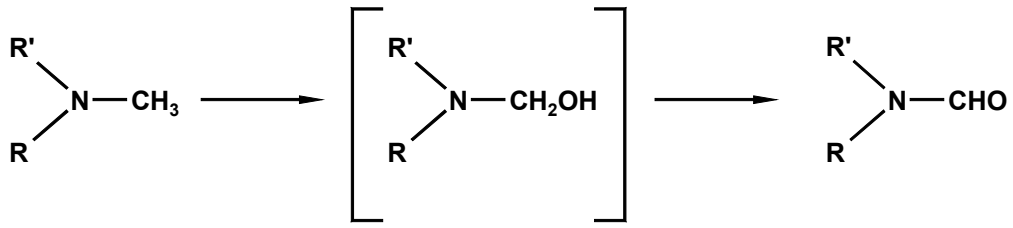
Bezogen auf die eingesetzte Menge an **4** wurde im Vergleich zum chemischen Modell wesentlich mehr Substrat umgesetzt.

3.4 Diskussion der Umsetzungen von Arzneistoffen mit Benzilsäurestruktur

3.4.1 Diskussion unter Berücksichtigung der Reaktionsmechanismen

Für die meisten der hier gezeigten biomimetisch vermittelten Reaktionen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Cytochrom P450 Isoenzymen *in vivo* oder *in vitro*. Im Folgenden sollen für die verschiedenen Reaktionsprodukte mögliche Reaktionswege und -mechanismen aufgezeigt und mit der metabolischen Bildung *in vivo* verglichen werden.

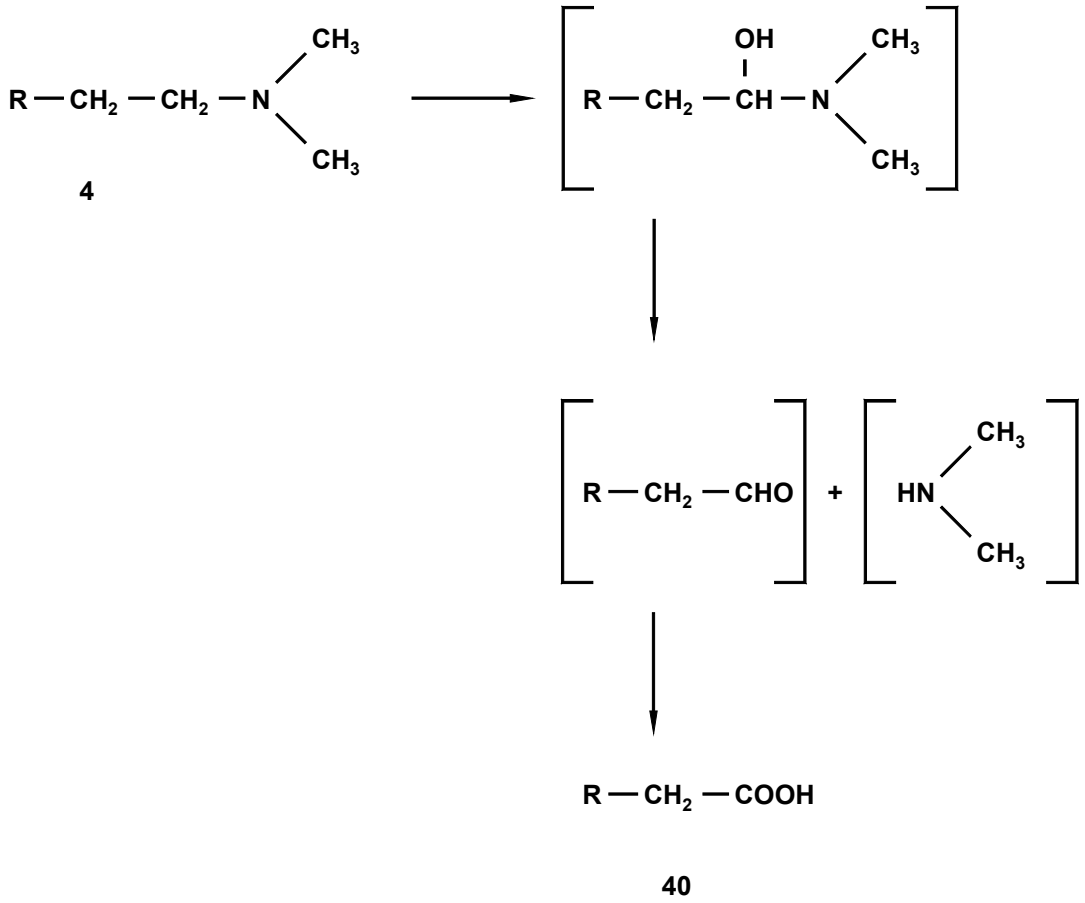
Um die Bildung von N-Oxiden durch Oxidation tertiärer Amine konkurrieren *in vivo* die Cytochrom P450 Isoenzyme mit flavinhaltigen Monooxygenasen. Die resultierenden N-Oxide sind stark polar und werden im Allgemeinen schnell eliminiert. Sie können jedoch im Organismus auch wieder zur Ausgangsverbindung reduziert und damit als Metabolit nicht erkannt werden. Im chemischen Modellsystem werden die N-Oxide **38**, **13**, **22** und **26** zwar auch ohne Katalysator gebildet, die Ausbeute wird jedoch durch den Metallporphyrinkatalysator wesentlich erhöht. Teilweise werden in biomimetischen Systemen N-Oxide als Sauerstoffdonatoren verwendet [108]. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass in den hier verwendeten Systemen primär die N-Oxide entstehen, welche dann als Sauerstoffquelle für die weiteren Reaktionen dienen. Diese Möglichkeit wurde jedoch nicht weiter untersucht.



Schema 40: Postulierter Bildungsweg der N-Formylgruppe

Oxidative N-Demethylierungen tertiärer Amine sind enzymatisch und metallporphyrinkatalysiert vielmals nachgewiesen worden. Der Reaktionsmechanismus verläuft, wahrscheinlich übereinstimmend, über einen Elektronentransferprozess (siehe 2). Das hypothetisch auftretende Carbinolamin wird in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls als Zwischenprodukt für die Bildung der N-Formylderivate **39**, **15**, **23** und **28** postuliert, aus welchem durch Oxidation die N-Formylgruppe entsteht (siehe Schema 40). N-Formylderivate wurden auch in biomimetischen Umsetzungen anderer Arzneistoffe beobachtet, so z. B. von Aminophenazon [94]. Der gleiche Mechanismus der Bildung über eine α-Hydroxyverbindung wird für die biomimetische Bildung des N-Acetylderivates von Lidocain postuliert [109]. Metabolite mit N-

Formylstruktur wurden bisher nur selten isoliert, so z. B. bei Biotransformationsstudien mit 5-Aminosalicylsäure. Aber auch die als Zwischenprodukte auftretenden Carbinolamine sind teilweise so stabil, dass sie unverändert ausgeschieden werden. Ein Beispiel ist der Benzodiazepinprecursor 450191-S, hier wurden die N-Hydroxymethylderivate des sekundären und tertiären Amins isoliert. Bei Benzazepin erfolgt die Oxidation der N-Methylgruppe *in vivo* bis zur Säure [110].

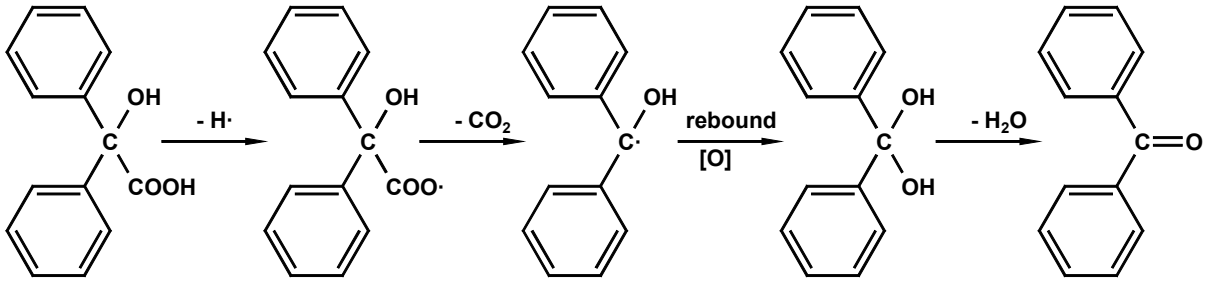


Schema 41: Postulierter Bildungsweg von **40**

Ebenfalls als N-Dealkylierung kann die Bildung von **40** aufgefasst werden. Das Carbinolamin wird an der N-Ethylstruktur gebildet. Nach der Spaltung zum entsprechenden Aldehyd erfolgt anschließend die Oxidation zur Säure (siehe Schema 41). Dies entspricht metabolisch einer oxidativen Deaminierung mit anschließender Dehydrierung zur Carbonsäure. *In vivo* unterliegt beispielsweise Chlorphenoxamin, ein 2-(N-Dimethylamino)ethylether des 4-Chlorbenzhydrols, der oxidativen Deaminierung, wobei sich das entsprechende 2-Benzhydryloxyessigsäure und -ethanolderivat nachweisen lassen. Der intermediäre Aldehyd wird hier entweder zur Säure oxidiert oder zum Alkohol reduziert. Im Falle des Chloroquin wurden nach

Abspaltung der Dialkylaminogruppe der entsprechende Aldehyd und die Säure identifiziert [110]. Am Beispiel des Losartans gelang mittels Humanlebermikrosomen *in vitro* der Nachweis, dass die Oxidation des Aldehyds zur Säure durch Cytochrom P450 Isoenzyme katalysiert wird [111].

Ester werden *in vivo* im Allgemeinen durch unspezifische Esterasen schnell hydrolysiert. Es ist für wenige Arzneistoffgruppen, wie beispielsweise für die Nifedipinabkömmlinge, auch eine oxidative Esterspaltung nachgewiesen worden [31]. Auch für andere Arzneistoffe wie Cypermethrin werden nichthydrolytische Esterspaltungen diskutiert [110]. Für die Esterspaltung von **1** gelang der eindeutige Nachweis eines oxidativen Reaktionsmechanismus mit dem Nachweis des N-Methyl-4-piperidons. Für die anderen untersuchten Arzneistoffe wird analog teilweise eine oxidative Esterspaltung angenommen. So ist die Ausbeute an Benzophenon (**41**) und damit an freier Säure **44** in den Umsetzungen von Denaverin mit Metallporphyrinkatalysator und Sauerstoffquelle gegenüber den Vergleichsansätzen nur mit dem Katalysator oder nur mit dem Sauerstoffdonator wesentlich erhöht. Eine metallkatalysierte Hydrolyse kann damit ausgeschlossen werden. Nur im wässrigen, neutralen Milieu ohne Katalysator, aber mit Zusatz der als Co-Katalysator verwendeten Stickstoffbase Imidazol, tritt Benzophenon als Folgeprodukt der basenkatalysierten Hydrolyse von **4** zur Benzilsäure auf.



Schema 42: Möglicher Mechanismus der metallporphyrinkatalysierten, oxidativen Decarboxylierung (nach Hirobe [90])

Die Benzophenonderivate **8**, **29**, **41** und **45** entstehen durch Decarboxylierung der entsprechenden Benzilsäuren. In biomimetischen Umsetzungen wurden oxidative Decarboxylierungen erstmals von Hirobe an α-Arylcarbonsäuren beobachtet [90]. Von ihm wurde ein möglicher Reaktionsmechanismus postuliert, auf welchem der vorgeschlagene Mechanismus der metallporphyrinkatalysierten Bildung von Benzophenonen aus Benzilsäuren in Schema 42 basiert. Er bedarf jedoch noch einer endgültigen Klärung.

Decarboxylierungen spielen im physiologischen Stoffwechsel eine wichtige Rolle. Der Abbau von Aminosäuren durch nichtoxidative Abspaltung von Kohlendioxid führt zu biogenen

Aminen, die im Organismus essentiell sind. Oxidative Decarboxylierungen werden z. B. von der Pyruvat-Dehydrogenase, einem Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, katalysiert. Dabei werden 2-Oxosäuren in die jeweils nächst niedere Carbonsäure und Kohlendioxid umgewandelt. Die Fähigkeit von Cytochrom P450 zur Katalyse der oxidativen Decarboxylierung wurde am Beispiel des Indometacins *in vitro* durch die Hemmung der Reaktion mit einem spezifischen Inhibitor eindeutig nachgewiesen [35]. Der Umfang der Beteiligung von Cytochrom P450 Isoenzymen an der Decarboxylierung von Xenobiotica bedarf jedoch noch weiterer Studien.

Als weitere Reaktion tritt in den biomimetischen Umsetzungen mit **1** und **3** die Methylierung der freien OH-Gruppe auf. Im Organismus wird diese Reaktion als Konjugationsreaktion von Methyltransferasen katalysiert. Erstmals wurden mit den Verbindungen **18** und **31** in biomimetischen Systemen Derivate von Umwandlungen beobachtet, die im Ergebnis Phase II-Reaktionen entsprechen. Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus ist nicht bekannt. Rein hypothetisch wäre die Methylierung durch ein Formaldehyd-Ameisensäure-Gemisch, welches durch teilweise Oxidation des durch N-Demethylierung entstehenden Aldehyds zur Säure entsteht, möglich. Dieses Reagenz dient in der Synthesechemie als Methylierungsgemisch.

Die Übertragung von Chlor auf Substrate wird in der Natur von Chlorperoxidasen katalysiert. Die Chlorperoxidase gehört wie das Cytochrom P450 zu den Häm-Thiolat-Proteinen. Sie kann neben der Halogenierung auch Reaktionen, die von Peroxidasen, Katalasen und Cytochrom P450 bekannt sind, katalysieren. Es wird angenommen, dass der Reaktionsmechanismus über eine aktive Oxoferrylspezies verläuft, welche dann in der Lage ist, Chlorid zur Substrathalogenierung zu verwenden. Diese oxidative Halogenierung wurde mit Metallporphyrinsystemen bereits nachgeahmt [82]. In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen werden verschiedene halogenierte Produkte nachgewiesen. Es ist auch möglich, dass diese Produkte durch radikalische Reaktionen mit Cl_2, welches aus Chlorid und Wasserstoffperoxid generiert wird, gebildet werden.

Die unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten der verwendeten biomimetischen Systeme stehen in Übereinstimmung mit den unter 2.1 aufgeführten systematischen Untersuchungen der Einflussfaktoren bei der Zusammensetzung solcher Modellsysteme. Generell zeigen Systeme mit einem Manganporphyrin der zweiten oder dritten Generation eine höhere Aktivität als die entsprechenden Eisenporphyrine. Die Ausbeuten im wässrigen Milieu sind dabei geringer als in nichtwässrigen Lösungen. Für Eisenporphyrinkatalysatoren lässt sich die Aktivität durch Zusatz von Stickstoffbasen als Co-Katalysatoren im wässrigen Milieu nur in ge-

ringem Maße steigern, da Eisenporphyrine bevorzugt zwei Stickstoffbasenmoleküle komplexieren. Hydroperoxide sind jedoch nicht in der Lage solche Liganden zu verdrängen. Die Bildung der aktiven Spezies ist daher nicht möglich. Im sauren pH-Bereich liegen die Ausbeuten niedriger als im neutralen, da die Bildung der aktiven Spezies im sauren Milieu langsamer ist als der Zerfall oder Abbau des Sauerstoffdonators. In Übereinstimmung mit den systematischen Untersuchungen von Fröhlich [95] zu biomimetischen Umsetzungen an Diphenylmethanderivaten führt Pyridin als Co-Katalysator zu etwas höheren Ausbeuten als Imidazol.

3.4.2 Diskussion unter Berücksichtigung der Biotransformation von Benzilsäurederivaten

In Untersuchungen zur Biotransformation von Denaverin in der Ratte konnten aus dem Harn neben unverändertem **4** elf Metaboliten isoliert werden, von denen neun in ihren Strukturen aufgeklärt wurden [112]. Die Hauptbiotransformationsprodukte waren Benzilsäure (**44**) und 3,3-Diphenylmorpholin-2-on, für welches als Vorstufe der nach Etherspaltung entstehende Benzilsäureester diskutiert wurde. Weiterhin wurden die N-Demethylverbindung (**37**) und unsubstituierte bzw. veresterte 2,2-Diphenylessigsäure isoliert. Letztere müssten durch reduktive Etherspaltung entstehen. Die gefundenen Methyl- und Ethylester von **36** und **44** wurden als Artefakte, bedingt durch das Arbeiten mit den entsprechenden Alkoholen, angesehen. Betrachtet man die Gesamtheit der Metaboliten, so lässt sich ihre Bildung mit den Funktionalisierungsreaktionen O- und N-Dealkylierung und Esterspaltung zusammenfassen. Phase II-Metaboliten wurden nicht gefunden.

Zum Metabolismus von **4** im Menschen liegen wenige Daten vor. Bei pharmakokinetischen Untersuchungen zur renalen Ausscheidung von **4** wurde die N-Demethylverbindung **37** mittels GC-MS identifiziert [113]. In einer anderen Studie wurden **37** und **44** in Harnproben quantifiziert. Insgesamt konnten jedoch nur unter 1 % der verabreichten Dosis an unverändertem Arzneistoff und Metaboliten im Urin wiedergefunden werden [106]. In neuesten Untersuchungen wurden weitere Metaboliten aus dem Urin von Probanden isoliert und mittels GC-MS Strukturvorschläge erarbeitet [114]. Sie wurden nicht quantifiziert. Die Mehrzahl der Verbindungen zeigen eine 2-Hydroxyethylesterstruktur und wurden zusätzlich an der Etherseitenkette an verschiedenen Positionen hydroxyliert. Die zugrundeliegenden Biotransformationsreaktionen sind oxidative Deaminierung mit anschließender Reduktion zum 2-Hydroxyethylderivat und C-Oxidation. Weiterhin wurden als Phase-I-Reaktionen die N-Demethy-

lierung bis zur primären Aminofunktion, die Oxidation der durch C-Oxidation gebildeten Alkohole zum Aldehyd und zur Carbonsäure, Esterspaltung sowie Etherspaltung mit anschließender Reduktion zum Diphenylessigsäurederivat beobachtet. Die Metabolite wurden im Urin überwiegend als Glucuronsäurekonjugate ausgeschieden. In Humanfäzesproben wurden **4** und **37** in kumulativen Ausscheidungsmengen von 11 % bzw. 3 % der verabreichten Dosis detektiert. Es wird vermutet, dass die Ausscheidung im Fäzes aus unvollständiger Resorption, biliärer Sekrektion oder gastrointestinalem Metabolismus resultiert. Weitere aus Stabilitätsuntersuchungen oder Biotransformationsstudien bekannte Derivate oder an den aromatischen Ringen veränderte Derivate wurden als Metabolite im Urin oder Fäzes ausgeschlossen.

Benactyzin, 2-Diethylaminoethyl benzilat, unterscheidet sich in seiner Struktur vom Denaverin durch die fehlende Etherseitenkette und durch die Diethylaminostruktur. Die Biotransformation in der Ratte führt zur Benzilsäure als Hauptmetabolit, weiterhin wurden die deethylierte und die unveränderte Ausgangsverbindung detektiert. Die Funktionalisierungsreaktionen sind in Analogie zum Verhalten von **4** N-Dealkylierung und Esterspaltung. Die Hydrolyse zur Benzilsäure kann *in vivo* enzymatisch und nichtenzymatisch ablaufen [115].

Die Biotransformation des N-Ethyl-3-piperidinyl benzilates wurde *in vivo* an Ratten und *in vitro* mit Rattenleberpräparationen untersucht [116]. *In vitro* wurden im Rattenleberhomogenat die Ausgangssubstanz, die deethylierte Ausgangsverbindung und N-Ethyl-3-piperidinol nachgewiesen. *In vivo* wurden die unveränderte Ausgangssubstanz und die nach Esterspaltung auftretenden Benzilsäure und N-Ethyl-3-piperidinol im Urin nachgewiesen. Die renale Ausscheidung der deethylierten Ausgangsverbindung und des 3-Piperidinols wurde ausgeschlossen. Insgesamt wurden im Urin weniger als 15 % der verabreichten Dosis wiedergefunden.

