

Gutachter

1. Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. Oelschläger, Jena
2. Prof. Dr. J. Lehmann, Jena
3. Prof. Dr. Dr. Drs. h.c. E. Mutschler, Frankfurt/M.

Tag der Doktorprüfung: 19.01.06

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.02.06

**Synthese, Racemattrennung und pharmakologische
Prüfung neuer chiraler Fomocainderivate**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Johannes Wange

geboren am 03. Januar 1975

in Jena

„Das Leben, wie es sich uns darstellt, ist von der Asymmetrie des Universums und den sich daraus ergebenden Konsequenzen bestimmt.“

„Die künstlichen Körper haben keine molekulare Asymmetrie, und ich wüßte keinen tiefer gehenden Unterschied zwischen den Körpern, die unter dem Einfluß des Lebens entstanden, und den anderen, als gerade diesen.“

LOUIS PASTEUR (1822 – 1895)

Für Tanja

Danksagungen

Die praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Januar 2001 bis August 2005 am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der FSU Jena und am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena durchgeführt.

Tief empfundenen Dank schulde ich

meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Herbert Oelschläger** für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas und die vielfältige Unterstützung, die er mir bei der nicht immer einfachen Bearbeitung gewährt hat,

der Arbeitsgruppe um Herrn **Prof. Dr. med. Christian Fleck** für die Durchführung der pharmakologisch-toxikologischen Untersuchungen, wobei ich besonders Frau **PD Dr. med. Amelie Lupp** für die Betreuung der *in-vitro*-Experimente und die Hilfe bei der Auswertung der Daten und Frau **Annegret Berthold** für die Durchführung der Tierversuche dankbar bin,

den Herren **Dr. phil. nat. Andreas Seeling**, **Apotheker Thomas Dahse** und **Dipl.-Biol. Jan Birkenbeil** für die kritische inhaltliche und formelle Durchsicht des Manuskriptes und die damit verbundenen Anregungen,

Herrn **Dr. rer. nat. Wolfgang Günther** für die Aufnahme der NMR-Spektren und die Hilfestellung bei deren Auswertung,

meinen **Kollegen** am Lehrstuhl und den **studentischen Hilfskräften**, deren Kollegialität und Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit erheblich gefördert hat und

nicht zuletzt meiner Familie in Gestalt meiner Eltern **Hermine** und **Dr. rer. nat. Peter Wange**, meines Bruders **Christian** und meiner Lebensgefährtin **Tanja Hüniger** sowie meinen **Freunden** für ihre immerwährende Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen	IX
1.	Einleitung	1
1.1.	Entwicklung der modernen Lokalanästhetika	1
1.2.	Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika	4
1.3.	Chirale Arzneistoffe unter besonderer Berücksichtigung der Lokalanästhetika	7
1.4.	Möglichkeiten zur Gewinnung reiner Enantiomere	12
2.	Problemstellung	13
3.	Ergebnisse und Diskussion	14
3.1.	Synthese und Analytik der chiralen Fomocainderivate.....	14
3.1.1.	Syntheseplanung und -durchführung	14
3.1.2.	Strukturbeweise durch spektroskopische Untersuchungen und Reinheitsprüfungen der chiralen Fomocainderivate und Morpholine	21
3.1.2.1.	Massenspektrometrie	21
3.1.2.2.	NMR-Spektroskopie	23
3.1.2.3.	UV-Spektroskopie	32
3.1.2.4.	Chromatographische Reinheitsuntersuchungen und Elementaranalysen	33
3.1.3.	Bestimmung der physikochemischen Parameter der Verbindungen	33
3.2.	Racemattrennung der O/W-Verbindungen und der chiralen Morpholine	36
3.2.1.	Analytische Racemattrennung durch HPLC	36
3.2.1.1.	Chirale stationäre Phasen für die HPLC	36
3.2.1.2.	Analytische Racemattrennung durch HPLC an drei verschiedenen CSP	39
3.2.2.	Präparative Racemattrennung durch Bildung diastereomerer Salze	47
3.2.2.1.	Auswahl des Kristallisationsverfahrens	47
3.2.2.2.	Vorversuche im analytischen Maßstab	51
3.2.2.3.	Präparative Racemattrennung von 2-Ethyl- und 3-Propylmorpholin	52
3.2.3.	Präparative Racemattrennung durch HPLC an einer Chiralcel® OD-Säule	54
3.3.	Biopharmazeutische und pharmakologische Untersuchungen	57
3.3.1.	Reaktionen der chiralen Fomocainderivate mit dem CYP-Enzymsystem	57
3.3.1.1.	Abbau von <i>rac</i> -O/W3 und <i>rac</i> -O/W13 durch Rinderleberhomogenate	57