Zur Biotransformation von Propiverin (N-Methyl-4-piperidinyl O-propylbenzilat) in Mensch und Tier liegen inzwischen zahlreiche Berichte vor [56]. Es wurden vielfältige Produkte der O- und N-Dealkylierung, der N- und C-Oxidation, der Esterspaltung sowie von Kombinationen aus diesen isoliert. Diphenylessigsäurederivate als Produkte reduktiver Prozesse und kernhydroxylierte Derivate wurden nicht gefunden. Unterschiede bestehen im Metabolismus von Ratte und Mensch. In der Ratte entstehen keine N-dealkylierten Verbindungen, und die N-Oxidation findet in geringerem Maße, die Bildung von **44** in höherem Maße im Vergleich zum menschlichen Metabolismus statt. Der menschliche Organismus dagegen produziert viele verschiedene Produkte durch vielfältige Kombinationen der Grundreaktionen. Hauptmetaboliten sind das Propiverin-N-oxid, die N-Oxide weiterer Metabolite und seitenkettenhydroxy-

lierte Derivate. Nachgeordnet finden auch Esterspaltung und N-Demethylierung statt. Als Ergebnis von Konjugationsreaktionen wurden Glucuronide isoliert.

Für N-Methyl-4-piperidinyl 4-methoxybenzilat liegen einige Ergebnisse zum Metabolismus in der Ratte vor [117]. Es wurden fünf Metaboliten isoliert und identifiziert. Es handelt sich dabei um die O-dealkylierte Ausgangsverbindung, 4-Methoxybenzilsäure, 4-Methoxybenzophenon und die entsprechenden phenolischen Analoga. Hauptbiotransformationswege sind damit die O-Dealkylierung, Esterspaltung und Decarboxylierung. Mittels fraktionierter Verdampfung mit anschließender Massenspektroskopie wurden weitere Metaboliten von N-Oxidations-, N-Demethylierungs- und eventuell von aromatischen Hydroxylierungsreaktionen charakterisiert. Letztere konnten jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Es wurden ebenfalls Hinweise auf die Bildung von 2-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylessigsäure gefunden. Solche Metaboliten reduktiver O-Dealkylierungen wurden auch bei der Biotransformation von Denaverin in der Ratte beobachtet.

Epicainid (N-[(1-Ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]benzilamid), ein Benzilamid mit antiarrhythmischer Wirkung, wird im menschlichen und Rattenorganismus unterschiedlich metabolisiert [118]. Hauptbiotransformationsweg der Ratte ist die aromatische Oxygenierung, Hauptmetabolit 3-Hydroxy-4-methoxy-epicainid, weiterhin wurden die 4-Hydroxy-, 3,4-Dihydroxy- und die 3,4‘-Dihydroxy-4-methoxyverbindungen identifiziert. Es konnten keine Metaboliten nachgewiesen werden, die durch Amidspaltung oder Reaktionen am N-Ethylpyrrolidinring gebildet wurden. Grundsätzlich verschieden verläuft die Biotransformation im Menschen. Die Aromaten werden nicht verändert. Die Hauptmetaboliten werden durch N-Deethylierung und Oxidation in α-Stellung zum Stickstoffatom im Pyrrolidinring gebildet. Amidspaltung und N-Dealkylierung am Amidstickstoff sind weitere Metabolisierungsreaktionen. Ein Teil der Metabolite wird als Konjugat ausgeschieden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass basische Benzilsäurederivate im menschlichen Organismus vor allem an der basischen Seitenkette metabolisiert werden. Für den Rattenstoffwechsel lässt sich kein bevorzugter Biotransformationsweg finden.

Aus den biomimetischen Ansätzen mit Denaverin konnten insgesamt elf Derivate isoliert werden. Sie sind Produkte der O- und N-Dealkylierung, der N- und C-Oxidation, der Esterspaltung, der oxidativen Decarboxylierung und der aromatischen Oxygenierung. Im biologischen Modell wurden die isolierten Metaboliten durch N-Dealkylierung und N-Oxidation gebildet. In der Tabelle 10 werden die oxidativen und hydrolytischen Reaktionen des biomimetischen Modells den Funktionalisierungsreaktionen *in vitro* und *in vivo* gegenübergestellt.

Dabei ist zu beachten, dass *in vivo* die Metaboliten oft durch mehrere Biotransformationsreaktionen gebildet werden, hier jedoch die zugrundeliegenden Reaktionen verglichen werden.

Funktionalisierungsreaktion	Biomimetisches Modell	Metabolismus im Mensch	Metabolismus der Ratte	Biologisches Modell
Esterspaltung	×	(×)	×	-
Etherspaltung	(×)	(×)	×	-
Ester- und Etherspaltung	(×)[a]	(×)	×	-
N-Demethylierung	×	×	×	×
N-Oxidation	×	-	-	×
Deaminierung	×	×	-	-
C-Oxidation der Etherseitenkette	-	×	-	-
C-Oxidation der basischen Seitenkette	×	-	-	-
Decarboxylierung	×	-	-	-
Aromatische Oxygenierung	(×)	-	-	-
Weitere	-	Reduktion	Reduktion, ?[b]	?[b]

Tabelle 10: Übersicht der Derivatisierungen von **4** ([a] indirekt bewiesen, [b] weitere Produkte wurden detektiert, aber nicht identifiziert, ( ) in geringem Umfang stattfindend)

Mit der biomimetischen Methode wurden zahlreiche Derivate von Denaverin gewonnen. Mit Ausnahme des Morpholinderivates wurde die Bildung aller Produkte oxidativer Biotransformationswege der Ratte im chemischen Modell nachempfunden. Unterschiede bestehen in den Mengen und Verhältnissen der einzelnen Derivate. Das Fehlen der Diphenylessigsäurederivate im biomimetischen Produktspektrum überrascht nicht, da das System als Modell für Oxygenierungsreaktionen entwickelt wurde. Bis jetzt wurden keine Reduktionen in metallporphyrinkatalysierten, biomimetischen Metabolismusstudien beobachtet. Ein weiterer Unterschied zur Biotransformation der Ratte ist das Fehlen des eindeutigen Nachweises der durch Ester- und Etherspaltung gebildeten Benzilsäure **44**, lediglich der Methylester (**42**) wurde nachgewiesen. Dessen Bildung ist durch eine Veresterung von **44** oder durch Umesterung des nach Etherspaltung entstehenden Benzilsäureesters möglich. Nach Untersuchungen von Lisowski zeigt **44** nur eine geringe Tendenz zur Veresterung. Der basische Ester zeigt jedoch

eine schnelle Umesterung zu **42** [119]. Somit kann **42** nur als Beweis der O-Dealkylierung betrachtet werden. Das Auftreten von **41** beweist indirekt **44**, da dessen Bildung nur aus der unsubstituierten Säure möglich ist. Die freie Säure **44** wird in Lösung auch in Abwesenheit des Katalysators teilweise zu **41** abgebaut. Aufgrund des vollständigen Umsatzes wird jedoch eine Beteiligung der reaktiven Metallporphyrin-Oxo-Spezies und damit ein oxidativer Mechanismus als wahrscheinlich angenommen. Die untergeordnet stattfindende Etherspaltung steht in Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen zum Metabolismus im Menschen. Obwohl **44** renal ausgeschieden wird, wurde es in den untersuchten Harnproben nur in geringen Mengen quantifiziert. Dies wird in den neuesten Untersuchungen bestätigt. Bis auf zwei Metabolite zeigen auch alle anderen identifizierten Biotransformationsprodukte des Menschen eine intakte Etherstruktur. In der Ratte stellt die Etherspaltung zusammen mit der Esterspaltung einen Hauptbiotransformationsweg dar. Ähnlich ist im Falle des Propiverins **44** einer der Hauptmetaboliten in der Ratte, während es vom Menschen nur in geringem Maße gebildet wird. Mit dem *in vitro*-Modell konnte die Etherspaltung nicht gezeigt werden. Die zur Bildung von **44** und **36** nötige Esterspaltung wurde mit dem chemischen Modell in Übereinstimmung mit der Biotranformation der Ratte und des Menschen nachgewiesen, während die im biologischen Modell mit der Rattenlebermikrosomenfraktion auftretende Verbindung **36** nichtenzymatisch gebildet wird. Übereinstimmung mit dem Metabolismus des Menschen und der Ratte zeigen alle Produktspektren von Denaverin im Auftreten von **37**. Nicht in Übereinstimmung mit den verfügbaren *in vivo*-Daten steht das Auftreten des N-Oxids in den chemischen und biologischen Ansätzen. Ursache könnten eine geringe renale Ausscheidung oder eine im menschlichen oder tierischen Organismus nachfolgende Reduktion zum tertiären Amin sein. Für Propiverin stellt die N-Oxidation sowohl *in vivo* als auch biomimetisch einen wichtigen Biotransformationsweg dar. In den biomimetischen Systemen wurde weiterhin eine oxidative Deaminierung beobachtet, die durch nachfolgende Oxidation zum Carbonsäurederivat **40** führt. Dieser Biotransformationsweg wurde durch die neuesten Untersuchungen zum Metabolismus des Menschen bestätigt. Der Deaminierung folgt jedoch die Reduktion zum Alkohol, die mit dem biomimetischen Modell für Oxygenierungen nicht nachgeahmt werden kann. Es ist jedoch möglich, dass auch *in vivo* nach Deaminierung eine Oxidation zur Säure stattfindet. Da Verbindung **40** nicht als Vergleichssubstanz vorlag, kann ihre Bildung nicht ausgeschlossen werden. Dies gilt ebenfalls für das biomimetisch synthetisierte N-Formylderivat **39**, welches *in vivo* bisher nicht beobachtet wurde. Möglicherweise stehen **39** und **40** in Übereinstimmung mit beobachteten, aber nicht identifizierten Metaboliten der Ratte. In den biomimetischen Produktspektren und im Metabolitenspektrum der Ratte fehlen im Vergleich

zum Metabolitenspektrum des Menschen Produkte von C-Oxidationen an der Etherseitenkette. Ringhydroxylierte Derivate traten nur in den biomimetischen Ansätzen von **4** auf. Sie lagen in sehr geringen Konzentrationen vor und wurden nur von einem definierten biomimetischen System ($FeTPFPS_4PCl$/Imidazol/Wasserstoffperoxid in Wasser im pH-Bereich = 6 – 8) gebildet. 2-Hydroxybenzophenon (**45**) entsteht aus der ringhydroxylierten Verbindung **46** nach Ester- und Etherspaltung durch oxidative Decarboxylierung. Da es für ein Abbauprodukt in relativ hohen Mengen im Verhältnis zu **46** auftritt, wird analog zur Bildung des Benzophenons **41** aus **44** eine Katalyse der Decarboxylierung angenommen. Die Bildung durch direkte Hydroxylierung von **41** ist nicht möglich, da biomimetische Umsetzungen von **41** zu den entsprechenden 3- und 4-Hydroxyverbindungen führen. Die als Zwischenprodukt notwendig auftretende 2-Hydroxybenzilsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Ähnliche Reaktivitäten in biomimetischen Systemen zeigen die untersuchten, neuen Benzilsäurederivate **1**, **2** und **3**. Hauptumsetzungsprodukte sind die N-Formylderivate, weiterhin wurden in beachtlichen Ausbeuten die N-Oxide, die N-Demethylderivate, die freien Benzilsäuren und die entsprechenden Benzophenone erhalten. Zwischen den wässrigen und nichtwässrigen Systemen bestehen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der erhaltenen Produktspektren. Die Reaktivität ist in den wässrigen Modellsystemen geringer. In Übereinstimmung zu den biomimetischen Untersuchungen mit Denaverin und Propiverin sowie mit den bekannten Biotransformationswegen von basischen Benzilsäureestern finden Umwandlungen vor allem an der basischen Seitenkette statt. Hinweise auf die Bildung von Diphenylacetoxypropansäurederivaten durch Aufspaltung des Piperidinringes als Folge einer Deaminierung, in Analogie zur Bildung von **40** durch Deaminierung von **4**, gibt es nicht.

Unterschiede bestehen zwischen den 4- und 3-Piperidinylderivaten. **2** ist gegenüber oxidativen Angriffen stabiler, was sich in geringeren Ausbeuten und einem eingeschränkten Produktspektrum ausdrückt.

In allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten biomimetischen Umsetzungen von basischen Benzilsäureestern finden keine O-Dealkylierungen bzw. für **1** nur in sehr geringem Ausmaß statt, obwohl die Fähigkeit des Metallporphyrinkatalysators zur Katalyse der Spaltung von aromatischen und aliphatischen Ethern in Benzilsäurederivaten oftmals nachgewiesen wurde. *In vivo* unterliegen Verbindungen mit 3,4-Dimethoxyphenylstrukturen, beispielsweise Verapamil oder Papaverin, der Methoxygruppenspaltung, wobei in der Regel nur eine Etherbindung gespalten wird. Beispiele für Arzneistoffe, bei denen die Methoxygruppen nicht biotransformiert werden, wurden in der Literatur nicht gefunden. Somit ist nach den bisherigen Erkenntnissen von der Spaltung einer Methoxygruppe *in vivo* auszugehen. Systematische

Untersuchungen zur Eignung der verwendeten biomimetischen Systeme, den unterschiedlichen Metabolismus von aromatischen Methoxygruppen nachzuahmen, wurden bisher nicht durchgeführt. Die systematischen Studien zum biomimetischen Verhalten von an den aromatischen Ringen substituierten Benzophenonen und Benzilsäuren beschränkten sich auf Verbindungen mit maximal einer Methoxygruppe in para-Stellung eines oder beider Phenylringe. Verbindungen mit 3,4-Dimethoxystruktur oder mit Methoxygruppen in meta-Stellung wurden nicht einbezogen. Die biomimetischen Umsetzungen des 3,4-Dimethoxybenzophenons im Rahmen dieser Arbeit führten zur Etherspaltung vorrangig der 3-, aber auch der 4-Methoxygruppe. Die entsprechende Dihydroxyverbindung wurde nicht gebildet. Hauptreaktion war die aromatische Hydroxylierung in 2-Stellung. In den biomimetischen Untersuchungen der entsprechenden 3,4-Dimethoxybenzilsäureester **1** und **2** wurde keine der Reaktionen beobachtet. Auch **4** unterscheidet sich in seinem biomimetischen Verhalten vom entsprechend unsubstituierten Benzophenon. **41** wird biomimetisch zur 4-Hydroxy- und zur 3-Hydroxyverbindung umgesetzt. **4** unterliegt keiner aromatischen Oxygenierung. Die entsprechende freie Benzilsäure **44** wird in biomimetischen Systemen zur 4-Hydroxy- und zur 2-Hydroxybenzilsäure oxygeniert. Betrachtet man zusätzlich die Produktspektren der aromatischen Oxygenierung von N-Methyl-4-piperidinyl benzilat und dem zusätzlich veretherten Propiverin in biomimetischen Modellsystemen, zeigt sich, dass die veresterte Benzilsäure in Übereinstimmung mit **44** in 4- und 2-Stellung des Aromaten oxygeniert, Propiverin an den Phenylringen jedoch nicht verändert wird. Für die entsprechenden 4-Methoxyderivate, 4-Methoxybenzophenon, 4-Methoxybenzilsäure und N-Methyl-4-piperidinyl 4-methoxybenzilat, stimmen die biomimetisch gebildeten Produkte aromatischer Oxygenierungen überein. Es werden die 4-Hydroxy- und die 3-Hydroxy-4-methoxyderivate generiert. Da bisher keine 3-Methoxybenzilsäurederivate biomimetisch untersucht wurden, lassen sich zum Vergleich mit den Umsetzungen von **3** nur die Reaktionen von den ebenfalls an beiden Phenylringen substituierten Derivaten 4,4‘-Dimethoxybenzophenon und 4,4‘-Dimethoxybenzilsäure heranziehen. Die Produktspektren des Benzophenonderivates unterscheiden sich von denen der Benzilsäure insoweit, als beide zu den 4-Hydroxy-4‘-methoxy- und 3-Hydroxy-4,4‘-dimethoxyverbindungen reagieren, 4,4‘-Dimethoxybenzophenon aber auch an beiden Methoxygruppen zum 4,4‘-Dihydroxyderivat demethyliert wird. Mit **3** werden im biomimetischen System keine O-Demethylierungen oder aromatischen Oxygenierungen beobachtet. Das 3,3‘-Dimethoxybenzophenon stand für entsprechende biomimetische Studien leider nicht zur Verfügung. Insgesamt lässt sich ableiten, dass sich das biomimetische Verhalten nicht nur von Benzophenonen und Benzilsäuren unterscheiden kann, sondern auch unterschiedliche Benzil-

säurederivate, freie Säure, veresterte Säure oder veresterte und veretherte Benzilsäure, ein unterschiedliches biomimetisches Verhalten zeigen.

Für den Metabolismus der neuen Benzilsäurederivate werden vor allem Reaktionen an der basischen Seitenkette, neben Esterspaltung und N-Demethylierung auch C-Oxygenierung und Oxidation, erwartet. Aromatische Oxygenierungen treten in den biomimetischen Umsetzungen nur untergeordnet auf und werden daher sicherlich nicht den Hauptbiotransformationsweg darstellen. Offen bleibt die Bedeutung der nur untergeordnet stattfindenden O-Dealkylierungen der aromatischen Methoxygruppen der Verbindungen **1**, **2** und **3**.

Für Denaverin wurden die vermuteten Biotransformationsreaktionen Deaminierung, N-Dealkylierung und Esterspaltung sowie die nur untergeordnet stattfindende Etherspaltung durch neueste Untersuchungen bereits bestätigt.

3.5 Umsetzungen von Estrogenen

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des biomimetischen Modells auf Stoffe ohne Diphenylmethanstruktur wurden aufgrund der breiten Anwendung als Arzneimittel Estrogene als Substrate ausgewählt. Von den zur Verfügung stehenden Steroiden wurde zunächst der Estron-3-methylether (**5**) als Modellsubstanz ausgewählt. Anschließend wurden das therapeutisch verwendete Ethinylestradiol (**6**) und der entsprechende 3-Methylether (**7**) untersucht, für die eine Reihe von Metaboliten bekannt ist. Zielstellung war die Nachahmung der metabolischen Reaktionen am Aromaten, Methyletherspaltung und aromatische Oxygenierung.

3.5.1 Biomimetische Untersuchungen

Die Umsetzungen von **5** erfolgten in wässrigen und nichtwässrigen Systemen mit verschiedenen Katalysatoren, Sauerstoffdonatoren, mit Imidazol als Co-Katalysator und zum Teil unter Zusatz von β-Cyclodextrin. Die Reaktionsansätze und -bedingungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Zur Isolierung der Reaktionsprodukte siehe 4.3.
Zur chromatographischen Charakterisierung wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die eine weitgehende Trennung aller zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen ermöglicht (zur Struktur der verwendeten Substrate und Vergleichssubstanzen siehe Abbildung 22). Als stationäre Phase wurde eine RP-18-Säule (5 µm) 125×4 mm verwendet. Als mobile Phase erwiesen sich Mischungen aus Wasser und Methanol, das 16 Vol% einer Dichlormethan-2-Propanol-Mischung enthielt, im Gradientenverlauf am günstigsten (Methode V). Die Detektion erfolgte aufgrund der Absorptionsmaxima der Vergleichssubstanzen mittels DAD bei 280 nm. Dc wurden die Reaktionsansätze in Fließmittel VII, VIII und IX aufgetrennt. Die Umsetzungsprodukte ließen sich mit Dm A und B detektieren. Zusätzlich wurde Dm D zur Detektion phenolischer Produkte eingesetzt.
Die Umsetzungen von **5** mit MnTPFPPCl/Imidazol/Wasserstoffperoxid in Aceton führten zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten, die sich nur unvollständig trennen ließen. Hplc lagen die R_T-Werte der Umsetzungsprodukte in der Mehrzahl zwischen 15,0 und 20,0 min.