3.3.1.2.	Interaktionen der chiralen Fomocainderivate mit CYP-Isoenzymen aus Rattenlebermikrosomen <i>in vitro</i>	59
3.3.2.	Untersuchungen zur Lokalanästhesie und Toxizität der chiralen Fomocainderivate an Ratten	66
3.3.2.1.	Pharmakologie und Toxikologie der Racemate der chiralen Fomocainderivate ...	66
3.3.2.2.	Pharmakologie und Toxikologie der Enantiomere von O/W3 und O/W13	71
3.4.	Zusammenfassung	73
4.	Experimenteller Teil	80
4.1.	Synthesen	80
4.1.1.	Synthese von 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen	80
4.1.1.1.	1-(Chlormethyl)-4-(3-chlorpropyl)benzen (1)	80
4.1.1.2.	1-(3-Chlorpropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen (2)	80
4.1.1.3.	1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen (3)	81
4.1.2.	Synthese von <i>rac</i> -O/W1 und <i>rac</i> -O/W2	82
4.1.2.1.	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)propan-2-ol (4)	82
4.1.2.2.	<i>rac</i> -2-Methylmorpholin (5)	82
4.1.2.3.	<i>rac</i> -2-Methyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W1), (6) ..	83
4.1.2.4.	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-2-ol (O/W2), (7)	84
4.1.3.	Synthese von <i>rac</i> -O/W3 und <i>rac</i> -O/W4	85
4.1.3.1.	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)butan-2-ol (8)	85
4.1.3.2.	<i>rac</i> -2-Ethylmorpholin (9)	85
4.1.3.3.	<i>rac</i> -2-Ethyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W3), (10) ..	86
4.1.3.4.	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-2-ol (O/W4), (11)	87
4.1.4.	Synthese von <i>rac</i> -O/W5 und <i>rac</i> -O/W6	88
4.1.4.1.	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)pentan-2-ol (12)	88
4.1.4.2.	<i>rac</i> -2-Propylmorpholin (13)	88
4.1.4.3.	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-2-propylmorpholin (O/W5), (14) ..	88
4.1.4.4.	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-pentan-2-ol (O/W6), (15)	89
4.1.5.	Synthese von <i>rac</i> -O/W7 und <i>rac</i> -O/W8	90
4.1.5.1.	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)hexan-2-ol (16)	90
4.1.5.2.	<i>rac</i> -2-Butylmorpholin (17)	91
4.1.5.3.	<i>rac</i> -2-Butyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W7), (18) ..	91
4.1.5.4.	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-hexan-2-ol (O/W8), (17)	92

4.1.6.	Synthese von <i>rac</i> -O/W9 und <i>rac</i> -O/W10	93
4.1.6.1.	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)propan-1-ol (20)	93
4.1.6.2.	<i>rac</i> -3-Methylmorpholin (21)	94
4.1.6.3.	<i>rac</i> -3-Methyl-4-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W9), (22)	94
4.1.6.4.	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-1-ol (O/W10), (23)	95
4.1.7.	Synthese von <i>rac</i> -O/W11 und <i>rac</i> -O/W12.....	96
4.1.7.1.	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)butan-1-ol (24)	96
4.1.7.2.	<i>rac</i> -3-Ethylmorpholin (25)	96
4.1.7.3.	<i>rac</i> -3-Ethyl-4-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W11), (26)	96
4.1.7.4.	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-1-ol (O/W12), (27)	98
4.1.8.	Synthese von <i>rac</i> -O/W13 und <i>rac</i> -O/W14	99
4.1.8.1.	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)pentan-1-ol (28)	99
4.1.8.2.	<i>rac</i> -3-Propylmorpholin (29)	99
4.1.8.3.	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxyethyl)phenyl]propyl}-3-propylmorpholin (O/W13), (30)	99
4.1.8.4.	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-pentan-1-ol (O/W14), (31)	100
4.1.9.	Synthese von <i>rac</i> -O/W15 und <i>rac</i> -O/W16	101
4.1.9.1.	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)-3-methylbutan-1-ol (32)	101
4.1.9.2.	<i>rac</i> -3-Isopropylmorpholin (33)	101
4.1.9.3.	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxyethyl)phenyl]propyl}-3-isopropylmorpholin (O/W15), (34)	102
4.1.9.4.	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-3-methyl-butan-1-ol (O/W16), (35)	103
4.1.10.	Synthese von 2S,3S- und 2R,3R-Dianisoylweinsäure (T3)	104
4.1.10.1.	2S,3S-2,3-Dianisoylweinsäure (2S,3S-T3), (36)	104
4.1.10.2.	2R,3R-2,3-Dianisoylweinsäure (2R,3R-T3), (37)	104
4.1.11.	<i>rac</i> -4-Benzoylmorpholine zur HPLC-Analytik	105
4.1.11.1.	Vorsäulenderivatisierung der <i>rac</i> -C-Alkylmorpholine, allgemeines Verfahren	105
4.1.11.2.	Benzamide der <i>rac</i> -C-Alkylmorpholine zur HPLC-Analytik	105
4.1.12.	Synthese von <i>nrac</i> -(-)-O/W3 und <i>nrac</i> -(+)-O/W3	105
4.1.12.1.	<i>nrac</i> -(-)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin, (-)-O/W3 (86% <i>ee</i>), (46)	105
4.1.12.2.	<i>nrac</i> -(+)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin, (+)-O/W3 (75% <i>ee</i>), (47)	106
4.1.13.	Synthese von <i>nrac</i> -(-)-O/W13 und <i>nrac</i> -(+)-O/W13	106
4.1.13.1.	<i>nrac</i> -(-)-4-[3-(4-Phenoxyethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin, (-)-O/W13 (83% <i>ee</i>), (48)	106

4.1.13.2.	<i>nrac</i> -(+)-4-[3-(4-Phenoxymethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin, (+)-O/W13 (79,5% <i>ee</i>), (49)	106
4.2.	Racemattrennungen durch Bildung diastereomerer Salze	107
4.2.1.	Kristallisationen im analytischen Maßstab	107
4.2.2.	Kristallisationen im präparativen Maßstab	107
4.2.2.1.	Präparative Racemattrennung von <i>rac</i> -2-Ethylmorpholin	107
4.2.2.2.	Präparative Racemattrennung von <i>rac</i> -3-Propylmorpholin	108
4.3.	HPLC-Untersuchungen	109
4.3.1.	Analytische HPLC an drei verschiedenen CSP	109
4.3.2.	Präparative HPLC an der Chiralcel [®] OD-Phase	111
4.3.2.1.	Gewinnung von (-)-O/W3	112
4.3.2.2.	Gewinnung von (+)-O/W3	113
4.3.2.3.	Gewinnung von (-)-O/W13	114
4.3.2.4.	Gewinnung von (+)-O/W13	116
4.4.	Bestimmung der physikochemischen Parameter der O/W-Substanzen	117
4.4.1.	Bestimmung der pK _s -Werte	117
4.4.2.	Bestimmung der Trübungs-pH-Werte	117
4.4.3.	Berechnung der Wasserlöslichkeit der Basen	118
4.4.4.	Bestimmung von lgP und lgD	118
4.5.	Weitere analytische Methoden	119
4.6.	Biopharmazeutische und pharmakologische Untersuchungen	121
4.6.1.	Bestimmung der Plasmaeiweißbindung von O/W3 und O/W13	121
4.6.2.	Abbau von O/W3 und O/W13 durch Rinderleberhomogenate	122
4.6.3.	Interaktionen mit CYP-Isoenzymen <i>in vitro</i>	123
4.6.4.	Tierversuche	124
5.	Anhang	A1
5.1.	Abkürzungsverzeichnis	A1
5.2.	Abbildungsverzeichnis	A2
5.3.	Tabellenverzeichnis	A4
5.4.	Literaturverzeichnis.....	A6
	Lebenslauf	A11
	Ehrenwörtliche Erklärung	A12

Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen

<u>Nr.</u>	<u>Name</u>	<u>Code</u>
<u>1</u>	1-(Chlormethyl)-4-(3-chlorpropyl)benzen	
<u>2</u>	1-(3-Chlorpropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen	
<u>3</u>	1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen	
<u>4</u>	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)propan-2-ol	
<u>5</u>	<i>rac</i> -2-Methylmorpholin	
<u>6</u>	<i>rac</i> -2-Methyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin	O/W1
<u>7</u>	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-2-ol	O/W2
<u>8</u>	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)butan-2-ol	
<u>9</u>	<i>rac</i> -2-Ethylmorpholin	
<u>10</u>	<i>rac</i> -2-Ethyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin	O/W3
<u>11</u>	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-2-ol	O/W4
<u>12</u>	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)pentan-2-ol	
<u>13</u>	<i>rac</i> -2-Propylmorpholin	
<u>14</u>	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-2-propylmorpholin	O/W5
<u>15</u>	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-pentan-2-ol	O/W6
<u>16</u>	<i>rac</i> -1-(2-Hydroxyethylamino)hexan-2-ol	
<u>17</u>	<i>rac</i> -2-Butylmorpholin	
<u>18</u>	<i>rac</i> -2-Butyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin	O/W7
<u>19</u>	<i>rac</i> -1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-hexan-2-ol	O/W8
<u>20</u>	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)propan-1-ol	
<u>21</u>	<i>rac</i> -3-Methylmorpholin	
<u>22</u>	<i>rac</i> -3-Methyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin	O/W9
<u>23</u>	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-1-ol	O/W10
<u>24</u>	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)butan-1-ol	
<u>25</u>	<i>rac</i> -3-Ethylmorpholin	
<u>26</u>	<i>rac</i> -3-Ethyl-4-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin	O/W11
<u>27</u>	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-1-ol	O/W12
<u>28</u>	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)pentan-1-ol	
<u>29</u>	<i>rac</i> -3-Propylmorpholin	
<u>30</u>	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-3-propylmorpholin	O/W13