Substrat	Katalysator	O-Donator	Lösungsmittel	Weitere Bedingungen
5	MnTPFPPCl	Wasserstoff-peroxid	Aceton, 25 ml	-
5	MnTPFPPCl	Iodosylbenzen	Aceton, 25 ml	-
5	MnTPFPPCl	tert-Butyl-hydroperoxid	Aceton, 25 ml	-
5	FeTPFPPCl	Wasserstoff-peroxid	Aceton, 25 ml	-
5	FeTPFPPCl	Iodosylbenzen	Aceton, 25 ml	-
5	MnTPPCl	Wasserstoff-peroxid	Aceton, 25 ml	-
5	MnTPPCl	Iodosylbenzen	Aceton, 25 ml	-
5	FeTPPCl	Wasserstoff-peroxid	Aceton, 25 ml	-
5	FeTPPCl	Iodosylbenzen	Aceton, 25 ml	-
5	-	Wasserstoff-peroxid	Aceton, 25 ml	-
5	-	Iodosylbenzen	Aceton, 25 ml	-
5	$MnTPFPS_4PCl$	Wasserstoff-peroxid	Wasser, 100 ml	β-Cyclodextrin, 37°C
6	$MnTPFPS_4PCl$	Wasserstoff-peroxid	Wasser, 200 ml	β-Cyclodextrin
7	$MnTPFPS_4PCl$	Wasserstoff-peroxid	Wasser, 200 ml	β-Cyclodextrin

Tabelle 11: Biomimetische Reaktionsansätze der Steroide

Dc waren Produkte über die gesamte Laufstrecke verteilt. Aus den Färbungen mit Dm B lassen sich keine Rückschlüsse auf Strukturelemente ziehen, zumal die resultierenden Farben sehr stark von der aufgesprühten Menge Schwefelsäure, der Dauer der Erwärmung auf 120 °C und dem Zeitpunkt der Betrachtung abhängig sind. Mit Dm D konnten ebenfalls einige Produkte angefärbt werden. Die resultierenden Farben reichten von orange über rot, rotviolett bis grau und bläulich. Zumindest für die roten und rotvioletten Färbungen werden phenolische Strukturen angenommen, obwohl Dm D auch mit Carbonylen kuppeln kann. Für in ihren Strukturen bekannte Carbonyle, wie z. B. **5**, wurden jedoch nur gelbe Färbungen beobachtet. Der Reaktionsansatz wurde dc getrennt und massenspektrometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Fraktionen noch Stoffgemische darstellten. Ihre weitere Trennung war aufgrund der geringen Mengen nicht möglich.

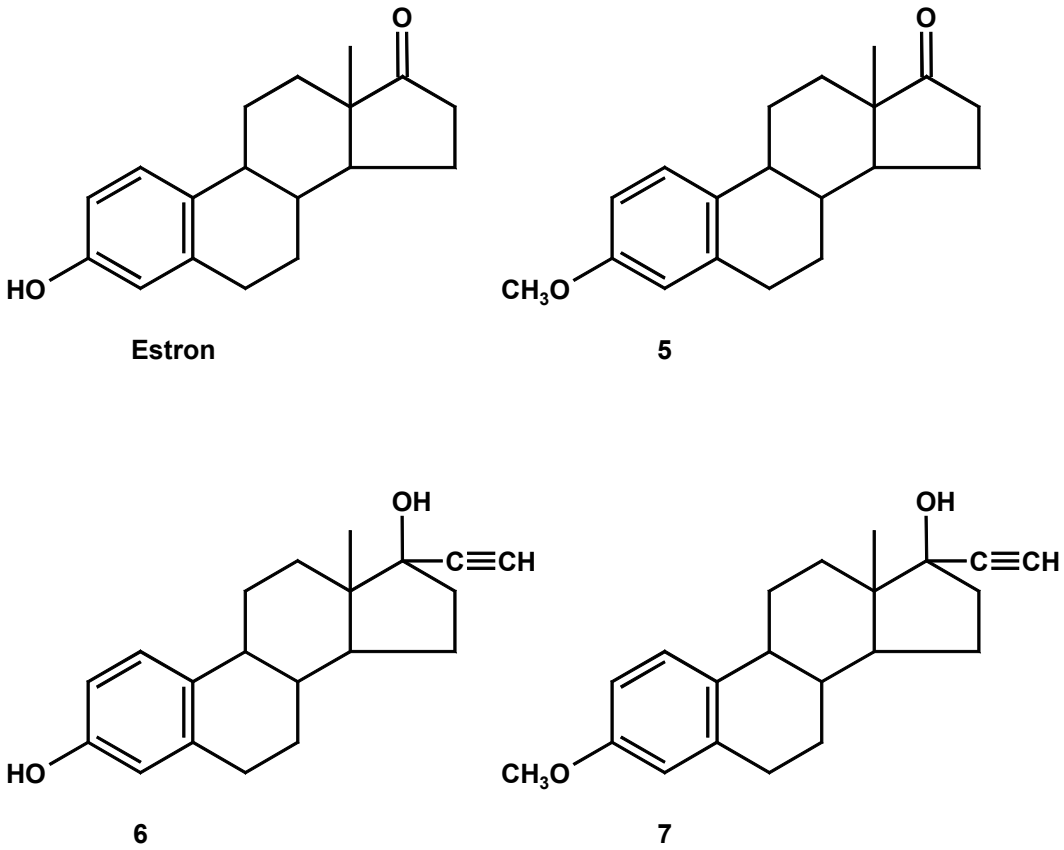


Abbildung 22: Strukturen der zur Verfügung stehenden Estrogene

Als einziges Reaktionsprodukt konnte 6-Oxoestronmethylether (**47**) (siehe Abbildung 23) isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt werden. Das nach Methyletherspaltung entstehende Estron konnte dc und hplc nicht sicher nachgewiesen werden.

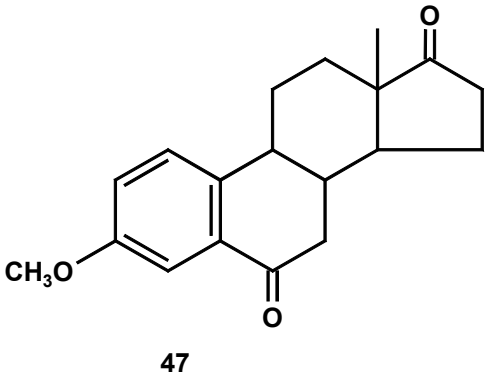


Abbildung 23: Struktur von 6-Oxoestronmethylether

Die weiteren Variationen des nichtwässrigen Systems hinsichtlich der Katalysatoren oder Sauerstoffdonatoren (siehe Tabelle 11) führten ebenfalls zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten. Die Produktspektren variieren in ihrer Zusammensetzung und auch in den Mengen

einzelner Derivate beträchtlich. Lediglich **47** konnte in allen Ansätzen dc nachgewiesen werden. Die größte Ausbeute wurde nach dc Abschätzung mit den Systemen FeTPFPPCl/Imidazol/Iodosylbenzen und MnTPFPPCl/Imidazol/tert-Butylhydroperoxid erzielt. Eine Abschätzung des Gesamtumsatzes ist nicht möglich, da die spektroskopischen Eigenschaften der Reaktionsprodukte sehr uneinheitlich sind. So wurden hplc einige Derivate detektiert, die im UV-Spektrum bei 280 nm ein Minimum zeigten, so dass ein Mengenvergleich aufgrund der Peakhöhen oder -flächen nicht möglich ist. Analog dürften auch dc die Nachweisgrenzen mit den verschiedenen Dm sehr unterschiedlich ausfallen.

Für die wässrigen Ansätze wurde zunächst Cyclodextrin als Lösungsvermittler und zur Erhöhung der Regioselektivität ausgesucht. In Vorversuchen wurden α- und β-Cyclodextrin in Wasser und Wasser-Methanol-Gemischen auf ihre Effektivität hinsichtlich der Löslichkeitsverbesserung von **5** untersucht. Die höchste Löslichkeit erreichte **5** unter Zusatz von 0,01 mol/l β-Cyclodextrin. Die Komplexierung von Estrogenen durch β-Cyclodextrin wurde bereits systematisch untersucht [120]. Dabei bilden sich mit steigender Cyclodextrinkonzentration zunächst leichter wasserlösliche Einschlussverbindungen mit einem Verhältnis Cyclodextrin : Steroid von 1 : 1, welche bei weiterer Konzentrationserhöhung in schwerer lösliche Komplexe mit einem gegenüber dem Steroid erhöhten Anteil an Cyclodextrin übergehen. Die Gesamtmenge an solubilisierten Steroid nimmt daher mit steigenden β-Cyclodextrinkonzentrationen zunächst zu und fällt dann wieder ab. Welcher Molekülteil des Steroids für die Einschlussverbindung verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Für die Reaktionsansätze wurden **5** und die entsprechende Menge β-Cyclodextrin zunächst in Wasser bei 37 °C 3 Stunden zur Gleichgewichtseinstellung gerührt, filtriert und der Katalysator, Imidazol und Wasserstoffperoxid zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Ansatz bis zur Trockne im Vakuum eingeengt und in 10 ml Aceton aufgenommen. Das Produktspektrum wurde analog zu den nichtwässrigen Ansätzen analysiert. Es waren jedoch nur wenige Produkte an der Nachweisgrenze detektierbar, wobei ein Produkt einen mit **47** übereinstimmenden R_F-Wert hatte. Die eindeutige Zuordnung gelang aufgrund der geringen Menge nicht. Die als Vergleichssubstanzen zur Verfügung stehenden Derivate wurden im Reaktionsansatz nicht gefunden. Eine Methyletherspaltung zum Estron fand nicht statt. Kein Reaktionsprodukt ließ sich mit Dm D detektieren.

Die Umsetzungen im wässrigen Milieu wurden unter wenig geänderten Bedingungen (siehe Tabelle 11) ebenfalls mit **6** und **7** durchgeführt. Für **7** waren analog zu **5** nur wenige Reaktionsprodukte nahe der Nachweisgrenze detektierbar. Das nach Methyletherspaltung entste-

hende **6** wurde nicht nachgewiesen. Nach den Umsetzungen von **6** lagen wenige Produkte in etwas größeren Mengen vor, jedoch war eine Strukturaufklärung nicht möglich.

Im Folgenden werden die gemessenen MS und NMR-Daten von Verbindung **5** beispielhaft vorgestellt.

Estrone und andere Estrogene zeigen in der Massenspektrometrie ein recht einheitliches Fragmentierungsverhalten. Neben dem mit hoher Intensität auftretenden Molekülionenpeak, der in der Regel den Basispeak bildet, lassen sich weitere Fragmente in Bruchstücken klassifizieren durch Spaltung des Ringes D (A/B/C-Fragmente), A/B-Fragmente und A/C/D-Fragmente durch Öffnung des B-Ringes [121]. Letztere zeigen nur geringe Intensitäten, so dass sie zur Strukturklärung nur bedingt beitragen. Zudem ist die Zuordnung der Massenzahlen zu bestimmten Fragmentstrukturen nicht immer eindeutig und erfordert intensive ms Untersuchungen. Im MS von **5** treten neben dem Molekülionenpeak als Basispeak vor allem A/B-Fragmente in moderaten Intensitäten auf (siehe Abbildung 24).

Die höchste Intensität mit 99 % zeigt Fragment **l**, welches nach C16-C17-Bindungsspaltung durch e^--Wanderung vom C15 zum C13 entsteht. Spaltung der C11-C12-Bindung führt zu den Fragmenten **e** und **e‘**, durch Bindungsspaltung und e^--Verschiebung oder Umlagerungen bilden sich **u** und **u‘**. Die Vinylgruppe der Fragmente **t**/**t‘‘** besteht aus C14/C15 (**t**) oder C11/C12 (**t‘‘**). Weitere A/B-Fragmente sind **f** und **m**. Relativ intensive A/B/C-Fragmente sind das nach C15/C16-Bindungsspaltung entstandene **c‘‘** und analog das durch C14/C15-Spaltung gebildete **d** und **d‘**. Darüber hinaus treten noch weitere Fragmente mit Intensitäten unter 10 %, jedoch ohne bekannte Strukturen im MS auf.

Das ^{13}C-NMR von **5** wurde bereits mehrfach vermessen und zugeordnet [122]. Die Zuordnung der ^{1}H-Signale wurde aus dem aufgenommenen ^{1}H-^{13}C-korrelierten, zweidimensionalen Spektrum abgeleitet. Die Verschiebungen der einzelnen Atome von **5** und **47** sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Charakteristisch für **5** sind die Protonensignale des aromatischen Ringes bei 6,57 ppm; 6,65 ppm und 7,15 ppm; die Protonensignale der CH_3- und der CH_3O-Gruppe bei 0,83 ppm bzw. 3,71 ppm und das isolierte Protonensignal der CH_2-Gruppe in Position 6 bei 2,82 ppm. Die restlichen Protonen zeigen Resonanzen im Bereich von 1,3 bis 2,5 ppm mit zahlreichen Überlappungen der Multipletts.

Das UV-Spektrum von **5** ist durch zwei Maxima bei 281 nm und 287 nm gekennzeichnet.

Substanz **5** zeigt in Fließmittel VII bei einem R_F-Wert von 0,88 mit Dm B eine orange Färbung, in höheren Konzentrationen mit Dm D eine gelbe Färbung.

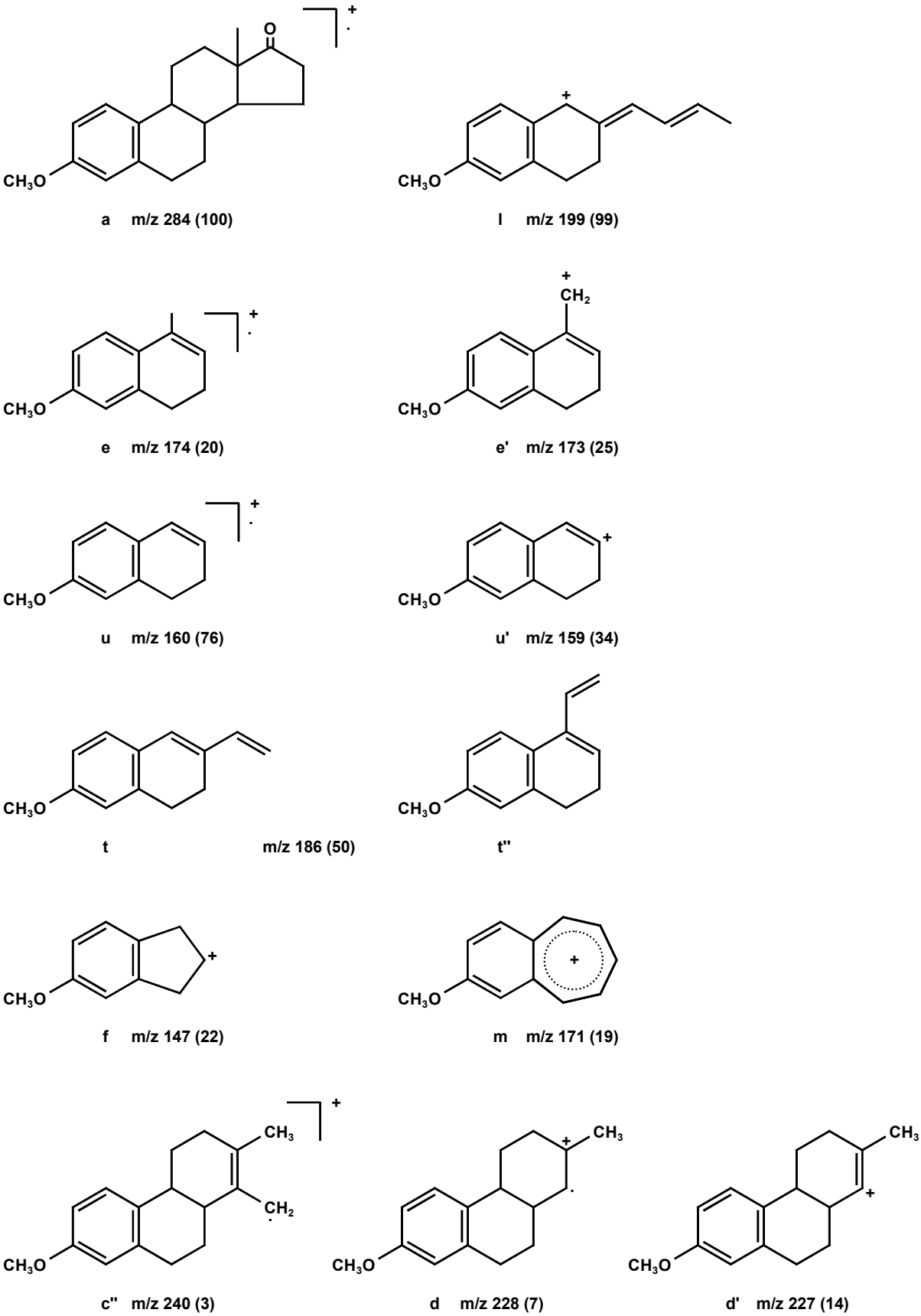


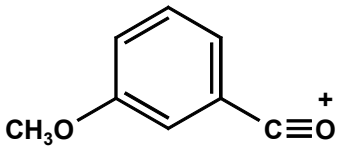
Abbildung 24: Charakteristische Fragmente im MS von Estronmethylether

C-Atom	**5**		**47**	
	^{13}C [ppm]	^{1}H [ppm]	^{13}C [ppm]	^{1}H [ppm]
1	126,31	7,15	126,58	7,34
2	111,54	6,65	121,70	7,12
3	157,55	-	158,34	-
4	113,85	6,57	109,75	7,58
5	137,72	-	130,87	-
6	29,64	2,82	197,28	-
7	26,52	1,93	43,25	(1,25-2,65)
8	38,34	1,46	39,56	(1,25-2,65)
9	43,94	2,20	42,97	2,89
10	132,00	-	138,92	-
11	25,90	1,40/2,30	25,20	(1,25-2,65)
12	31,55	1,40/1,85	31,23	(1,25-2,65)
13	48,00	-	47,68	-
14	50,37	1,46	50,23	(1,25-2,65)
15	21,56	1,50/2,00	21,36	(1,25-2,65)
16	35,85	2,05/2,44	35,68	(1,25-2,65)
17	220,85	-	219,67	-
18	13,82	0,84	13,68	0,92
OCH_3	55,18	3,71	55,54	3,85

Tabelle 12: ^{1}H- und ^{13}C-Daten von **5** und **47**

Die Struktur von **47** wird durch seine MS und NMR-Spektren belegt. Das EI-MS zeigt als Basispeak den Molekülionenpeak bei m/z 298. Die Summenformel $C_{19}H_{22}O_3$ wird durch das beobachtete Isotopenmuster des Molekülions bestätigt. Im MS treten neben dem Molekülionenpeak (A) der (A + 1)-Peak und der (A + 2)-Peak mit relativen Häufigkeiten von 21,6 % und 2,9 % (theoretisch 21,3 % und 2,7 %) auf.

Strukturbeweisend treten die aus dem MS von **5** bekannten und um jeweils 14 Masseeinheiten erhöhten Fragmente auf (siehe Abbildung 23), wobei die A/B/C-Fragmente (**c‘‘**, **d** ,**d‘**) im Vergleich höhere Intensitäten zeigen, während die A/B-Fragmente (**l**, **m**, **t**, **u**, **u‘**) in geringerer Intensität auftreten, mit Ausnahme von **e‘** mit erhöhtem Signal und **e** und **f**, welche gleichbleibend registriert werden. Die 6-Stellung der zusätzlichen Ketogruppe ist mit dem Auftreten des Fragmentes der Massenzahl m/z 135 bewiesen, dessen Struktur in Abbildung 25 wiedergegeben ist.



m/z 135

Abbildung 25: Struktur des Fragmentes mit m/z 135

In Übereinstimmung mit der 6-Oxostruktur stehen die NMR-Spektren, die sich deutlich von den Spektren von **5** unterscheiden. Im ^{13}C-NMR zeigt C6 stark tieffeldverschoben bei 197,3 ppm (+ 167,7 ppm) Resonanz, sowie C7 bei 43,2 ppm (+ 16,7 ppm) , C2 bei 121,7 ppm (+ 10,2 ppm) und C10 bei 138,9 ppm (+ 6,9 ppm). Dagegen sind die Signale von C5 bei 130,9 ppm (- 6,8 ppm) und C4 bei 109,8 ppm (- 4 ppm) hochfeldverschoben. Die Resonanzen der anderen C-Atome sind durch die Substitution nur wenig beeinflusst. Im ^{1}H-NMR sind im Vergleich zu **5** alle Signale der aromatischen Protonen tieffeldverschoben, das Signal des Protons am C4 mit + 1,01 ppm am stärksten. Das C2-Proton ist um + 0,47 ppm und das C1-Proton um + 0,19 ppm ins tiefe Feld verschoben. Dies weist auf eine Substitution in der Nähe des aromatischen Ringes hin. Das Signal der C6-Methylengruppe ist nicht mehr vorhanden. Das bei 2,89 als Dublett vom Dublett auftretende Signal eines Protons stammt vom H-Atom am C9. Weiterhin ist bei 3,85 ppm das Protonensignal der Methoxygruppe am C3 erkennbar, während die restlichen Protonensignale Multipletts zwischen 1,25 und 2,65 ppm zeigen. Die Daten des Protonenresonanzspektrums stimmen mit den bisher in der Literatur für 6-Oxoestronmethylether veröffentlichten überein [123].

Trotz der Ketogruppe als zusätzlichem Chromophor sind die Maxima im UV-Spektrum von **5** nicht bathochrom, sondern hypsochrom verschoben. Die Maxima bei 256 nm und 323 nm (in Chloroform) stimmen mit den Literaturdaten (255 nm, 324 nm) überein [124].

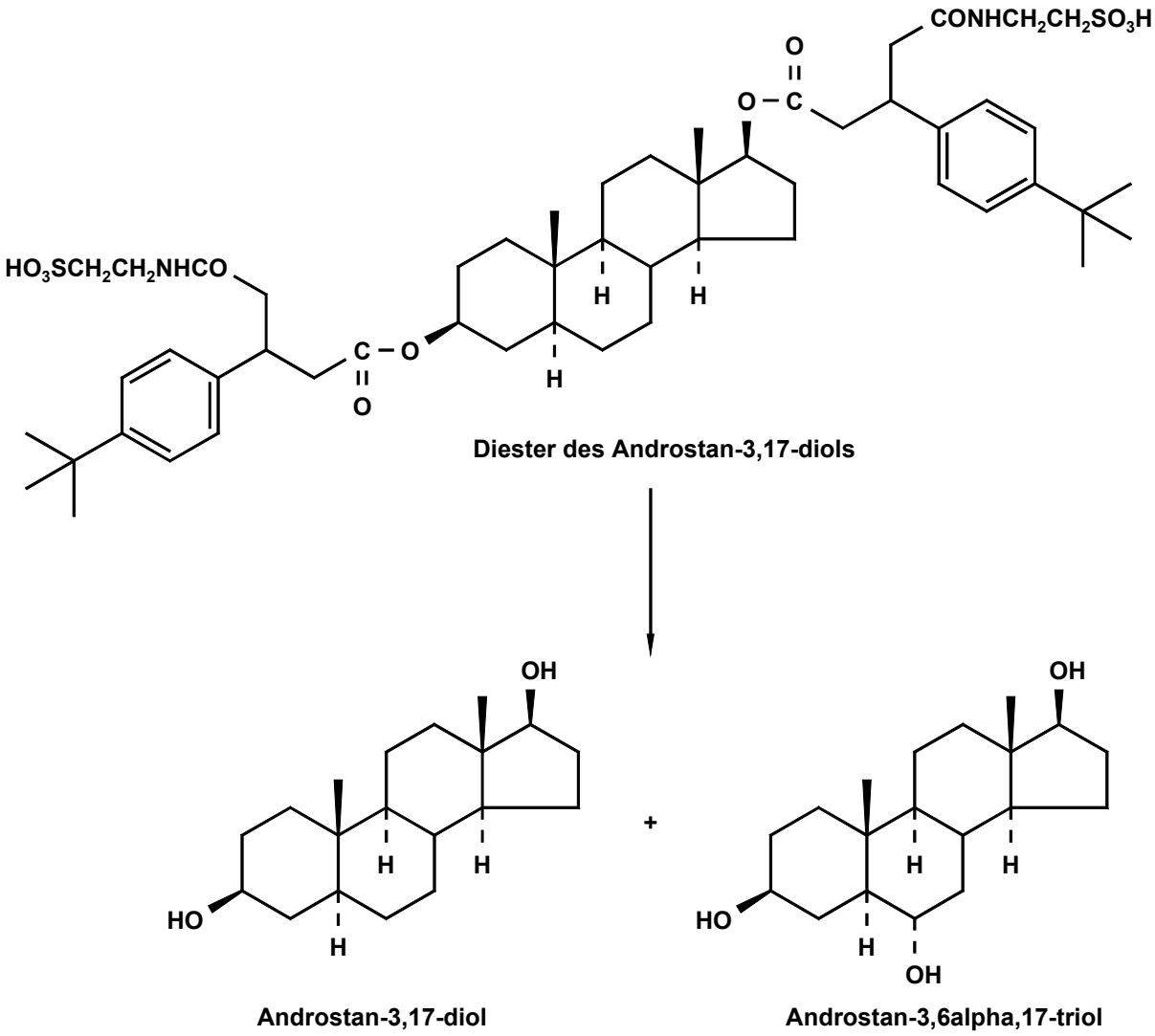
3.5.2 Diskussion

Für **5** liegen keine Daten zum *in vivo* Metabolismus im Menschen vor. Estron und 16α-Azidoestronmethylether wurden hinsichtlich ihres Verhaltens in isolierter, perfundierter Leber von Ratten bzw. Meerschweinchen untersucht [110]. Estron wird am D-Ring hydroxyliert. Beim 16α-Azidoderivat epimerisiert die Azidogruppe, der Methylether wird gespalten und die Ketogruppe am C17 wird zur Hydroxygruppe reduziert. Die Inkubation von Gewebeschnitten humaner Leber mit Estron führte zu einer Reihe von Metaboliten [125]. Hauptwege der Biotransformation waren die Reduktion zum Estradiol und anschließende Hydroxylierungen. In geringen Mengen wurden auch 16α-Hydroxyestron und 2-Methoxyestron isoliert. Weder die Methoxygruppenspaltung noch die Hydroxylierung im D-Ring oder des aromatischen Ringes konnten mit den biomimetischen Systemen nachgeahmt werden.

Das Verhalten von Steroiden wurde bereits in Systemen mit Metallporphyrinen untersucht. Hirobe setzte Estron mit Rutheniumporphyrinen und 2,6-Dichlorpyridin-N-oxid als Sauerstoffdonator um [108]. Es wurden eine Vielzahl von nicht trennbaren Reaktionsprodukten detektiert, wobei 6-Oxoestron als einziges Produkt in 21%iger Ausbeute in seiner Struktur aufgeklärt wurde. Umsetzungen weiterer Steroide ohne Estrogenstruktur, 5α-Cholestan-3-on und andere 5α- und 5β-Steroide, ergaben Hydroxy- und Ketogruppen in 5-, 14- und 15-Stellung und an der C17-Seitenkette. Breslow verwendete für die Umsetzung eines Diesters von Androstan-3,17-diol (siehe Schema 43) ein Mangantetraphenylporphyrin mit vier, an die Phenylringe gebundenen β-Cyclodextrineinheiten, Pyridin und Iodosylbenzen [126]. Nach Hydrolyse der Ester erhielt er als einziges detektierbares Produkt das Androstan-3,6α,17-triol in 40%iger Ausbeute. Mit dem entsprechenden Mangantetrakispentafluorphenylporphyrinderivat konnte die Ausbeute auf 95 % gesteigert werden [127]. Die Sulfonsäuregruppe der Diesterstruktur diente der Löslichkeitserhöhung, während die tert-Butylphenylgruppen für die Bindung an die Cyclodextrineinheiten und damit für die räumlichen Anordnung des Substrates zum aktiven Zentrum des Katalysators verantwortlich gemacht wurden. Ohne tert-Butylphenylgruppen am Substrat fand keine Umsetzung statt.

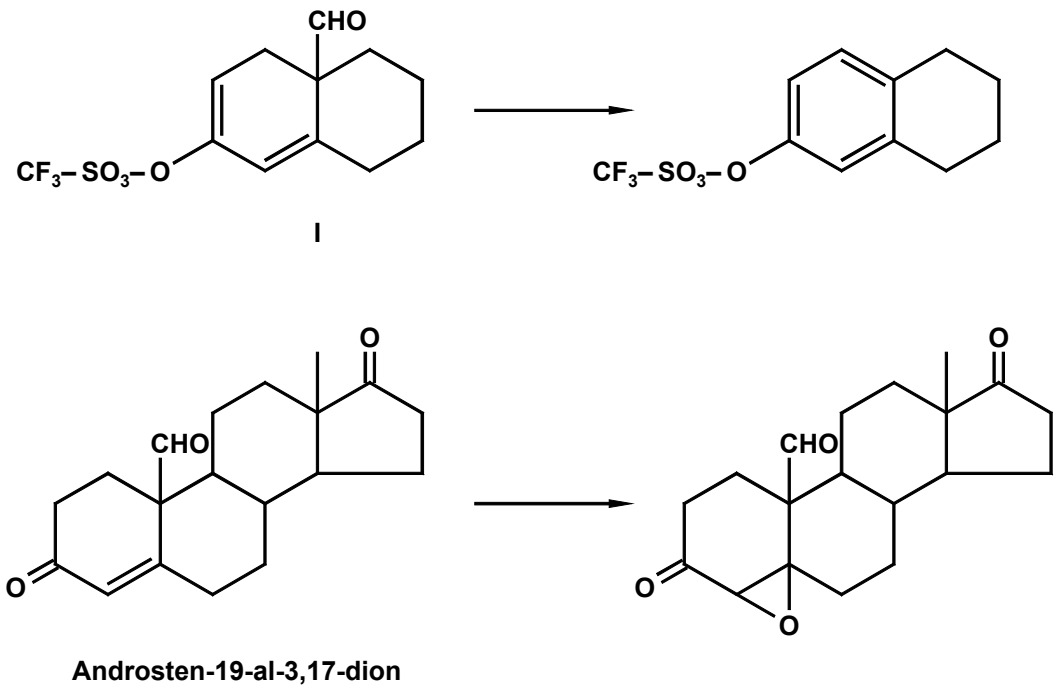
Chauhan setzte Cholesterol mit einem Manganporphyrinderivat und Iodosylbenzen um und erhielt die 5α,6α- und 5β,6β-Epoxide in 10%iger bzw. 45%iger Ausbeute [128]. Die Inkorporation des Katalysators in Phospholipidvesikel, als Modell für biologische Membranen, führte zu einer erhöhten Stereoselektivität. Das 5β,6β-Epoxid wurde mit 60%iger und das

5α,6α-Epoxid mit 2%iger Ausbeute gebildet. Umsetzungen mit Stigmasterol zeigten vergleichbare Ergebnisse. Es wurde nur die 5,6-Doppelbindung epoxidiert, während die 22,23-Doppelbindung erhalten blieb.



Schema 43: Diester von Androstan-3,17-diol und die Produkte nach biomimetischer Umsetzung und Hydrolyse (nach Breslow)

Die Aromataseaktivität von biomimetischen Porphyrinsystemen wurde von Valentine untersucht [129]. Mit einer bizyklischen Modellsubstanz, die den bei der metabolischen Aromatisierung als Zwischenpodukt postulierten enolischen Ring A als Triflat (I) stabilisiert enthält, gelang die Aromatisierung unter Deformylierung. Mit dem natürlichen Aromatasesubstrat Androsten-19-al-3,17-dion fand unter biomimetischen Bedingungen jedoch die Epoxidierung der Doppelbindung statt (siehe Schema 44). In geringen Mengen wurden noch andere Produkte detektiert. Aromatisierung konnte nicht nachgewiesen werden.



Schema 44: Substrate und Produkte in biomimetischen Aromatasemodellen (nach [129])

Aufgrund ihrer Strukturverwandschaft zu den Steroiden und zu den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, potentiell carcinogene Verbindungen, untersuchte Harden das Verhalten von Cyclopenta[a]phenanthrenonen in biomimetischen Systemen auf Metallporphyrinbasis [130]. Mit an den Phenylringen verschieden substituierten Eisentetraphenylporphyrinen und Pentafluoriodosylbenzen erhielt er die 6,7-Epoxide in 21 – 74%iger Ausbeute und die 6,7-Diole in maximal 11%iger Ausbeute. Im Gegensatz dazu werden auf biologischem Weg Ring-A-hydroxylierte Produkte gebildet. Auf klassisch chemischen Wegen werden der C17-Dipol und die elektronenreiche C6/C7-Doppelbindung angegriffen.

Die Oxidationsprodukte von Estron wurden auch in Systemen ohne Metallporphyrine, aber mit anderen modulierenden Zusätzen untersucht, unter anderem mit Co(II)salen [Bis(salicylaldehyd)ethylendiiminocobalt(II)], unter Basenzusatz und mit molekularem Sauerstoff unter Druck [38]; oder als Photooxygenierung mit Bengalrosa [131] oder Tetraphenylporphyrinbase [132] als Sensitizer und molekularem Sauerstoff. Die Reaktionen führten vor allem zu Ring-A-oxidierten Produkten mit chinoider Struktur und zu am C10 hydroxylierten bzw. perhydroxylierten Derivaten. Obwohl diese Systeme über einen anderen Reaktionsmechanismus wirksam werden, kann die Bildung dieser Derivate im metallporphyrinkatalysierten Reaktionen nicht ausgeschlossen werden. In den ms untersuchten Fraktionen war in einer Fraktion ein Fragment mit der Massenzahl m/z 286 nachweisbar, Fragmente der anderen Hauptprodukte mit der Massenzahl m/z 302 (siehe Abbildung 26) jedoch nicht vorhanden.

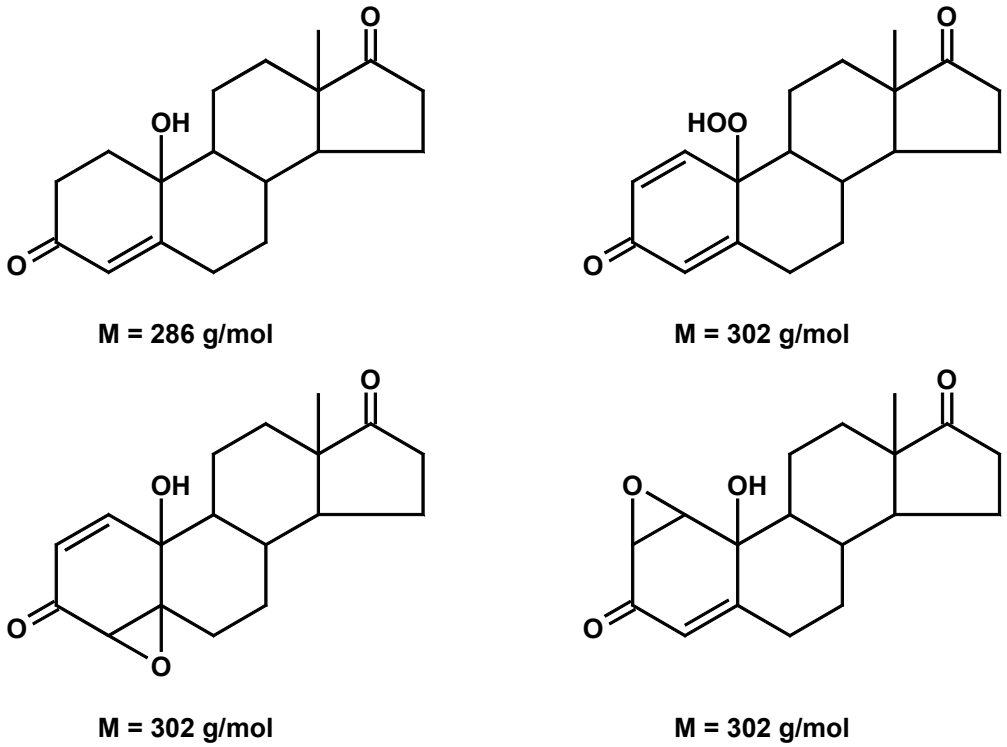


Abbildung 26: Reaktionsprodukte nicht metallporphyrinkatalysierter Reaktionen (nach [131][132])

Insgesamt lässt sich sagen, dass die biomimetischen Untersuchungen im Hinblick auf die Nachahmung metabolischer Reaktionen von Steroiden und verwandten Substanzen bisher nicht erfolgreich waren. Es konnten jedoch einige auf klassisch chemischen Wegen nur schwer zugängliche Derivate mit hoher Regio- und Stereoselektivität synthetisiert werden. In zukünftigen Studien sollte mit komplexen, geometrisch anspruchsvollen Metallporphyrinen die Nachahmung biologischer Reaktionen gelingen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte

Die analytischen HPLC-Untersuchungen erfolgten an einem HP 1090 M (Hewlett Packard) mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) und der Software HP Chem A.04 (Hewlett Packard).
Die Aufnahme der EI-MS erfolgte an einem MS 5995 A (Hewlett Packard) mit Direkteinlasssystem. Die FAB-MS wurden an einem Autospect (Micromass) mit „magic bullett“ als Matrix aufgenommen. Die Aufnahme der CI-MS erfolgte an einem MAT Finnigan 95 ST mit Isobutan als CI-Matrix. Für die ESI-MS wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer TQS 700 mit Elektrospray(API)-Ionisationsquelle (MAT Finnigan) eingesetzt.
Für die GC-MS-Untersuchungen kamen ein GC 5890 Serie II (Hewlett Packard) mit einem Injektor KAS 3 (Gerstel) und ein MS 5989 B (Hewlett Packard) zum Einsatz.
Die NMR-Spektren wurden an einem DPX 300 NMR-Spektrometer (Bruker) erstellt.
Die Schmelzbereiche wurden mit einem Heiztischmikroskop Thermogalen GA-D-4/89 (Leica) bestimmt.
Die Einengung der Lösungsmittel erfolgte mit einem Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor R 111 (Büchi).
Weiterhin wurden ein Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin), Magnetrührer RCT basic (IKA Labortechnik), ein pH-Messgerät pH 522 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten) und eine UV-Lampe Nr. 022.9230 mit 8 W Leistung (Camag) verwendet.