<u>31</u>	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-pentan-1-ol	O/W14
<u>32</u>	<i>rac</i> -2-(2-Hydroxyethylamino)-3-methylbutan-1-ol	
<u>33</u>	<i>rac</i> -3-Isopropylmorpholin	
<u>34</u>	<i>rac</i> -4-{3-[4-(Phenoxyethyl)phenyl]propyl}-3-isopropylmorpholin	O/W15
<u>35</u>	<i>rac</i> -2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-3-methylbutan-1-ol	O/W16
<u>36</u>	2S,3S-2,3-Dianisoylweinsäure	2S,3S-T3
<u>37</u>	2R,3R-2,3-Dianisoylweinsäure	2R,3R-T3
<u>38</u>	4-Benzoyl-2-methylmorpholin	NBM1
<u>39</u>	4-Benzoyl-2-ethylmorpholin	NBM2
<u>40</u>	4-Benzoyl-2-propylmorpholin	NBM3
<u>41</u>	4-Benzoyl-2-butylmorpholin	NBM4
<u>42</u>	4-Benzoyl-3-methylmorpholin	NBM5
<u>43</u>	4-Benzoyl-3-ethylmorpholin	NBM6
<u>44</u>	4-Benzoyl-3-propylmorpholin	NBM7
<u>45</u>	4-Benzoyl-3-isopropylmorpholin	NBM8
<u>46</u>	<i>nrac</i> -(-)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin	(-)-O/W3 (86% ee)
<u>47</u>	<i>nrac</i> -(+)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin	(+)-O/W3 (75% ee)
<u>48</u>	<i>nrac</i> -(-)-4-[3-(4-Phenoxyethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin	(-)-O/W13 (83% ee)
<u>49</u>	<i>nrac</i> -(+)-4-[3-(4-Phenoxyethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin	(+)-O/W13 (79,5% ee)

1. Einleitung**1.1. Entwicklung der modernen Lokalanästhetika**

Die Entwicklung der modernen Lokalanästhetika (LA) ist in ihren Anfängen eng mit der Erforschung der Alkaloide aus *Erythroxylum spec.* - besonders des Kokain - verzahnt. Einige Autoren [1] bezeichnen die Entdeckung, dass das Kauen von Kokablättern in der Mundhöhle Taubheit auslöst, als Ursprung der Regionalanästhesie, auch wenn man davon ausgehen kann, dass der Antrieb der Andenbewohner zum Kokakauen ein anderer war. Erste Kultivierungen von *Erythroxylum coca*, der Art mit dem höchsten Kokaingehalt, im Gebiet des heutigen Bolivien und der Andenregion lassen sich auf etwa 700 v.u.Z. datieren [2]. Befunde aus Ecuador deuten auf eine etwa 5000jährige Nutzung der Pflanze hin [3]. Nach Bühler [4] war es der Stamm der Arhuaco aus der Negroregion, der sein Wissen über die Pflanze mit seinen Nachbarvölkern teilte. Mit den spanischen Eroberern gelangte dieses Wissen im 16. Jahrhundert auch nach Europa. Der Bischof von Cuzco, Vicente de Valverde - ein Begleiter Pizarros - berichtete im Jahre 1539 Kaiser Karl V. erstmals von der Kokapflanze und deren Verwendung durch die Inka. Die spanischen Chronisten des 16. Jahrhunderts erwähnten in ihren Berichten die Nutzung der Kokablätter durch die Ureinwohner zur Unterdrückung von Hunger und Durst und zur Leistungssteigerung. Dabei kauten die Indios die Blätter mit gemahlener Muscheln oder Kalk vermengt, wie wir heute wissen ein galenischer Kunstgriff zur Verbesserung der Resorption der Kokainbase infolge ihrer Liberation aus dem Salz. Von dem Jesuiten Bernabe Cobo ist die erste Beschreibung des lokalanästhetischen Effekts der Kokablätter und deren Einsatz zum Stillen von Zahnschmerzen aus dem Jahre 1653 überliefert. Warnungen vor dem Suchtpotential der Kokanutzung von Francisco Falcon (1582) und der Bericht des deutschen Arztes Eduard Friedrich Pöpping (1836) über die Auswirkungen der Kokaabhängigkeit verhallten weitgehend ungehört [5].

Die Suche nach dem wirksamen Prinzip der Kokablätter erlebte einen Aufschwung, als der Österreicher Carl von Scherzer 1858 von einer Südamerikaexpedition eine größere Menge der Droge nach Göttingen zu Albert Niemann brachte, der daraus 1860 das Kokain isolierte. Er beschrieb auch das durch die Base ausgelöste Taubheitsgefühl auf der Zunge [6]. Nach Niemanns Tod 1861 gelang es dessen Schüler Wilhelm Lossen 1865, die korrekte Summenformel des Alkaloids zu bestimmen [7]. Bis zur Bestimmung der Strukturformel des Kokain durch den deutschen Chemiker Richard Willstätter [8] vergingen noch weitere 32 Jahre. Willstätter war es auch, der 1923 Kokain erstmals vollsynthetisch darstellte [9].