4.2 Chemikalien und Vergleichssubstanzen

4.2.1 Chemikalien

Aceton (Merck), d_6-Aceton ≥ 99,8 % (Aldrich), Acetonitril gradient grade (Merck), Ammoniak-Lösung 33 % (Ferak), Ammoniumacetat (Laborchemie Apolda), Benzoylchlorid (Fluka), basisches Bismutoxidnitrat, tert-Butylhydroperoxid 70 % (Fluka), Chloroform (Baker), α-Cyclodextrin (Aldrich), β-Cyclodextrin (Fluka), Cyclohexan (Ferak), Deuterochloroform ≥ 99,5 % (Merck), Dichlormethan (Merck), Diethylether (Baker), d_6-Dimethylsulfoxid ≥ 99,8 % (Merck), Dinatriumhydrogenphosphat × 12 H_2O (Laborchemie Apolda), 1,4-Dioxan (Laborchemie Apolda), Essigsäure 100 % (Merck), Ethanol (Baker), Ethylacetat (Aldrich), n-Hexan (Merck), 3-Hydroxy-N-Methylpiperidin 98 % (Aldrich), 4-Hydroxy-N-Methylpiperidin 98 % (Aldrich), Imidazol (Serva), Iod (Fluka), Kaliumdihydrogenphosphat (Laborchemie Apolda), Kaliumhexacyanoferrat(III) (Laborchemie Apolda), Kaliumiodid (Merck), Methanol (Baker), Methanol gradient grade (Merck), d_4-Methanol ≥ 99,8 % (Merck), 3-Methylbenzthiazolin-2-on-hydrazon × HCl × H_2O (Aldrich), Natriumhydroxid (Chemapol), Natriumsulfat wasserfrei (Riedel-de-Haën), Perchlorsäure 70 % (Ferak), Phosphorpentoxid (Aldrich), 4-Piperidinol (Fluka), 2-Propanol (Merck), Pyridin (Ferak), Salzsäure 36 % (Riedel-de-Haën), Schwefelsäure 96 % (Laborchemie Apolda), Toluen (Merck), Veratrol (Fluka), Wasserstoffperoxidlösung 30 % (Riedel-de-Haën).
Die verwendeten Metallporphyrine und Iodosylbenzen wurden in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin synthetisiert [133].

4.2.2 Vergleichssubstanzen

4.2.2.1 3,4-Dimethoxybenzilsäurederivate und verwandte Substanzen

3,4-Dimethoxybenzophenon (**8**)

Eine Mischung aus 13,8 g (0,10 mol) Veratrol, 15,5 g (0,11 mol) Benzoylchlorid und 2 g Iod wird 15 Stunden am Rückfluss erhitzt, nach Abdestillieren noch vorhandener Ausgangsstoffe im Vakuum wird **8** erhalten und aus n-Hexan umkristallisiert [134].

$C_{15}H_{14}O_3$ M_r = 242,3 g/mol

Fp: 98 – 101°C

HPLC: R_T: 16,2 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,80 (II); 0,88 (III); 0,57 (V); 0,83 (VI)
Detektion: A, B (gelb), D (gelb)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 242 (26, M^+), 165 (100, a), 137 (12, b), 105 (29, c), 77 (52, d)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,78 (3H, OCH_3); 3,82 (3H, OCH_3); 6,90 (1H, ^3J = 8,5 Hz, C5-H); 7,28 (1H, ^3J = 8,3 Hz, ^4J = 2 Hz, C6-H); 7,37 (1H, ^4J = 1,9 Hz, C2-H); 7,42 (2H, C3‘/C5‘-H); 7,51 (1H, C4‘-H); 7,63 (2H, C2‘/C4‘-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 56,8 (OCH_3); 56,9 (OCH_3); 111,9 (C5); 113,8 (C2); 127,3 (C6); 129,8 (C3‘/C5‘); 131,1 (C2‘/C6‘); 131,6 (C1); 133,6 (C4‘); 140,0 (C1‘); 150,9 (C3); 155,5 (C4); 198,0 (CO)

2-Hydroxy-4,5-dimethoxybenzophenon (**9**)

$C_{15}H_{14}O_4$ M_r = 258,3 g/mol

HPLC: R_T: 14,8 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,67 (V)
Detektion: A, B (gelb), D (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 258 (23, M^+), 181 (15, a), 165 (21, a‘), 153 (3, b), 137 (23, b‘), 105 (81, c), 77 (100, d)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,65 (3H, OCH_3); 3,89 (3H, OCH_3); 6,50 (1H, C3-H); 6,93 (1H, C6-H); 7,41 – 7,61 (5H, C2‘- bis C6‘-H); 12,53 (1H, OH)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 56,3 (OCH_3); 56,5 (OCH_3); 100,7 (C3); 114,4 (C6); 128,4 (C3‘/C5‘); 128,7 (C2‘/C6‘); 131,5 (C4‘); 199,6 (CO)

3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (**10**)

$C_{14}H_{12}O_3$ M_r = 228,2 g/mol

HPLC: R_T: 14,2 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,47 (II); 0,72 (III); 0,35 (V)
Detektion: A, B (gelb), D (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 228 (26, M^+), 151 (100, a), 123 (15, b), 105 (26, c), 77 (31, d)

^{1}H-NMR: δ (ppm): 3,82 (3H, OCH_3); 5,75 (1H, OH); 6,90 (1H, ^3J = 8,2 Hz, C5-H); 7,17 (1H, ^3J = 8,2 Hz, ^4J = 2,2 Hz, C6-H); 7,19 (1H, ^4J = 2,0 Hz, C2-H); 7,38 (2H, C3‘/C5‘-H); 7,48 (1H, C4‘-H); 7,59 (2H, C2‘/C6‘-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm): 56,5 (OCH_3); 111,6 (C5); 117,6 (C2); 125,1 (C6); 129,3 (C3‘/C5‘); 130,6 (C2‘/C6‘); 131,4 (C1); 133,2 (C4‘); 139,6 (C1‘); 147,6 (C3); 153,6 (C4); 197,9 (CO)

4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (**11**)

$C_{14}H_{12}O_3$ M_r = 228,2 g/mol

HPLC: R_T: 14,6 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,53 (II); 0,38 (III); 0,41 (V)
Detektion: A, B (gelb), D (blau)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 228 (26, M^+), 151 (100, a), 123 (30, b), 105 (16, c), 77 (37, d)

^{1}H-NMR: δ (ppm): 3,90 (3H, OCH_3); 6,94 (1H, ^3J = 8 Hz, C5-H); 7,33 (1H, ^3J = 8 Hz, ^4J = 2 Hz, C6-H); 7,52 (1H, ^4J = 2 Hz, C2-H); 7,44 (2H, C3‘/C5‘-H); 7,49 (1H, C4‘-H); 7,58 (2H, C2‘/C6‘-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm): 56,0 (OCH_3); 111,8 (C2); 113,5 (C5); 126,3 (C6); 128,4 (C3‘/C5‘); 129,67 (C2‘/C6‘); 129,75 (C1); 133,7 (C4‘); 138,2 (C1‘); 146,6 (C4); 150,2 (C3); 195,7 (CO)

N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **16**.

$C_{22}H_{27}NO_5$ M_r = 385,4 g/mol

Fp: 108 – 110 °C (Diethylether)

HPLC: R_T: 10,6 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,50 (II); 0,80 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 385 (1, M^+), 243 (31, a), 165 (3, b), 137 (1, c), 105 (100, d), 99 (38, f), 98 (15, g), 97 (4, h), 96 (10, i), 77 (15, e)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,66 und 1,81 (4H, CH_2); 2,1 (3H, N-CH_3); 2,15 und 2,25 (4H, N-CH_2); 3,7 (3H, OCH_3); 3,8 (3H, OCH_3); 4,3 (1H, OH); 4,9 (1H, CH); 6,75 (1H, C5-H); 6,89 (1H, C6-H); 6,93 (1H, C2-H); 7,19 – 7,37 (5H, Phenyl-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 30,3; 30,4; 46,1; 52,1; 55,83; 55,86; 72,0; 80,7; 110,2; 110,7; 119,9; 127,4; 127,96; 128,0; 134,4; 142,2; 148,5; 148,7; 174,0

3,4-Dimethoxybenzilsäure (**12**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Benzilsäureumlagerung des 3,4-Dimethoxybenzils.

$C_{16}H_{16}O_5$ M_r = 288,3 g/mol

Fp: 92 – 96 °C (Wasser)

HPLC: R_T: 9,8 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,22 (II; III); 0,50 (VI)
Detektion: A, B (türkis)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 288 (3, M^+), 243 (17, a), 165 (7, b), 137 (1, c), 105 (100, d), 77 (26, e)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,7 (3H, OCH_3); 3,8 (3H, OCH_3); 4,7 – 6,3 (2H, breit, OH und COOH); 6,76 (1H, C5-H); 6,93 (1H, C2-H); 6,95 (1H, C2-H); 7,27 – 7,41 (5H, Phenyl-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 55,9; 80,8; 110,4; 110,6; 119,8; 127,3; 128,3; 128,4; 133,4; 141,3; 148,7; 149,0; 177,7

(cis, trans)-N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid (**13**)

3,85 g (0,01 mol) der freien Base **1** werden mit 15 ml 30%iger Wasserstoffperoxidlösung 4 Stunden gerührt, im Vakuum eingeengt und schichtchromatographisch (Methode II) von noch vorhandenen **1** und Abbauprodukten (**12**, **8**) getrennt.

$C_{22}H_{27}NO_6$ M_r = 401,4 g/mol

HPLC: R_T: 11,6 und 12,3 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,22 und 0,33 (II); 0,22 und 0,30 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 385 (<1, [M^+ - O]), 243 (26, a), 165 (30, b), 137 (4, c), 105 (100, d), 99 (23, f), 98 (14, g), 97 (3, h), 96 (10, i), 77 (36, e)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,60/1,64 und 2,45/2,24 (4H, cis/trans CH_2); 2,55/3,08 und 2,80/2,87 (4H, cis/trans N-CH_2); 2,80/2,89 (3H, cis/trans N-CH_3); 3,76/3,66 (3H, cis/trans OCH_3); 3,84/3,74 (3H, cis/trans OCH_3); 4,2 (1H, trans OH); 5,1/4,7 (1H, cis/trans CH); 6,77/6,69 (1H, cis/trans C5-H); 6,85/6,85 (1H, cis/trans C6-H); 6,98/6,91 (1H, cis/trans C2-H), 7,28 – 7,36/7,19 – 7,30 (5H, cis/trans Phenyl-H)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 24,5/25,8; 55,7/55,8; 59,9/58,6; 60,4/64,1; 66,6/69,1; 80,9/80,9; 110,0/110,3; 110,9/110,7; 119,5/19,6; 127,2/127,1; 127,6/127,9; 127,7/128,0; 135,0/134,6; 142,9/142,6; 148,4/148,4; 148,5/148,6; 173,0/173,5

4-Piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**14**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **16**.

$C_{21}H_{25}NO_5$ M_r = 371,4 g/mol

Fp: 160 °C (Chloroform/Diethylether)

HPLC: R_T: 9,9 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,37 (II); 0,53 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 371 (3, M^+), 243 (57, **a**); 165 (6, **b**), 137 (1, **c**), 105 (100, **d**), 85 (23, **f**), 84 (12, **g**), 83 (1, **h**), 82 (6, **i**), 77 (21, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,5 und 1,8 (4H, C*H*$_2$); 2,6 und 2,8 (4H, N-C*H*$_2$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 4,2 (1H, O*H*); 4,97 (1H, C*H*); 6,75 (1H, C5-*H*); 6,92 (1H, C6-*H*); 6,94 (1H, C2-*H*), 7,19 – 7,37 (5H, Phenyl-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 32,2; 32,3; 44,0; 56,3; 74,0; 80,6; 110,7; 111,2; 119,6; 127,8; 128,4; 128,5; 134,8; 142,6; 148,9; 173,9

(*E*, *Z*)-N-Formyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**15**)

$C_{22}H_{25}NO_6$ M_r = 399,4 g/mol

HPLC: R_T: 13,1 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,53 (II); 0,83 (III); 0,60 (VI)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 399 (<1, M^+), 243 (25, **a**), 165 (6, **b**), 137 (1, **c**), 113 (7, **f**), 105 (100, **d**), 77 (23, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,63 und 1,75 (4H, C*H*$_2$); 3,16 und 3,45 (4H, N-C*H*$_2$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 5,15 (1H, C*H*); 6,75 (1H, C5-*H*); 6,87 (1H, C6-*H*); 6,93 (1H, C2-*H*); 7,19 – 7,36 (5H, Phenyl-*H*), 7,9 (1H, N-C*H*O)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 29,8/29,9; 31,1/31,2; 36,3/36,4; 42,4/42,5; 56,3; 72,1; 81,2; 110,70/110,73; 111,1; 120,1/120,3; 127,67/127,72; 128,51/128,57; 128,7; 134,43/134,49; 142,2; 149,05/149,11; 149,28/149,33; 161,0; 174,2

Methyl 3,4-dimethoxybenzilat (**16**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB durch Veresterung von **12** mit Dimethylsulfat.

$C_{17}H_{18}O_5$ M_r = 302,3 g/mol

Fp: 88 – 90 °C (Ethanol/Wasser)

HPLC: R_T: 14,4 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,67 (II); 0,87 (III); 0,40 (V); 0,75 (VI)
Detektion: A, B (hellblau), C (grau)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 302 (1,5; M^+), 243 (15, **a**), 165 (5, **b**), 137 (1, **c**), 105 (100, **d**), 77 (30, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,74 (3H, OC*H*$_3$); 3,78 (3H, COOC*H*$_3$); 3,80 (3H, OC*H*$_3$); 4,1 (1H, O*H*); 6,74 (1H, C5-*H*); 6,86 (1H, C6-*H*); 6,93 (1H, C2-*H*); 7,18 – 7,34 (5H, Phenyl-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 53,19; 55,5; 80,5; 110,0; 110,4; 119,5; 127,0; 127,8; 133,4; 141,6; 148,3; 148,5; 174,7

N-Methyl-4-piperidinyl 3,4-dimethoxy-O-methylbenzilat (**18**)

$C_{23}H_{29}NO_5$ M_r = 399,4 g/mol

HPLC: R_T: 14,2 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,55 (II)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 399 (<1, M^+), 257 (77, **a**), 165 (34, **b**), 137 (6, **c**), 105 (99, **d**), 99 (19, **f**), 98 (69, **g**), 97 (16, **h**), 96 (69, **i**), 77 (63, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,62 und 1,70 (4H, C*H*$_2$); 2,13 (3H, N-C*H*$_3$); 2,1 – 2,3 (4H, N-C*H*$_2$); 3,1 (3H, OC*H*$_3$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$), 4,8 (1H, C*H*), 6,74 (1H, C5-*H*); 6,90 (1H, C6-*H*); 6,92 (1H, C2-*H*); 7,19 – 7,36 (5H, Phenyl-*H*)

N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **16**.

$C_{22}H_{27}NO_5$ M_r = 385,4 g/mol

Fp: 82 – 85 °C (Diethylether)

HPLC: R_T: 12,8 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,67 (II); 0,88 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 385 (<1, M^+), 243 (8, **a**), 165 (7, **b**), 137 (2, **c**), 105 (68, **d**), 99 (16, **f**), 98 (21, **g**), 97 (100, **h**), 96 (13, **i**), 84 (28), 77 (22, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,33 und 1,75 (2H, O-CH-C*H*$_2$); 1,47 und 1,63 (2H, N-CH$_2$-C*H*$_2$); 2,11 und 2,59 bzw. 2,37 (4H, N-C*H*$_2$); 2,13 (3H, N-C*H*$_3$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 4,6 (1H, O*H*); 4,9 (1H, O-C*H*); 6,7 (1H, C5-*H*); 6,94 (1H, C6-*H*); 6,98 (1H, C2-*H*); 7,19 – 7,32 (5H, Phenyl-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 22,3; 28,4; 46,1; 55,1; 55,79; 55,84; 58,6; 72,1; 80,7; 110,2; 110,7; 119,7; 127,3; 127,9; 134,5; 142,4; 148,5; 148,6; 173,7

3-Piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**21**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **16**.

$C_{21}H_{25}NO_5$ M_r = 371,4 g/mol

HPLC: R_T: 12,3 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,43 (II); 0,80 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 371 (0, M^+), 243 (7, **a**), 165 (5, **b**), 137 (1, **c**), 105 (100, **d**), 85 (22, **f**), 84 (13, **g**), 83 (18, **h**), 82 (7, **i**), 77 (37, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,35 und 1,44 (2H, O-CH-C*H*$_2$); 1,65 und 1,73 (2H, N-CH$_2$-C*H*$_2$); 2,57 (2H, N-C*H*$_2$); 2,72 und 2,82 (2H, N-C*H*$_2$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 4,8 (1H, C*H*); 6,73 (1H, C5-*H*); 6,88 (1H, C6-*H*); 6,95 (1H, C2-*H*); 7,20 – 7,33 (5H, Phenyl-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 22,8; 28,7/28,8; 45,4; 49,1/49,2; 55,8; 71,3; 80,9; 110,2; 110,7; 119,6/119,8; 127,1; 127,3; 128,0; 134,6; 142,39/142,42; 148,4; 148,6; 173,5

N-Methyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid (**22**)

Die Substanz wird analog Verbindung **13** von **2** ausgehend synthetisiert.

$C_{22}H_{27}NO_6$ M_r = 401,4 g/mol

HPLC: R_T: 12,9 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,35 (II); 0,46 (III)
Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 243 (12, **a**), 165 (31, **b**), 137 (4, **c**), 105 (100, **d**), 99 (11, **f**), 98 (11, **g**), 97 (58, **h**), 96 (7, **i**), 77 (41, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,23 und 1,88 (2H, N-CH$_2$-C*H*$_2$); 1,52 und 2,11 (2H, O-CH-C*H*$_2$); 2,88 und 3,06 (2H, N-C*H*$_2$); 2,93/2,97 (1H, N-C*H*$_3$); 3,60 (2H, N-C*H*$_2$); 3,7 (3H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 5,44 (1H, C*H*); 6,72 (1H, C5-*H*); 6,85 (1H, C6-*H*); 6,94/6,99 (1H, C2-*H*); 7,22 – 7,39 (5H, Phenyl-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 18,52/18,55; 26,95/27,05; 55,66/55,73; 59,48/59,54; 66,1; 67,3; 68,32/68,36; 80,86/80,90; 109,98/110,03; 110,83/110,95; 119,81/119,85; 127,35/127,44; 127,60/127,77; 127,9; 134,76/135,19; 142,42/142,75; 148,21/148,25; 148,32/148,36; 173,4

N-Formyl-3-piperidinyl 3,4-dimethoxybenzilat (**23**)

$C_{22}H_{25}NO_6$ M_r = 399,4 g/mol

HPLC: R_T: 12,9 min (Methode IV)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,70 (II); 0,88 (III); 0,61 (VI)

Detektion: A, B (hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 399 (1, M^+), 243 (22, **a**), 165 (5, **b**), 137 (1, **c**), 113 (28, **f**), 105 (100, **d**), 77 (23, **e**)

4.2.2.2 3,3‘-Dimethoxybenzilsäurederivate und verwandte Substanzen

N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (**3**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **30**.

$C_{22}H_{27}NO_5$ M_r = 385,4 g/mol

Fp: 118 – 120 °C (Chloroform/Diethylether)

HPLC: R_T: 13,7 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,40 (II); 0,85 (III)

Detektion: A, B (grauviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 385 (1, M^+), 243 (16, **a**), 135 (100, **b**), 107 (37, **c**), 99 (68, **f**), 98 (75, **g**), 97 (17, **h**), 96 (82, **i**), 92 (17, **d**), 77 (27, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,64 und 1,79 (4H, C*H*$_2$); 2,1 (3H, N-C*H*$_3$); 2,2 (4H, N-C*H*$_2$); 3,68 (6H, OC*H*$_3$); 4,5 (1H, O*H*); 4,9 (1H, C*H*); 6,76 (2H, C4/C4‘-*H*), 6,94 (2H, C6/C6‘-*H*); 6,95 (2H, C2/C2‘-*H*); 7,16 (2H, C5/C5‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 30,3; 46,0; 52,0; 55,2; 72,2; 80,7; 113,4; 119,9; 128,9; 143,5; 159,3; 173,6

3,3‘-Dimethoxybenzilsäure (**25)**

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB durch Benzilsäureumlagerung des 3,3‘-Dimethoxybenzils.