Nachdem Kokain in isolierter Form der Wissenschaft zur Verfügung stand, beschleunigte sich die Forschung auf diesem Gebiet. Der Peruaner Jose Hipólito Unanue hatte bereits 1794 den medizinischen Einsatz von Kokablättern empfohlen [5]. Der peruanische Schiffsarzt Thomas Moreno y Maïs berichtete in seiner Dissertation (Paris 1886) über eine Unterdrückung des Schmerzempfindens bei Meerschweinchen, Ratten und Fröschen nach der Injektion von Kokainlösungen [10]. Der russische Arzt Wassili von Anrep publizierte 1880 die Ergebnisse seiner Versuche an Tieren und sich selbst und schloß mit der Empfehlung, Kokain als Anästhetikum bei chirurgischen Eingriffen zu verwenden [11]. Der Begründer der modernen Psychoanalyse, Sigmund Freud, hatte die Vorstellung, den Morphinismus eines Freundes mit Kokain behandeln zu wollen und empfahl 1884 dem Wiener Augenarzt Karl Koller die Erforschung der Wirkungsweise des Alkaloids [5]. Koller war es dann, der nach Tierexperimenten am 11. September 1884 die erste belegte Operation (eines Katarakts) unter Kokainanästhesie durchführte [12]. Am 6. Dezember des selben Jahres wurde der erste Bericht über den Einsatz von Kokain in der Zahnheilkunde von Richard John Hall publiziert [13]. Allein in Nordamerika wurden im darauf folgenden Jahr 60 Aufsätze über den Einsatz des Alkaloids veröffentlicht. Bedingt durch die damals üblichen hohen Kokainkonzentrationen von 10 - 30 % (m/V) [14, 15], die bei Operationen eingesetzt wurden, kam es im Zeitraum von 1884 - 1891 zu 200 dokumentierten Fällen von systemischen Kokainintoxikationen mit 13 Toten [16]. Andere Quellen [1] sprechen sogar von 30 Todesfällen. Ludwig Pernice und Maximilian Oberst (1892), Carl Ludwig Schleich (1892) [17] und Paul Reclus (1895) [18] konnten zeigen, dass auch geringere Kokainkonzentrationen von 2 % und weniger ohne Nebenwirkungen bei verzögertem Wirkungseintritt ausreichend lokalanästhetisch wirksam sind. Etwa zeitgleich arbeitete Halsted mit geringen Kokainkonzentrationen unter Kompression, um die systemische Resorption niedrig zu halten [19, 20, 21]. Die damals gültige Maximaldosis zur Infiltrationsanästhesie lag bei 50 mg Kokain [22].

Einige Anwender des neuen Wirkstoffes „entdeckten“ aber auch seine euphorisierende und berauschende Wirkung wieder und fielen der Abhängigkeit zum Opfer (Halsted, Freud) [5].

Dem deutschen Chemiker Alfred Einhorn gelang 1904 die Synthese eines neuen Wirkstoffes, der bei guter Lokalanästhesie nicht die gravierenden Nebenwirkungen des Kokain aufwies [23]. Da aber der 4-Aminobenzoessäure-2-(diethylamino)ethyl-ester Novocain (später Procain) keine vasokonstriktorische Wirkqualität wie das Kokain mehr aufwies, musste den Injektionslösungen Adrenalin zugesetzt werden, um eine systemische Resorption zu vermeiden. Die Arbeiten zur Dosisfindung beim Einsatz von Procain und Adrenalin gehen auf H. Braun [24] zurück. Vermehrte Berichte über auftretende Allergien gegen den Wirkstoff [25, 26] zwangen

die Forschung zu Weiterentwicklungen. Nils Löfgren synthetisierte 1943 das Xylididamid Lidocain [27], das sich weltweit als sicheres LA durchsetzen sollte [1]. Außerdem ist es als Antiarrhythmikum bei parenteraler Gabe unverzichtbar.

Noch wichtiger als diese Entdeckung, war die Formulierung des Löfgrenschemas, das die Strukturelemente eines wirksamen LA definierte und nach dem die Mehrzahl der heute bekannten modernen LA aufgebaut ist (Abb. 1).

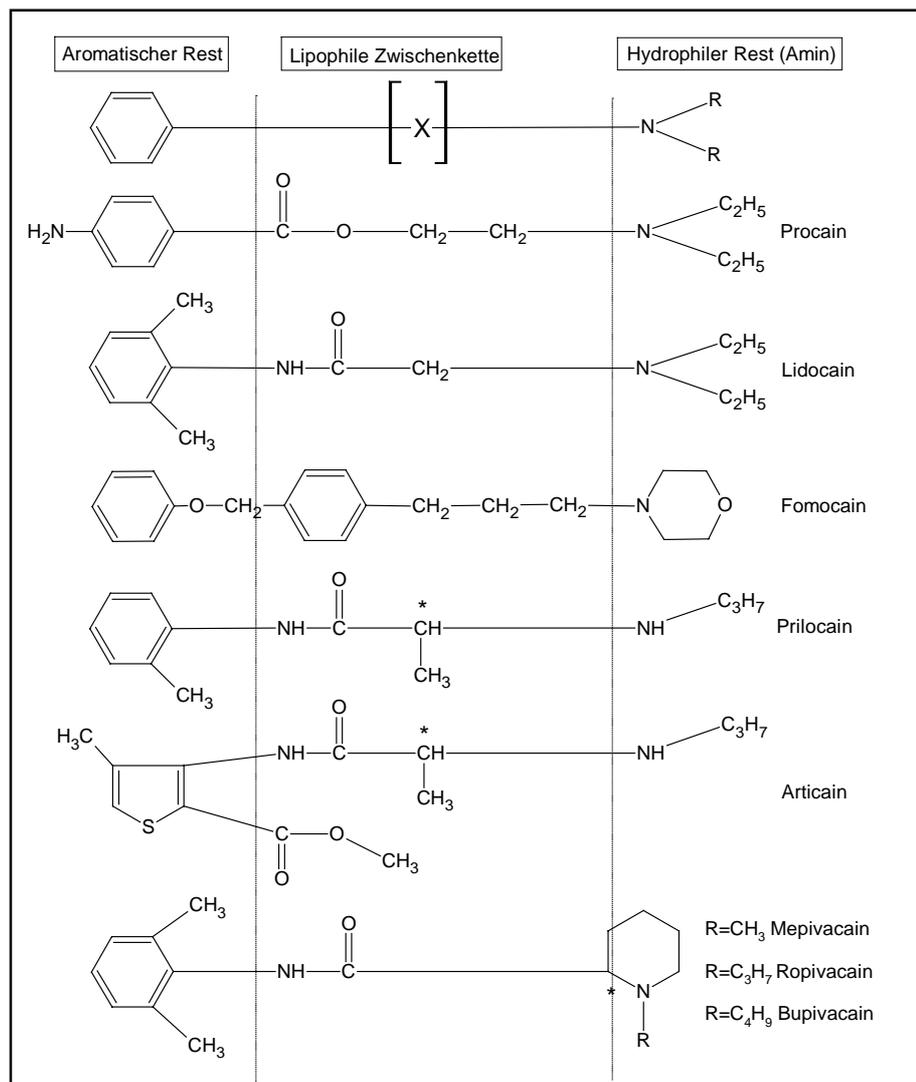


Abb. 1: Auswahl von Ester-, Amid- und Etherlokanalästhetika, die dem Löfgrenschemata entsprechen

Im Laufe der Jahrzehnte kamen weitere Amid- und Anilidlokanalästhetika (Mepivacain und das Langzeit-LA Bupivacain 1957, Prilocain 1969, Articain und Etidocain 1972, Ropivacain 1996) mit an die gewünschten Einsatzgebiete angepassten physikochemischen Eigenschaften auf den Markt [5].

Neben der Entwicklung der LA vom Amidtyp fand der basisch substituierte Aryl(alkylbenzyl)ether Fomocain [28] Eingang in die Therapie und wurde 1979 im Deutschen Arzneimittel-Codex monographiert. Die Firma Hermalchemie in Hamburg brachte Fomocain in mehreren Zubereitungen als Dermatikum (Erbocain[®]) 1967 als erste in den Handel.

Benzocain und Polidocanol, die in ihrem Aufbau nicht dem Löfgrenschemata entsprechen, werden heute noch als Oberflächenanästhetika eingesetzt. Seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts ist es in der Entwicklung von neuen Lokalanästhetika eher still geworden. Die Forschungen beschränkten sich in erster Linie auf die Aufklärung des Wirkungsmechanismus, der Untersuchung des Einflusses der Chiralität auf Wirkung und Toxizität und die Optimierung des klinischen Einsatzes der Wirkstoffe [5]. Inzwischen ist nach Aufklärung der Struktur des Na⁺-Kanals gesichert, dass ein aromatischer Baustein in den LA für die Wirkung von essentieller Bedeutung ist [29].

1.2. Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika

LA unterbinden durch Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle den schnellen Na⁺-Einstrom ins Zellinnere eines Neurons und unterbrechen somit die Reizleitung. Diese Tatsache und die strukturellen Ähnlichkeiten der meisten LA ließen Büchi [30] bereits 1963 vermuten, dass es am Na⁺-Kanal einen spezifischen Rezeptor oder zumindest ein Bindungsareal für LA gibt.