$C_{16}H_{16}O_5$ M_r = 288,3 g/mol

Fp: 105 – 106 °C (Ethanol)

HPLC: R_T: 3,8 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,20 (II); 0,35 (III); 0,55 (VI)

Detektion: A, B (grauviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 288 (2, M^+), 243 (20, **a**), 135 (100, **b**), 107 (33, **c**), 92 (18, **d**), 77 (30, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,7 (6H, OC*H*$_3$); 6,80 (2H, C4/C4‘-*H*); 6,98 (4H, C2/C6/C2‘/C6‘-*H*); 7,19 (2H, C5/C5‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 55,3; 81,0; 113,2; 113,8; 119,7; 129,3; 142,4; 159,4; 177,5

(cis,trans)-N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat N-oxid (**26**)

Die Synthese erfolgt analog der von **13** von **3** ausgehend.

$C_{22}H_{27}NO_6$ M_r = 401,4 g/mol

HPLC: R_T: 8,3 und 8,7 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,30 und 0,33 (II); 0,32 und 0,42 (III)
Detektion: A, B (grauviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 243 (14, **a**), 135 (100, **b**), 107 (36, **c**), 99 (16, **f**), 98 (21, **g**), 97 (5, **h**), 96 (23, **i**), 92 (25, **d**), 77 (40, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,58/1,79 und 2,42/2,42 (4H, cis/trans C*H*$_2$); 2,61/3,22 und 2,81/3,35 (4H, trans/cis N-C*H*$_2$); 2,81/3,05 (3H, cis/trans N-C*H*$_3$); 3,72/3,71 (6H, cis/trans OC*H*$_3$); 5,0/4,8 (1H, cis/trans C*H*); 6,80/6,79 (2H, cis/trans C4/C4‘-*H*); 6,93/6,97 (2H, cis/trans C6/C6‘-*H*); 6,97/6,99 (2H, cis/trans C2/C2‘-*H*); 7,20/7,19 (2H, cis/trans C5/C5‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 24,4/25,8; 55,0/55,1; 59,8/58,7; 60,4/64,3; 66,5/69,3; 81,0/80,9; 112,6/113,2; 113,4/113,2; 119,6/119,6; 128,6/128,9; 144,3/143,7; 159,0/159,2; 172,6/173,4

4-Piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (**27**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Umesterung von **30**.

$C_{21}H_{25}NO_5$ M_r = 371,4 g/mol

Fp: 152 – 154 °C

HPLC: R_T: 14,7 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,37 (II); 0,70 (III)
Detektion: A, B (grauviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 371 (0,5; M^+), 243 (36, **a**), 135 (100, **b**), 107 (33, **c**), 92 (19, **d**), 85 (67, **f**), 84 (56, **g**), 83 (11, **h**), 82 (29, **i**), 77 (34, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,5 und 1,8 (4H, C*H*$_2$); 2,6 und 2,8 (4H, N-C*H*$_2$); 3,7 (6H, OC*H*$_3$); 4,9 (1H, C*H*); 6,76 (2H, C4/C4‘-*H*); 6,94 (2H, C6/C6‘-*H*); 6,95 (2H, C2/C2‘-*H*); 7,16 (2H, C5/C5‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 31,7; 43,4; 55,2;73,5; 80,7; 113,2; 113,4; 119,8; 128,9; 143,4; 159,3; 173,6

(*E*,*Z*)-N-Formyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (**28**)

$C_{22}H_{25}NO_6$ M_r = 399,4 g/mol

HPLC: R_T: 9,1 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,42 (II); 0,88 (III); 0,65 (VI)
Detektion: A, B (grauviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 243 (16, **a**), 135 (100, **b**), 113 (51, **f**), 107 (32, **c**), 92 (15, **d**), 77 (24, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 1,7 (4H, C*H*$_2$); 3,14/3,14 und 3,48 (4H, N-C*H*$_2$); 3,7 (6H, OC*H*$_3$); 4,2 (1H, O*H*); 5,2 (1H, C*H*); 6,79 (2H, C4/C4‘-*H*); 6,90 (2H, C6/C6‘-*H*); 6,93 (2H, C2/C2‘-*H*); 7,2 (2H, C5/C5‘-*H*); 7,9 (1H, C*H*O)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 29,3/30,7; 35,8/42,0; 55,2; 71,8; 80,8; 113,35; 113,38; 119,67/119,75; 129,05/129,11; 143,1; 159,34; 159,39; 173,5

3,3‘-Dimethoxybenzophenon (**29**)

$C_{15}H_{14}O_3$ M_r = 242,3 g/mol

HPLC: R_T: 11,3 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,83 (II); 0,88 (III); 0,78 (V); 0,93 (VI)
Detektion: A, B (gelb), D (gelb)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 242 (12, M^+), 135 (100, **b**), 107 (45, **c**), 92 (38, **d**), 77 (54, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,8 (6H, OC*H*$_3$); 7,05 (2H, C4/C4‘-*H*); 7,25 – 7,32 (6H, C2/C5/C6/C2‘/C5‘/C6‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 55,4; 114,4; 118,8; 122,8; 129,2; 138,9; 159,5; 196,2

Methyl 3,3‘-dimethoxybenzilat (**30**)

Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin durch Veresterung von **25** mit Dimethylsulfat.

$C_{17}H_{18}O_5$ M_r = 302,3 g/mol

Fp: 69 – 70 °C (Methanol/Wasser)

HPLC: R_T: 10,2 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,67 (II); 0,78 (III); 0,58 (V); 0,85 (VI)
Detektion: A, B (grauviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 302 (1, M^+), 243 (22, **a**) 135 (100, **b**), 107 (29, **c**), 92 (15, **d**), 77 (23, **e**)

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 3,7 (6H, OC*H*$_3$); 3,8 (3H, OC*H*$_3$); 4,13 (1H, O*H*); 6,77 (2H, C4/C4‘-*H*); 6,92 (4H, C2/C6/C2‘/C6‘-*H*); 7,17 (2H, C5/C5‘-*H*)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 53,6; 55,2; 80,9; 113,3; 113,4; 119,8; 129,1; 143,2; 159,4; 174,7

N-Methyl-4-piperidinyl 3,3‘-dimethoxy-O-methylbenzilat (**31**)

$C_{23}H_{29}NO_5$ M_r = 399,5 g/mol

HPLC: R_T: 11,8 min (Methode III)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,90 (VI)
Detektion: A, B (grauviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 257 (24, **a‘**), 243 (28, **a**), 135 (28, **b**), 107 (13, **c**), 105 (100, ?), 99 (36, **f**), 98 (26, **g**), 97 (15, **h**), 96 (25, **i**), 92 (6, **d**), 77 (34, **e**)

4.2.2.3 Denaverinhydrochlorid und Derivate

2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat hydrochlorid (**4**-HCl); Denaverin-HCl (Apogepha Arzneimittel GmbH)

HPLC: R_T: 20,1 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,88 (I); 0,78 (II); 0,95 (III); 0,14 (IV); 0,13 (V)
Detektion: A, B (rotviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 283 (4, **d**), 267 (4, **a**), 183 (30, **b**), 165 (7, **e**), 105 (22, **c**), 77 (7, **f**), 71 (44, **g**), 58 (100, **h**)

ESI-MS: m/z: 384 $[M + H]^+$

FAB-MS: m/z: 384 $[M + H]^+$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,8 (6 H, C*H*$_3$); 1,37 (5 H, C*H*-C*H*$_2$); 2,6 (6 H, N-C*H*$_3$); 3,2 (2 H, N-C*H*$_2$); 3,4 (2 H, O-C*H*$_2$); 4,5 (2 H, CO-O-C*H*$_2$); 7,3 – 7,4 (10 H, aromatische Protonen)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 11,5; 23,8; 42,1; 43,2; 56,2; 59,7; 67,2; 87,1; 128,5; 128,7; 128,8; 140,7; 172,0

O-(2-Ethylbutyl)benzilsäure (**36**)

(Apogepha Arzneimittel GmbH)

HPLC: R_T: 3,6 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,92 (I); 0,55 (II); 0,55 (III); 0,70 (IV); 0,47 (V)
Detektion: A, B (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 267 (17, **a**), 183 (100, **b**), 165 (24, **e**), 105 (87, **c**), 77 (31, **f**)

ESI-MS: m/z: 311 $[M - H]^-$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,8 (6 H, C*H*$_3$); 1,38 (5 H, C*H*-C*H*$_2$); 3,2 (2 H, O-C*H*$_2$); 7,3 – 7,4 (10 H, aromatische Protonen)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 11,4; 23,8; 41,8; 67,6; 86,8; 128,5; 129,0; 129,1; 138,5; 173,1

2-Methylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat (**37**)

(Apogepha Arzneimittel GmbH)

Fp: 108 – 113°C

HPLC: R_T: 19,1 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,78 (I); 0,63 (II); 0,93 (III); 0,05 (IV); 0,07 (V)
Detektion: A, B (rotviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 268 (1, **d**), 267 (3, **a**), 183 (48, **b**), 165 (14, **e**), 105 (55, **c**), 77 (20, **f**), 57 (47, **g**), 44 (100, **h**)

ESI-MS: m/z: 370 $[M + H]^+$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,8 (6 H, C*H*$_3$); 1,35 (5 H, C*H*-C*H*$_2$); 2,5 (3 H, N-C*H*$_3$); 3,2 (2 H, N-C*H*$_2$); 3,2 (2 H, O-C*H*$_2$); 4,4 (2 H, CO-O-C*H*$_2$); 7,3 – 7,4 (10 H, aromatische Protonen)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 10,1; 22,4; 32,0; 41,0; 46,5; 59,5; 66,0; 85,5; 127,0; 127,2; 127,4; 139,5; 171,0

2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat N-oxid (**38**)

(Apogepha Arzneimittel GmbH)

HPLC: R_T: 14,9 (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,45 (I); 0,55 (II); 0,55 (III); 0,10 (IV); 0,03 (V)
Detektion: A, B (rotviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 283 (2, **d**), 267 (5, **a**), 183 (34, **b**), 165 (12, **e**), 105 (37, **c**), 77 (13, **f**), 71 (50, **g**), 58 (100, **h**)

ESI-MS: m/z: 400 $[M + H]^+$

FAB-MS: m/z: 400 $[M + H]^+$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,7 (6 H, C*H*$_3$); 1,26 (5 H, C*H*-C*H*$_2$); 3,1 (8 H, N-C*H*$_3$ und O-C*H*$_2$); 3,9 (2 H, N-C*H*$_2$); 4,6 (2 H, CO-O-C*H*$_2$); 7,2 – 7,3 (10 H, aromatische Protonen)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 11,1; 23,4; 41,7; 56,5; 57,8; 66,8; 67,6; 86,1; 128,1; 128,3; 140,1; 171,1

(*E*,*Z*)-2-(N-Formyl-N-methylamino)ethyl O-(2-ethylbutyl)benzilat (**39**)

$C_{24}H_{31}NO_4$ M_r = 397,5 g/mol

HPLC: R_T: 14,6 und 15,3 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,95 (I); 0,77 (II); 0,93 (III); 0,53 (IV)
Detektion: A, B (rotviolett), C (orange)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 297 (<1, **d**), 267 (17, **a**), 183 (100, **b**), 165 (17, **e**), 105 (77, **c**), 77 (22, **f**), 86 (23, **g**), 72 (8, **h**)

ESI-MS: m/z: 398 $[M + H]^+$, 420 $[M + Na]^+$

FAB-MS: m/z: 420 $[M + Na]^+$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,7 (6 H, C*H*$_3$); 1,27 (5 H, C*H*-C*H*$_2$); 2,5 bzw. 2,6 (3 H, (*Z*)- bzw. (*E*)-N-C*H*$_3$); 3,0 (2 H, O-C*H*$_2$); 3,3 bzw. 3,4 (2 H, (*Z*)- bzw. (*E*)-N-C*H*$_2$); 4,19 bzw. 4,25 (2 H, (*Z*)- bzw. (*E*)-CO-O-C*H*$_2$); 7,2 – 7,4 (10 H, aromatische Protonen); 7,6 bzw. 7,8 (1 H, (*Z*)- bzw. (*E*)-C*H*O)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 11,54 bzw. 11,56; 23,84 bzw. 23,86; 30,0 bzw. 35,6; 42,1; 43,6 bzw. 48,5; 62,0 bzw. 63,2; 86,5; 128,19; 128,29; 128,41; 128,80; 128,83; 141,2 bzw. 141,5; 163,0 bzw. 163,1; 172,1

2-[2-(2-Ethylbutoxy)-2,2-diphenylacetoxy]essigsäure (**40**)

$C_{22}H_{26}O_5$ M_r = 370,4 g/mol

HPLC: R_T: 4,7 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,72 (I); 0,37 (III); 0,61 (IV)
Detektion: A, B (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 267 (24, **a**), 183 (100, **b**), 165 (23, **e**), 105 (75, **c**), 77 (25, **f**)

FAB-MS: m/z: 393 $[M + Na]^+$

CI-MS: m/z: 353 $[M + H – H_2O]^+$

^{1}H-NMR: δ (ppm) = 0,8 (6 H, C*H*3); 1,2 (5 H, C*H*-C*H*2); 3,1 (2 H, O-C*H*2); 4,2 (2 H, CO-O-C*H*2); 7,1 – 7,4 (10 H, aromatische Protonen)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 11,0; 23,1; 41,2; 64,9; 65,2; 85,2; 127,42; 127,46; 128,4; 142,1; 168,9; 170,9

Benzophenon (**41**)

(Aldrich)

Fp: 49 – 51°C

HPLC: R_T: 6,4 (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,97 (I); 0,93 (II); 0,95 (III); 0,80 (IV); 0,85 (V)
Detektion: A, B (gelb), D (gelb)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 182 (20, M^+), 105 (100, **c**), 77 (35, **f**)

Methyl benzilat (**42**)

0,02 mol Benzilsäure (**44**) werden in Methanol gelöst und mit etherischer Diazomethanlösung (Herstellung nach [135]) bis zur bleibenden, schwachen Gelbfärbung versetzt; bis zur Trockne im Vakuum eingeengt; in wenig Diethylether aufgenommen, mit verdünnter Natronlauge und Wasser gewaschen; mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeengt.

$C_{15}H_{14}O_3$ M_r = 242,3 g/mol

HPLC: R_T: 4,1 (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,95 (I); 0,88 (II); 0,95 (III); 0,73 (IV); 0,75 (V)
Detektion: A, B (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 183 (47, **b**), 165 (2, **e**), 105 (100, **c**), 77 (72, **f**)

FAB-MS: m/z (%, Fragment): 265 (68, $[M + Na]^+$), 225 (60, **i**), 197 (14, **k**), 183 (84, **b**)

Methyl O-(2-ethylbutyl)benzilat (**43**)

Die Synthese erfolgte, analog der von **42**, von **36** ausgehend.

$C_{21}H_{26}O_3$ M_r = 326,4 g/mol

HPLC: R_T: 18,7 (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,97 (I); 0,92 (II); 0,97 (III); 0,88 (IV); 0,90 (V)
Detektion: A, B (rotviolett)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 267 (11, **a**), 183 (79, **b**), 165 (17, **e**), 105 (100, **c**), 77 (55, **f**)

FAB-MS: m/z (%, Fragment): 349 (33, $[M + Na]^+$), 267 (18, **a**), 225 (92, **i**), 197 (21, **k**), 183 (100, **b**)

Benzilsäure (**44**)

(Apogepha Arzneimittel GmbH)

Fp: 146 – 148°C

HPLC: R_T: 1,0 (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,43 (I); 0,32 (II); 0,42 (III); 0,42 (IV); 0,08 (V)
Detektion: A, B (rotviolett)

2-Hydroxybenzophenon (**45**)

(Aldrich)

Fp: 37 – 39°C

HPLC: R_T: 7,6 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,98 (I); 0,93 (II); 0,95 (III); 0,93 (IV); 0,87 (V)
Detektion: A, B (gelb), D (rot)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 198 (12, M^+), 121 (11, **c**), 105 (100, **c**), 93 (7, **f**), 77 (60, **f**)

2-Dimethylaminoethyl O-(2-ethylbutyl)-2-hydroxybenzilat (**46**)

$C_{24}H_{33}NO_4$ M_r = 399,5 g/mol

HPLC: R_T: 15,1 min (Methode I)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,58 (I)

Detektion: A, B (rotviolett), C (orange), D (rot)

EI-MS: m/z (%, Fragment): kein M^+, 299 (1, **d**), 283 (<1, **a**), 199 (16, **b**), 181 (4, **e**), 121 (9, **c**), 105 (26, **c**), 93 (3, **f**), 77 (9, **f**), 71 (50, **g**), 58 (100, **h**)

FAB-MS: m/z: 400 $[M + H]^+$, 422 $[M + Na]^+$

Weiterhin standen als Vergleichssubstanzen zur Verfügung: 2-Dimethylaminoethyl benzilat, 2-Dimethylaminoethyl benzilat N-oxid, 2-Methylaminoethyl benzilat, 2-Dimethylaminoethyl 2,2-diphenylacetat, 2,2-Diphenylessigsäure und 3,3-Diphenyl-4-methyl-morpholin-2-on (alle Apogepha Arzneimittel GmbH).

4.2.2.4 Estrogene

3-Methoxy-estra-1,3,5 (10)-trien-17-on (**5**), Estronmethylether

(Jenapharm GmbH)

HPLC: R_T: 22,4 min (Methode V)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,87 (VII); 0,90 (VIII); 0,65 (IX)

Detektion: A, B (gelb), D (gelb)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 284 (100, M^+), 240 (3, **c‘‘**), 228 (7, **d**), 227 (14, **d‘**), 199 (99, **l**), 186 (51, **t** oder **t‘‘**), 174 (20, **e**), 173 (25, **e‘**), 171 (20, **m**), 160 (76, **u**), 159 (33, **u‘**), 147 (22, **f**)

3-Methoxy-estra-1,3,5 (10)-trien-6,17-dion (**47**), 6-Oxoestronmethylether

$C_{19}H_{22}O_3$ M_r = 298,2 g/mol

HPLC: R_T: 19,1 min (Methode V)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,53 (VII)

Detektion: A, B (grau), D (gelb)

EI-MS: m/z (%, Fragment): 298 (100, M^+), 254 (18, **c‘‘**), 242 (18, **d**), 241 (28, **d‘**), 213 (15, **l**), 200 (35, **t** oder **t‘‘**), 188 (20, **e**), 187 (39, **e‘**), 185 (8, **m**), 174 (32, **u**), 161 (22, **f**), 135 (21)

19-Nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol (**6**), Ethinylestradiol (Jenapharm GmbH)

HPLC: R_T: 16,3 min (Methode V)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,35 (VII), 0,57 (VIII)
Detektion: A, B (rotviolett)

3-Methoxy-19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-17-ol (**7**), Mestranol (Jenapharm GmbH)

HPLC: R_T: 21,8 min (Methode V)

DC: R_F (Fließmittelgemisch): 0,68 (VII), 0,80 (VIII)
Detektion: A, B (grau)

4.3 Biomimetische Reaktionsansätze

Es wurden 2 mmol Substrat, 150 µmol Co-Katalysator und 15 µmol Katalysator in 10 ml des entsprechenden Lösungsmittels gelöst. Als Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, für die nichtwässrigen Ansätze ein Gemisch aus Dichlormethan und Acetonitril im Verhältnis 1 : 1 und für die wässrigen Ansätze bidestilliertes Wasser, teilweise unter Zusatz von 1 molarer Salzsäure zur pH-Wert-Einstellung, verwendet. Nach Zugabe von 2 mmol des Sauerstoffdonators wurde der Ansatz 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrigen Ansätze wurden gefriergetrocknet und in 10 ml Methanol aufgenommen. Die Isolierung der Reaktionsprodukte erfolgte über präparative Schichtchromatographie.