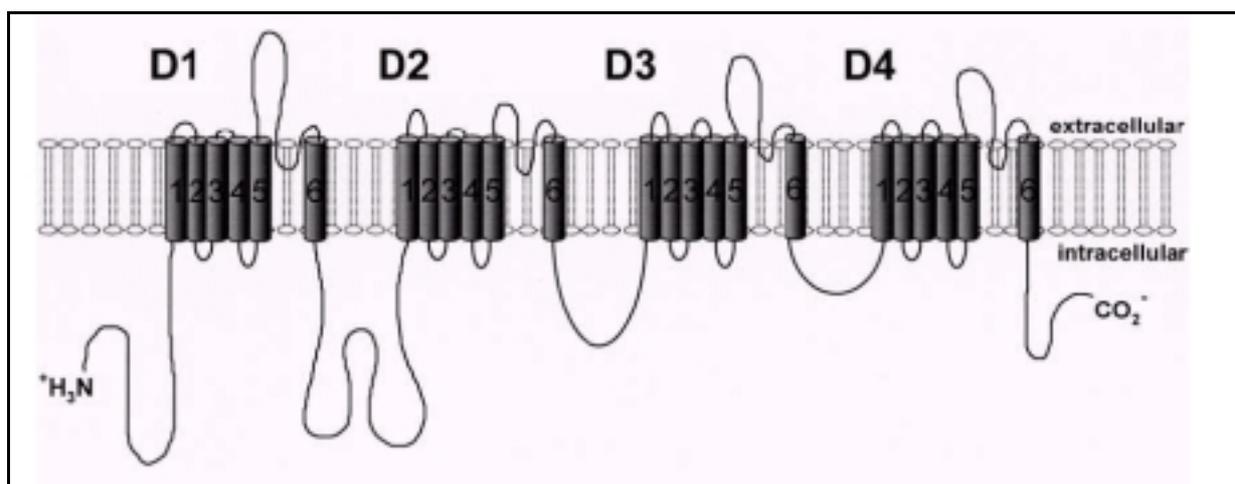


Abb. 2: Schematische Topologie der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Na⁺-Kanals mit den 4 homologen Domänen D1 bis D4 und den als Zylindern dargestellten transmembranären Segmenten S1 bis S6 (aus [34])

Generell sind Na⁺-Kanäle als heterotrimere Proteine mit einer großen α - (Molekulargewicht ca. 260 kDa, etwa 1950 Aminosäuren) [31] und den zwei kleineren β_1 - und β_2 -Untereinheiten aufgebaut. Bis zum Jahr 2003 wurden neun verschiedene α -Isoformen und 4 β -Subtypen charakterisiert [32, 33]. Die α -Untereinheit formt mit ihren vier homologen Domänen D1 - D4, die ihrerseits sechs transmembranäre Segmente S1 - S6 bilden, die Ionenpore (Abb. 2), während die assoziierten β -Untereinheiten die Kanalkinetik und Spannungsabhängigkeit des Kanals modifizieren [34].

Die die Segmente S5 und S6 verbindende Schleife jeder Domäne mit der als gemeinsames Strukturmerkmal enthaltenen Aminosäuresequenz DEKA zeichnet für die Na⁺-Selektivität der Pore verantwortlich [31]. Die lysin- und argininreichen S4-Segmente haben die Funktion von Spannungssensoren zur Regulierung der Kanalaktivität. Ihre Auswärtsbewegung nach Depolarisation bewirkt im Kanalprotein eine Konformationsänderung und damit eine Öffnung des Kanals. Durch die intrazelluläre Verbindung der Domänen D3 und D4 wird über den Abschnitt mit der Aminosäuresequenz IFM die schnelle Inaktivierung des Kanals reguliert („IFM-Partikel“) [34].

Für den spannungsabhängigen Na⁺-Kanal können drei Aktivitätszustände definiert werden. Bei einem Membranpotential von -70 mV ist die Pore geschlossen, der Kanal also im Ruhezustand. Depolarisation der Membran über den Schwellenwert von -40 mV führt zu einer Öffnung und damit zum Na⁺-Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten in das Zellinnere. Nach der Depolarisation geht der Kanal in einen offenen inaktivierten Zustand über, wobei zwischen schneller und langsamer Inaktivierung unterschieden wird. Bei der schnellen Inaktivierung legt sich das „IFM-Partikel“ wie ein Deckel auf die innere Seite der Kanalpore [31]. Für LA wurden erhöhte Affinitäten zum Kanalprotein im offenen und inaktivierten Zustand als zur Pore im Ruhezustand gefunden [35], was zur Postulierung eines von der Konformation im jeweiligen Kanalzustand abhängigen hoch oder gering affinen Bindungsareals führte. Der Einfluß des Steuerungspeptids für die schnelle Inaktivierung des Kanals ist noch nicht abschließend geklärt [31, 34]. Mutation des „IFM-Partikels“ führt aber zu einem Verlust der Affinität von Lidocain zum Kanal [36], was zum Einen eine direkte Interaktion mit dem Proteinabschnitt vermuten lässt oder zum Anderen mit der veränderten Proteinkonformation durch die Mutation und damit dem Verlust des „modulierbaren Rezeptors“ erklärlich ist. Als sicher gilt jedoch, dass LA in ihrer protonierten Form vornehmlich mit den Aminosäureresten Phenylalanin 1764 und Tyrosin 1771 im Segment S6 an der Domäne D4 der α -Untereinheit durch hydrophobe, Kation- π - oder aromatische Wechselwirkungen interagieren und so den offenen inaktivierten Zustand des Na⁺-Kanals