4.4 Biologische Reaktionsansätze

Es wurden männliche Wistar-Ratten (150 – 200 g) verwendet, denen 12 Stunden vor Versuchsbeginn die Nahrung entzogen wurde.

Präparation des 10 000 g-Überstandes:
Die Rattenleber wurde nach Präparation unter eiskalten Bedingungen gewogen und anschließend in eiskaltem Puffer (0,01 mol/l Phosphatpuffer, pH-Wert = 7,6, mit Zusatz von 1,15 % Kaliumchlorid) mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 10 000 g, 4 °C, 20 min zentrifugiert. Der 10 000 g-Überstand wurde sofort verwendet. 2 ml des Überstandes entsprachen 0,5 g Leber.
Inkubationsansätze:
1 ml der **4**-HCl-Lösung (2,6 mmol/l), 3 ml der Cofaktorlösung und 2 ml des 10 000 g-Überstandes wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. 3 ml Cofaktorlösung enthielten in Phosphatpuffer (0,5 mol/l, pH-Wert = 7,6) 0,65 µmol NADP, 10 µmol Glucose-6-phosphat, 50 µmol Nicotinamid und 25 µmol Magnesiumchlorid gelöst. Als Blindproben wurden Ansätze mit 1 ml Wasser statt der **4**-HCl-Lösung und als Vergleichsprobe Ansätze mit 2 ml Phosphatpuffer (0,01 mol/l, pH-Wert = 7,6, mit Zusatz von 1,15 % Kaliumchlorid) statt des 10 000 g-Überstandes mitgeführt.
Isolierung der Reaktionsprodukte:
Die inkubierten Ansätze wurden gefriergetrocknet, dreimal mit einem Dichlormethan-2-Propanol-Gemisch (3 : 1) extrahiert, vorsichtig eingeengt und in Methanol aufgenommen. Die weitere Isolierung und Identifizierung erfolgte analog der Aufarbeitung der biomimetischen Reaktionsansätze.

4.5 Chromatographische Methoden

4.5.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische DC wurden HPTLC-Platten, Kieselgel $60F_{254}$, 5 × 7,5 cm (Merck) verwendet. Die Entwicklung der Platten erfolgte in Doppeltrogkammern (Camag), nach 15minütiger Kammersättigung, über eine Laufhöhe von 60 mm. Die Platten wurden nach der Entwicklung luftgetrocknet.

Fließmittelgemische:

I : Dichlormethan/Methanol (90 + 10)

II : Dichlormethan/Cyclohexan/Methanol/Ammoniak (50 + 35 + 15 + 1)

III : Dioxan/Cyclohexan/Ethylacetat/Ethanol/Ammoniak (15 + 15 + 40 + 20 + 10)

IV : Toluen/Dioxan/Essigsäure 100 % (76 + 21 + 3)

V : Toluen/Ethylacetat (80 + 20)

VI : Toluen/Dioxan/Methanol/Essigsäure 100 % (66 + 21 + 10 + 3)

VII : Chloroform/Ethylacetat (90 + 10)

VIII : Chloroform/Aceton/n-Hexan (80 + 10 + 10)

IX : Aceton/n-Hexan (70 + 30)

Detektionsmittel (Dm):

A: Fluoreszenslöschung bei 254 nm

B: konzentrierte Schwefelsäure (96 %), anschließend wird die Platte 10 min bei 120 °C erhitzt

C: Dragendorffs Reagenz [136]: 0,85 g basisches Bismutoxidnitrat werden in 50 ml Essigsäure (20 %) gelöst, 8 g Kaliumiodid werden in 20 ml Wasser gelöst; zur Herstellung der Sprühlösung werden je 5 ml beider Lösungen gemischt und mit 90 ml Essigsäure (20 %) verdünnt.

D: MBTH-Reagenz [56]: die Platte wird in einer mit Ammoniak gesättigten Kammer 15 min gesättigt und anschließend nacheinander mit einer 2%igen, methanolischen MBTH-Lösung und einer 8%igen, wässrigen Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung besprüht.

4.5.2 Präparative Schichtchromatographie

Für die präparative Schichtchromatographie wurden PSC-Fertigplatten, Kieselgel $60F_{254}$, 20×20 cm, 2 mm Schichtdicke (Merck) und DC-Alufolien, Kieselgel $60F_{254}$, 20×20 cm (Merck) verwendet. Die Entwicklung erfolgte in Normalkammern, nach 30minütiger Kammersättigung, über eine Laufhöhe von 16 cm. Die verwendeten Fließmittelgemische entsprachen denen der analytischen DC. Die Substanzbanden wurden detektiert, ausgekratzt oder ausgeschnitten, mit Methanol extrahiert und anschließend eingeengt.

4.5.3 HPLC

Als stationäre Phase wurden eine LiChroCart-Vorsäule (4 × 4 mm) und eine LiChroCart-Fertigsäule (125 × 4 mm), (Merck), verwendet, jeweils mit dem angegebenen LiChroSpher-Material (5 µm) gefüllt. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor bei den angeführten Wellenlängen.

Methoden:

I :Dinatriumhydrogenphosphatlösung 0,0002 mol/l / Methanol; Gradientenverlauf: linear von 60 % auf 98 % Methanol in 20 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion: 230 nm; LiChroSpher RP-8

II :Wasser / Acetonitril; Gradientenverlauf: lineare Erhöhung des Acetonitrilanteils von 20 % auf 100 % in 25 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion: 254 nm; LiChroSpher RP-18

III :Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH-Wert = 7,5 / Acetonitril; Gradientenverlauf: konstant 10 % Acetonitril, nach der ersten Minute lineare Erhöhung des Acetonitrilanteils auf 90 % nach 17 min, konstant bis 20 min; Fluss: 1,5 ml/min; Detektion: 280 nm; LiChroSpher RP-select B

IV :wässrige Ammoniumacetatlösung (0,05 mol/l), mit 70%iger Perchlorsäure auf pH-Wert = 2,3 eingestellt / Acetonitril; Gradientenverlauf: lineare Erhöhung des Acetonitrilanteils von 20 % auf 27 % innerhalb 10 min, auf 50 % nach 15 min, konstant bis 20 min; Fluss: 1,2 ml/min; Detektion: 280 nm; LiChroSpher RP-select B

V :Wasser / Methanol mit 12 Vol% Dichlormethan und 4 Vol% 2-Propanol; Gradientenverlauf: lineare Erhöhung des Methanolanteils von 38 % auf 43 % innerhalb 10 min, auf 63 % nach 13 min, auf 71 % nach 18 min, konstant bis 20 min, dann wieder Erhöhung auf 100 % nach 22 min, konstant bis 25 min; Fluss: 1,2 ml/min; Detektion: 280 nm; LiChroSpher RP-18

4.5.4 Quantitative Bestimmungen

Die Bezugskurven für die quantitative Bestimmung von **1** wurden mit der HPLC-Methode IV erstellt. Als Standardlösungen wurden drei unabhängige Verdünnungsreihen mit drei Konzentrationen von 5,0 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1,25 mg/ml in Acetonitril mit Zusätzen von MnTPFPPCl und Imidazol hergestellt und vermessen (Abbildung 26). Die lineare Regression ergibt eine Abhängigkeit der Peakfläche (y) von der Konzentration (x) nach der Gleichung: $y = 1032{,}36x + 16{,}261$. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,9984.

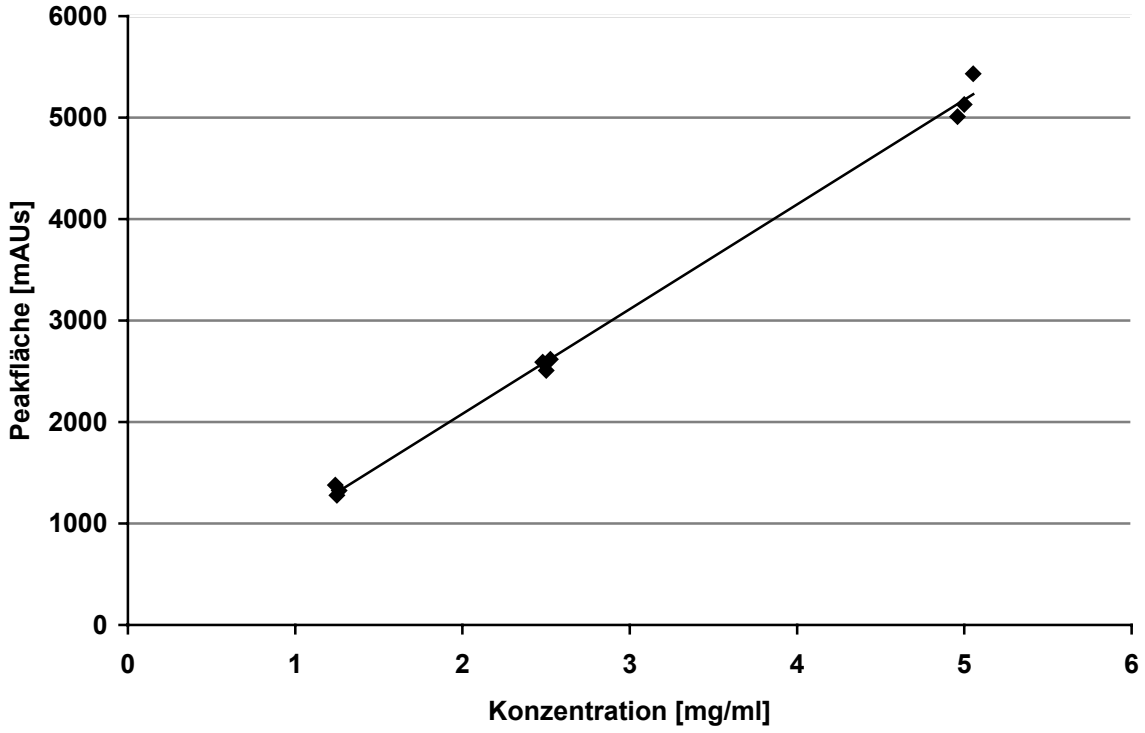


Abbildung 26: Bezugskurve für die Bestimmung von **1**

Aus den Bestimmungen von zehn Lösungen mit je 3,72 mg/ml **1** wurden der Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die prozentuale Standardabweichung (s_{rel}) bestimmt (Tabelle 13).

integrierte Peakfläche	berechneter Gehalt mg/ml	
3623,92	3,495	
3671,89	3,541	
3875,59	3,738	Mittelwert $\bar{x}$ = 3,65 mg/ml
3932,35	3,793	
3751,11	3,618	Standardabweichung s = ± 0,10047 mg/ml
3692,36	3,561	
3816,94	3,682	prozentuale Standardabweichung s_{rel} = ± 2,75 %
3840,63	3,704	
3740,81	3,608	
3897,84	3,760	

Tabelle 13: Statistische Auswertung für die Bestimmung von **1**

Der Test auf Richtigkeit nach Student [137] ergab keine signifikante Abweichung vom Sollwert im Vertrauensintervall von 95 % ($\alpha = 0{,}05$).

4.6 NMR-Untersuchungen

Ca. 5 – 10 mg Substanz wurden in 0,6 ml Deuterochloroform gelöst und in 5 mm Probenröhrchen gegen Tetramethylsilan als internen Standard vermessen.

^{1}H-NMR:
eindimensionale ^{1}H-Spektren: Frequenz: 300,13 MHz, 0 bis 14 ppm Messbreite, 16 bis 32 Akkumulationen
^{13}C-NMR:
eindimensionale ^{13}C-Spektren: Frequenz: 75,47 MHz, 0 bis 240 ppm Messbreite, normalerweise 120 bis 960 Akkumulationen, z. T. bis 2048 Akkumulationen
zweidimensionale ^{1}H-^{13}C-korrelierte Spektren: bis zu 8 Akkumulationen

4.7 Massenspektrometrische Untersuchungen

EI- Bedingungen: Ionenquelltemperatur: 140 – 175 °C; Ionisationsenergie: 70 eV
Die m/z-Werte sind den Massenspektren entnommen und mit den relativen Intensitäten [%] aufgeführt.

4.8 GC-MS-Untersuchungen

1 ml einer Acetonitrillösung von je ca. 0,5 µmol/ml der Piperidinderivate wurde in einem 4 ml-Glas bei 50 °C temperiert. Die Extraktion der Verbindungen erfolgte über 5 min in der Gasphase über der Lösung (Headspace-Technik) mit einer Polyacrylatfaser, 85 µm Schichtdicke (Supelco). Anschließend wurde die Faser direkt in den Injektorblock des Gaschromatographen gebracht und über einen Temperaturgradienten desorbiert. Die Probe wurde splitless auf die GC-Säule aufgegeben. Als GC-Säule wurde eine HP 5 MS-Säule mit 30 m Länge,

einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm von Hewlett Packard verwendet. Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch.

Bedingungen:

Injektor: Temperaturgradient: von 40 °C bis 300 °C mit einem Anstieg von 12 °C/min

GC: Trägergas: Helium, Temperaturverlauf: 70 °C, nach 2 min mit 10 °C/min ansteigend bis 150 °C, danach mit 20 °C/min bis auf 270 °C ansteigend

Massenselektiver Detektor: Elektronenstoßionisation mit einer Ionisationsenergie von 70 eV, Massenscan [m/z]: 60 – 120

5 Zusammenfassung

In der Bewertung von Arzneimitteln spielt die Kenntnis der Biotransformation und des entstehenden Metabolitenspektrums eine wichtige Rolle. Zunehmend werden zur Klärung der metabolischen Abbaureaktionen auch biologische und chemische Methoden in Ergänzung zu *in vivo*-Metabolismusstudien eingesetzt. Die Anwendung chemischer Modellsysteme auf Metallporphyrinbasis zur Erarbeitung möglicher Metabolisierungswege für neue Benzilsäurederivate, die als potentielle Antiparkinsonmittel entwickelt wurden, und die Testung der Anwendbarkeit solcher Systeme zur Modellierung der Biotransformation von Estrogenderivaten sind Gegenstand dieser Arbeit.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse zur Anwendung von biomimetischen Modellsystemen in ergänzenden Metabolismusstudien von Arzneistoffen wurden Mangan- oder Eisenporphyrine mit elektronenziehenden Substituenten an den meso-Phenylringen und ihre wasserlöslichen Derivate als Katalysatoren verwendet. Als Co-Katalysator wurde zur Erhöhung der Umsetzungsrate eine Stickstoffbase, in der Regel Imidazol, zugesetzt. Als Sauerstoffquellen dienten Wasserstoffperoxid und Iodosylbenzen. Die biomimetischen Umsetzungen wurden im wässrigen und im nichtwässrigen Milieu durchgeführt.

Zur Erprobung des erarbeiteten biomimetischen Systems [56] wurden als Substrate die N-Methyl-4-piperidinyl- und -3-piperidinylester der 3,4- bzw. 3,3‘-Dimethoxybenzilsäure (**1**, **2**, **3**) sowie 3,4-Dimethoxybenzophenon (**8**) ausgewählt. Die systematischen Untersuchungen zur Optimierung des biomimetischen Modells wurden damit um die zweifach an den aromatischen Ringen substituierten Diphenylmethanderivate erweitert. In Umsetzungen mit Denaverin (**4**), ein Dialkylaminoethylester der veretherten, an den Aromaten unsubstituierten Benzilsäure, kam das chemische Modellsystem mit der Zielstellung zur Anwendung potentielle, neue Metabolisierungswege zu erkennen sowie neue, bisher unbekannte Derivate als Vergleichssubstanzen zur Verfügung zu stellen. Als Modellsubstanz zur Überprüfung der Anwendbarkeit des optimierten biomimetischen Systems auf Estrogene wurde Estronmethylether (**5**) ausgewählt. In die Untersuchungen wurden weiterhin Ethinylestradiol (**6**) und Mestranol (**7**) einbezogen.

Die entstehenden Produktspektren wurden zunächst dc und hplc untersucht. Die Isolierung der einzelnen Derivate erfolgte schichtchromatographisch. Zur Strukturklärung wurden ms und nmr Methoden eingesetzt. Zum Teil war der Einsatz spezieller Techniken notwendig, wie

weiche Ionisierungsmethoden in der Massenspektroskopie (ESI-MS, FAB-MS oder CI-MS), zweidimensionale NMR-Spektren oder Kopplungstechniken (GC-MS).

Die neuen, am Aromaten substituierten Benzilsäurederivate **1**, **2** und **3** unterscheiden sich nicht in ihren Reaktivitäten im biomimetischen System. Hauptumsetzungsprodukte sind die N-Formylderivate, die N-Oxide, die N-Demethylderivate, die freien Säuren und die entsprechenden Benzophenone. Der 3-Piperidinylester **2** ist gegenüber oxidativen Angriffen stabiler. Im Gegensatz zu bisherigen biomimetischen Untersuchungen mit aromatisch substituierten Benzilsäurederivaten [56] wurden keine aromatische Oxygenierung oder Spaltung der aromatischen Methoxygruppen beobachtet. Das substituierte Benzophenon **8** unterliegt sowohl der aromatischen Hydroxylierung als auch der Etherspaltung. Für die Ausgangsverbindungen und ihre Derivate wurden die analytischen Methoden zur Isolierung und Identifizierung erarbeitet und die entsprechenden Vergleichssubstanzen für Biotransformationsstudien zur Verfügung gestellt.

Die bisherigen systematischen Untersuchungen zum Verhalten von unterschiedlich substituierten Benzophenon- und Benzilsäurederivaten wurden um die zweifach an den aromatischen Ringen substituierten Diphenylmethanderivate ergänzt. Es zeigte sich, dass die biomimetischen Reaktionen an den Aromaten entscheidend von der Struktur des Diphenylmethangrundgerüstes abhängen. In der Regel nimmt die Reaktivität am Aromaten in der Reihenfolge Benzophenon → freie Benzilsäure → Benzilsäureester → Benzilsäureester und –ether ab.

Für **1** wurden die Umsetzungen über die Abnahme der Ausgangsverbindung in unterschiedlichen Modellsystemen quantifiziert. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des biomimetischen Systems wurden im nichtwässrigen Milieu bis zu 48 % der Ausgangsverbindung umgesetzt. Erstmals wurden Umsetzungen in wässrigen Systemen quantifiziert. Die Effektivität ist geringer als im organischen Milieu. Es wurden maximal 23 % des Substrates umgesetzt. Die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss der verschiedenen Zusammensetzungen der katalytischen Systeme wurden für die Umsetzungen von Benzilsäurederivaten bestätigt.

Für die Esterspaltung von **1** zu **12** wurde der oxidative Mechanismus nachgewiesen. Es wurde eine GC-MS-Methode entwickelt, mit der nach Probenvorbereitung mittels Headspace-SPME die Identifizierung des N-Methyl-4-piperidons als Produkt der oxidativen Spaltung neben dem Hydrolyseprodukt N-Methyl-4-piperidinol gelang.

Denaverin unterliegt im biomimetischen Ansatz den Funktionalisierungsreaktionen N-Dealkylierung, N- und C-Oxidation, Esterspaltung, in geringerem Umfang der Decarboxylierung und der O-Dealkylierung und im wässrigen, neutralen Milieu mit dem System $FeTPFPS_4PCl$/Imidazol/Wasserstoffperoxid der aromatischen Oxygenierung. Damit wurde

die Bildung aller Produkte oxidativer Biotransformationswege der Ratte, bis auf ein Morpholinonderivat (das ein Metabonat darstellt), und die bisher bekannten Biotransformationsreaktionen des menschlichen Organismus nachgeahmt [114][119]. Mit dem N-Formylderivat **39** und dem durch Deaminierung gebildeten **40** konnten zwei neue Derivate isoliert werden, die für weitere *in vivo*-Metabolismusstudien als Vergleichssubstanzen nutzbar sind. C-Oxidation einer N-Methylgruppe und Deaminierung stellten für Denaverin neue, bisher nicht beobachtete Biotransformationswege dar. Die Deaminierung sowie die nur untergeordnet stattfindene Etherspaltung wurden durch neueste Untersuchungen zum Metabolismus des Menschen bestätigt [114]. Mit dem verwendeten biologischen Modell der Rattenlebermikrosomen wurden nur zwei Produkte (**37**, **38**) enzymatisch gebildet. Es eignet sich daher nur bedingt zur Nachahmung metabolischer Vorgänge. Neue Reaktionswege werden nicht aufgezeigt.

Die bisher biomimetisch untersuchten Benzilsäurederivate zeigen ähnliche Produktspektren. Für den Metabolismus der untersuchten Benzilsäurederivate werden daher, unabhängig von einer Substitution an den aromatischen Ringen, vor allem Biotransformationsreaktionen an den basischen Seitenketten postuliert. Aromatische Oxygenierungen werden nicht erwartet. Die Bildung von N-Formylderivaten stellt für basisch substituierte Benzilsäurederivate einen bisher nicht beobachteten, potentiellen Biotransformationsweg dar.

Die Versuche zur Nachahmung der Biotransformation von Estrogenen mit Hilfe chemischer Modellsysteme auf Metallporphyrinbasis waren trotz vielfältiger Variationen der Zusammensetzung des biomimetischen Systems nicht erfolgreich. Lediglich 6-Oxoestronmethylether (**47**) wurde aus Reaktionsansätzen von **5** isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt.

Zukünftige Arbeiten sollten sich mit notwendigen Variationen befassen, mit denen sich biomimetische Modellsysteme schnell auf ihre Eignung zur Nachahmung des Metabolismus von Arzneistoffen mit verschiedenen Grundstrukturen testen lassen. Für Estrogene und andere Steroide sollten in systematischen Studien die chemischen Modellsysteme optimiert werden können, um diese zur Gewinnung von Vergleichssubstanzen und für erste Aussagen zu möglichen Biotransformationswegen zu nutzen.

Literatur

[1] Langner, A.: Pharmazie in unserer Zeit, **24**, 207 (1995)

[2] Breslow, R.: Chem. Soc. Rev., **1**, 553 (1972)

[3] Collmann, J. P.: Inorg. Chem., **36**, 5145 (1997)

[4] Hirobe, M.: Pure & Appl. Chem., **66** (4), 729 (1994)

[5] Barret, R.; Jaussaud, P.; Pautet, F.; Guyot, J. L.; Daudon, M.: Arzneim.-Forsch./Drug Res., **39 II** (12), 1574 (1989)

[6] Masumoto, H.; Takeuchi, K.; Ohta, S.; Hirobe, M.: Chem. Pharm. Bull., **37** (7), 1788 (1989)

[7] Feig, A. L.; Lippard, S. J.: Chem. Rev., **94**, 759 (1994)

[8] Mansuy, D.; Battioni, P.; Battioni, J.-P.: Eur. J. Biochem., **184**, 267 (1989)

[9] Meunier, B.: Chem. Rev., **92**, 1411 (1992)

[10] Collman, J. P.; Zhang, X.; Lee, V. J.; Uffelman, E. S.; Brauman, J.I.: Science, **261**, 1404 (1993)

[11] Lindemann, D.; Fröhlich, L.; Göber, B.: Sci. Pharm., **64**, 541 (1996)

[12] Fröhlich, L.; Göber, B.: Pharm. Ind., **59**, 803 (1997)

[13] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 1992

[14] Karlsson, P.; Doenecke, D.; Koolmann, J.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1993

[15] Zagermann-Muncke, P.: PZ, **144**, 25 (1999)

[16] Green, M. T.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 10772 (1998)

[17] Pratt, J. M.; Ridd, T. I.; King, L. J.: J. Chem. Soc., Chem. Comm., 2297 (1995)

[18] Newcomb, M.; Le-Tadic-Biadatti, M.-H.; Chestney, D. L.; Roberts, E. S.; Hollenberg, P. F.: J. Am. Chem. Soc., **117**, 12085 (1995)

[19] Shaik, S.; Filatov, M.; Schröder, D.; Schwarz, H.: Chem. Eur. J., **4** (2), 193 (1998)

[20] Toy, P. H.; Newcomb, M.; Hollenberg, P. F.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 7719 (1998)

[21] Stearns, R. A.; Ortiz de Montellano, P. R.: J. Am. Chem. Soc., **107**, 4081 (1985)

[22] Shestakov, A. F.; Shilov, A. E.: J. Mol. Cat. A, Chemical; **105**, 1 (1996)

[23] Collman, J. P.; Chien, A. S.; Eberspacher, T. A.; Braumann, J. I.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 425 (1998)

[24] Editoren: Schenkman, J. B.; Greim, H.: Cytochrom P450. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993

[25] Urano, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2; 1169 (1996)

[26] Manchester, J. I.; Dinnocenzo, J. P.; Higgins, L.; Jones, J. P.: J. Am. Chem. Soc., **119**, 5069 (1997)

[27] Karki, S. B.; Dinnocenzo, J. P.: Xenobiotica, **25** (7), 711 (1995)

[28] Guengerich, F. P.; Okazaki, O.; Seto, Y.; Macdonald, T. L.: Xenobiotica, **25** (7), 689 (1995)

[29] Oae, S.; Kitao, T.; Kawamura, S.: Tetrahedron, **19**, 1783 (1963)

[30] Guengerich, F. P.: J. Biol. Chem., **262** (18), 8459 (1987)

[31] Funaki, T.; Soon, P. A.; Guengerich, F. P.; Breimer, D. D.: Biochem. Pharmacol., **38** (23), 4213 (1989)

[32] Peng, H.-M.; Raner, G. M.; Vaz, A. D. N.; Coon, M. J.: Arch. Biochem. Biophys., **318** (2), 333 (1995)

[33] Davis, S. C.; Sui, Z.; Petersen, J. A.; Ortiz de Montellano, P. R.: Arch. Biochem. Biophys., **328** (1), 35 (1996)

[34] Watanabe, K.; Narimatsu, S.; Yamamoto, I.; Yoshimura, H.: J. Biol. Chem., **266** (5), 2709 (1996)

[35] Komuro, M.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: Bioorg. Med. Chem., **3** (1), 55 (1995)

[36] Tamagaki, S.; Sasaki, M.; Tagaki, W.: Bull. Chem. Soc. Jpn., **62**, 153 (1989)

[37] Murahashi, S.-I.: Angew. Chem., **107**, 2670 (1995)

[38] Nali, M.; Rindone, B.; Tollari, S.; Valletta, L.: J. Mol. Cat., **41**, 349 (1987)

[39] Punniyamurthy, T.; Reddy, M. M.; Singh Kalra, S. J.; Iqbal, J.: Pure & Appl. Chem., **68** (3), 619 (1996)

[40] Rohde, R.; Neef, G.; Sauer, G.; Wiechert, R.: Tetrahedron Letters, **26** (17), 2069 (1985)

[41] Pietzyk, B.; Fröhlich, L.; Göber, B.: Pharmazie, **51**, 654 (1996)

[42] Montanari, F.; Banfi, S.; Pozzi, G.; Quici, S.: Rev. Heteroatom Chem., **6**, 94 (1992)

[43] Wijesekera, T. and Dolphin D.: "Synthetic Aspects of Porphyrin and Metalloporphyrin Chemistry", Editor R.A. Sheldon, in "Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations", Marcel Dekker Inc., New York, 1994, 193

[44] Jin, N.; Groves, J. T.: J. Am. Chem. Soc., **121**, 2923 (1999)

[45] Arasasingham, R. D.; He, G.-X.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **115**, 7985 (1993)

[46] Iida, K.; Nango, M.; Okada, K.; Matsumoto, S.; Matsuura, M.; Yamashita, K.; Tsuda, K.; Kurono, Y.; Kimura, Y.: Chemistry letters, 1307 (1994)

[47] Selke, M.; Sisemore, M. F.; Valentine, J. S.: J. Am. Chem. Soc., **118**, 2008 (1996)

[48] Gross, Z.; Simkhovich, L.: Tetrahedron Letters, **39**, 8171 (1998)

[49] Carrier, M. N.; Scheer, C.; Gouvine, P.; Bartoli, J. F.; Battioni, P.; Mansuy, D.: Tetrahedron Letters, **31**, 6645 (1990)

[50] Hino, F.; Dolphin, D.: Chem. Comm., 629 (1999)

[51] Vidal, M.; Bonnafous, M.; Defrance, S.; Loiseau, P.; Bernadou, J.; Meunier, B.: Drug Metab. Disp., **21** (5), 811 (1993)

[52] Lee, W. A.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **107**, 513 (1985)

[53] Machii, K.; Watanabe, Y.; Morishima, I.: J. Am. Chem. Soc., **117**, 6691 (1993)

[54] Traylor, T. G.; Kim, C.; Fann, W.-P.; Perrin, C. L.: Tetrahedron, **54**, 7977 (1998)

[55] Battioni, P.; Renaud, J. P.; Bartoli, J. F.; Reina-Artiles, M.; Fort, M.; Mansuy, D.: J. Am. Chem. Soc., **110**, 8462 (1988)

[56] Fröhlich, L.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1997

[57] Zipplies, M. F.; Lee, W. A.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **108**, 4433 (1986)

[58] Balasubramanian, P. N.; Schmidt, E. S.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **109**, 7865 (1987)

[59] Bernadou, J.; Meunier, B.: Chem. Comm., 2167 (1998)

[60] Arasasingham, R. D.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **113**, 6095 (1991)

[61] Beck, M. J.; Gopinath, E.; Bruice, T. C.: J. Am. Chem. Soc., **115**, 21 (1993)

[62] Bell, S. E. J.; Cooke, P. R.; Inchley, P.; Leanord, D. R.; Lindsay Smith, J. R.; Robbins, A.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2; 549 (1991)

[63] Groves, J. T.; Haushalter, R. C.; Nakamura, M.; Nemo, T. E.; Evans, B. J.: J. Am. Chem. Soc., **103**, 2884 (1981)

[64] Groves, J. T.; Watanabe, Y.: J. Am. Chem. Soc., **110**, 8443 (1988)

[65] Balch, A. L.; Latos-Grazynski, L.; Renner, W. M.: J. Am. Chem. Soc., **107**, 2983 (1985)

[66] Mandon, D.; Weiss, R.; Jayaraj, K.; Gold, A.; Terner, J.; Bill, E.; Trautwein, A. X.: Inorg. Chem., **31**, 4404 (1992)

[67] Liu, M.; Su, Y. O.: J. Electroanal. Chem., **452**, 113 (1998)

[68] Sisemore, M. F.; Burstyn, J. N.; Valentine, J. S.: Angew. Chem., **108** (2), 195 (1996)

[69] Tajima, K.; Oka, S.; Edo, T.; Miyake, S.; Mano, H.; Mukai, K.; Sakurai, H.; Ishizu, K.: J. Chem. Soc., Chem. Commun.; 1507 (1995)

[70] Ayougou, K.; Bill, E.; Charnock, J. M.; Garner, C. D.; Mandon, D.; Trautwein, A. X.; Weiss, R.; Winkler, H.: Angew. Chem., **107** (3), 370 (1995)

[71] Groves, J. T.; Lee, J.; Marla, S. S.: J. Am. Chem. Soc., **119**, 6269 (1997)

[72] Volz, H.; Müller, W.: Liebigs Ann. Chem., 1097 (1992)

[73] Guengerich, F. P.; Yun, C.-H.; Macdonald, T. L.: J. Biol. Chem., **271** (44), 27321 (1996)

[74] Baciocchi, E.; Lanzalunga, O.; Lapi, A.; Manduchi, L.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 5783 (1998)

[75] Goto, Y.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S.; Jones, J. P.; Dinnocenzo, J. P.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 10672 (1998)

[76] Guitton, J.; Tinardon, F.; Lamrini, R.; Lacan, P.; Desage, M.; Francina, A.: Free Rad. Biol. Med., **25** (3), 340 (1998)

[77] Hart-Davis, J.; Battioni, P.; Boucher, J.-L.; Mansuy, D.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 12524 (1998)

[78] Wietzerbin, K.; Meunier, B.; Bernadou, J.: Chem. Commun., 2321 (1997)

[79] Okochi, E.; Mochizuki, M.: Chem. Pharm. Bull., **43** (12), 2173 (1995)

[80] Komuro, M.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1; 2306 (1996)

[81] Johnstone, R. A. W.; Simpson, A. J.; Stocks, P. A.: Chem. Commun., 2277 (1997)

[82] Wagenknecht, H.-A.; Woggon, W.-D.: Angew. Chem., **109** (4), 404 (1997)

[83] Keserü, G. M.; Balogh, G. T. Bokotey, S.; Árvai, G.; Bertók, B.: Tetrahedron, **55**, 457 (1999)

[84] Oka, S.; Kitamura, Y.; Nagasawa, M.; Kashimoto, M.; Tagima, K.; Sakurai, H.: Chem. Pharm. Bull., **46** (9), 1349 (1998)

[85] Duchstein, H.-J.; Riederer, S.: PZ, **140** (31), 2761 (1995)

[86] Wollenberger, U.; Neumann, B.; Scheller, F. W.: Elekrochimica Acta, **43** (23), 3581 (1998)

[87] Nagatsu, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: Chem. Pharm. Bull., **37** (5), 1410 (1989)

[88] Nagatsu, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: Chem. Pharm. Bull., **38** (2), 400 (1990)

[89] Stanjek, V.; Miksch, M.; Lueer, P.; Matern, U.; Boland, W.: Angew. Chem., **111** (3), 413 (1999)

[90] Komuro, M.; Nagatsu, Y.; Higuchi, T.; Hirobe, M.: Tetrahedron Letters, **33** (34), 4949 (1992)

[91] Rueff, J.; Rodrigues, A.; Laires, A.; Gaspar, J.: Mut. Res., **269**, 243 (1992)

[92] Andersen, K. E.; Begtrup, M.; Chorghade, M. S.; Lee, E. C.; Lau, J.; Lundt, B. F.; Petersen, H.; Sørensen, P. O.; Thøgersen, H.: Tetrahedron, **50** (29), 8699 (1994)

[93] Chorghade, M. S.; Dezaro, D. A.; Hill, D. R.; Lee, E. C.; Pariza, R. J.: Bioorg. Med. Chem. Letters, **4** (24), 2867 (1994)

[94] Chorghade, M. S.; Hill, D. R.; Lee, E. C.; Pariza, R. J.; Dolphin, D. H.; Hino, F.; Zhang, L.-Y.: Pure & Appl. Chem., **68** (3), 753 (1996)

[95] Fröhlich, L.; Pietzyk, B.; Göber, B.: Arch. Pharm., **328**, 389 (1995)

[96] Fröhlich, L.; Pietzyk, B.; Göber, B.: Pharmazie, **50**, 736 (1995)

[97] Fröhlich, L.; Pietzyk, B.; Smolinka, K.; Göber, B.: Pharmazie, **51**, 745 (1996)

[98] Fröhlich, L.; Pietzyk, B.; Smolinka, K.; Göber, B.: Pharmazie, **51**, 409 (1996)

[99] Roth, H. J.; Eger, K.; Troschütz, R.: Pharmazeutische Chemie III, Arzneistoffanalyse. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1990

[100] Vorwerk, T.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2000

[101] Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1987

[102] Sato, H.; Dan, T.; Onuma, E.; Tanaka, H.; Aoki, B.; Koga, H.: Chem. Pharm. Bull., **40** (1), 109 (1992)

[103] Criodain, T. O.; O'Sullivan, M.; Meegan, M. J.; Donelly, D. M. X.: Phytochemistry, **20** (5), 1089 (1981)

[104] Shvo, Y.; Kaufman, E. D.: J. Org. Chem., **46**, 2148 (1981)

[105] Stewart, W. E.; Siddall, T. H.: Chem. Rev., **70** (5), 517 (1970)

[106] Strack, E. H.: Metabolism of the Drug Substance Denaverine, Screening of Urine Samples Using HPLC. Apogepha Arzneimittel GmbH, unveröffentlichte Daten

[107] Pawar, D. M.; Khabil, A. A.; Hooks, D. R.; Collins, K.; Elliot, T.; Stafford, J.; Smith, L.; Noe, E. A.: J. Am. Chem. Soc., **120** (9), 2108 (1998)

[108] Shingaki, T.; Miura, K.; Higuchi, T.; Hirobe, M.; Nagano, T.: Chem. Commun., 861 (1997)

[109] Carrier, M. N.; Battioni, P.; Mansuy, D.: Bull. Soc. Chim. Fr., **130**, 405 (1993)

[110] Editor D. R. Hawkins: Biotransformations, A survey of the biotransformations of drugs and chemicals in animals. Published by the RSC, West Sussex, 1995

[111] Stearns, R. A.; Chakravarty, P. K.; Chen, R.; Chiu, S.-H. L.: Drug Metab. Disp., **23** (2), 207 (1995)

[112] Göber, B.; Lisowski, H.; Friese, D.; Franke, P.: Pharmazie, **43**, 493 (1988)

[113] Staab, A.: Pharmacokinetic and Bioavailability Investigations of the Neurotropic-Musculotropic Spasmolytic Agent Denaverine. Shaker Verlag, Aachen, 1998

[114] Strack, E. H.: Metabolismus von Denaverin. Shaker Verlag, Aachen, 1999

[115] Edelson, J.; Schlosser, A.; Douglas, J. F.: Arch. Int. Pharmacodyn., **187**, 139 (1970)

[116] Chen, C.-H.; Abdel-Monem, M. M.; Krick, T. P.: J. Pharm. Sci., **66** (7), 931 (1977)

[117] Wittke, K.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1993

[118] Van Cantfort, J.; De Graere, J.; Puozzo, C.: Xenobiotica, **19** (1), 11 (1989)

[119] Lisowski, H.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1988

[120] Králová, K.; Mittelhauserová, Č.: Pharmazie, **44**, 623 (1989)

[121] Seiffert, S.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1983

[122] Leibfritz, D.; Haupt, E.; Feigel, M.; Hull, W. E.; Weber, W.-D.: Liebigs Ann. Chem., 1971 (1982)

[123] Pearson, A. J.; Han, G. R.: J. Org. Chem., **50**, 2792 (1985)

[124] Cambie, R. C.; Manning, T. D. R.: J. Chem. Soc. (C), 2603 (1968)

[125] Breuer, H.; Knuppen, R.; Haupt, M.: Nature, **212**, 76 (1966)

[126] Breslow, R.; Huang, Y.; Zhang, X.; Yang, J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 11156 (1997)

[127] Breslow, R.; Gabriele, B.; Yang, J.: Tetrahedron Letters, **39**, 2887 (1998)

[128] Chauhan, S. M. S.; Sharma, T. K.: Indian J. Chem., **35B**, 779 (1996)

[129] Wertz, D. L.; Sisemore, M. F.; Selke, M.; Driscoll, J.; Valentine, J. S.: J. Am. Chem. Soc., **120**, 5331 (1998)

[130] Harden, G. J.; Coombs, M. M.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1; 3037 (1995)

[131] Lupon, P.; Gomez, J.; Bonet, J.-J.: Angew. Chem. Suppl., 1025 (1983)

[132] Adam, W.; Lupon, P.: Chem. Ber., **121**, 21 (1988)

[133] Pietzyk, B.: Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, (1998)

[134] Kaye, I. A.; Klein, H. C.; Burlant, W. J.: J. Am. Chem. Soc., **75**, 745 (1953)

[135] Organikum. 18. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1990

[136] Auterhoff, H.; Kovar, K.-A.: Identifizierung von Arzneistoffen. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1985

[137] Arzneibuch der Deutschen Demokratischen Republik 1987. Akademie Verlag, Berlin, 1987

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Dresden, im September 2000