stabilisieren (Abb. 3). Die beiden Aminosäuren liegen etwa 11 Å auseinander, während die potentesten LA eine Moleküllänge von 10 - 15 Å aufweisen [31]. Austausch der Reste gegen Alanin führt zu einem dramatischen Aktivitätsverlust. Die Bindung von LA an D1-S6 und D3-S6 scheint von geringerer Bedeutung zu sein [34].

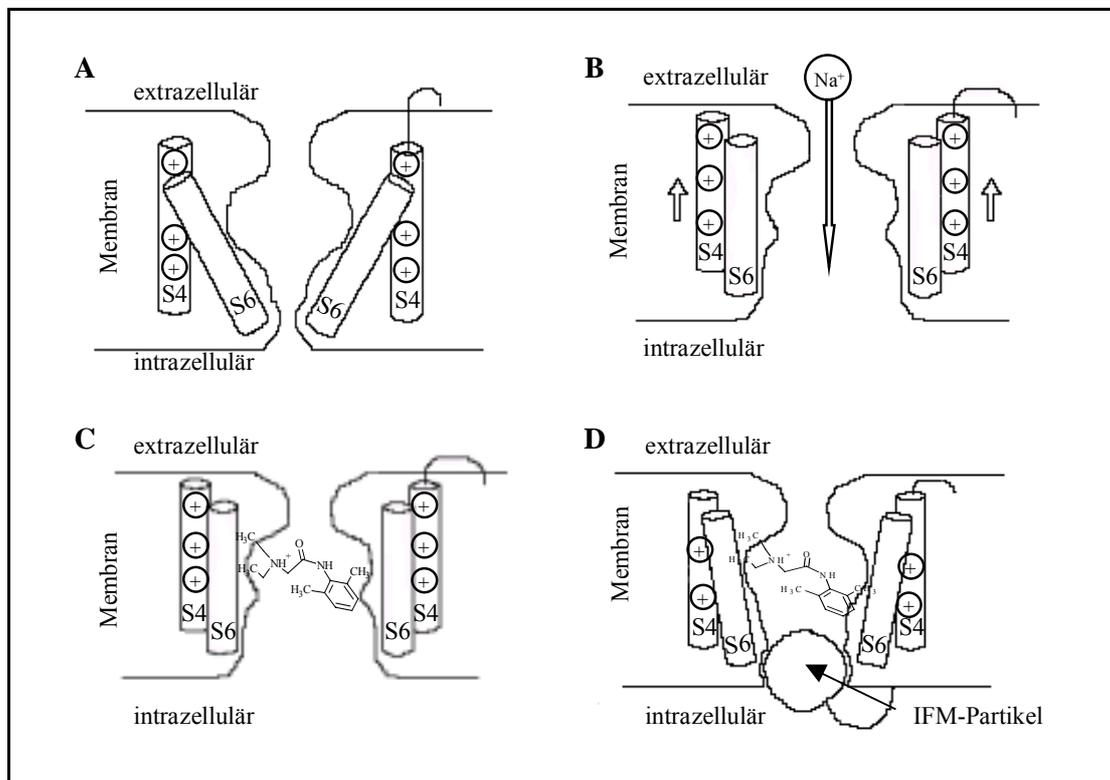


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zustände eines Na⁺-Kanals; **A:** geschlossen in Ruhe; **B:** offen aktiviert, **C:** offen mit Lidocain, **D:** offen inaktiviert mit Lidocain (nach [37])

Um die oben beschriebenen Interaktionen mit dem Bindungsareal ausüben zu können, müssen LA in ihrer protonierten Form von der zelleinwärts gerichteten Seite her das Kanalprotein angreifen. Den physikochemischen Eigenschaften wie pK_s-Wert und Verteilungskoeffizient der Wirkstoffe kommt daher beim Transport zum Wirkort eine entscheidende Bedeutung zu. Die klinisch gebräuchlichen LA sind schwache Basen mit pK_s-Werten zwischen 7,1 (Fomocain) und 8,9 (Procain) [1, 38]. Das bedeutet, dass sich unter physiologischen Bedingungen ein dem jeweiligen pK_s-Wert entsprechendes Dissoziationsgleichgewicht der nicht plasma- oder gewebe-proteingebundenen LA-Moleküle einstellt. Nur der nicht protonierte Anteil ist zur Diffusion durch den Lipidbilayer der Zellmembran befähigt. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit des Membrandurchtritts wird - schließt man aktive und erleichterte Transportvorgänge aus - wiederum vom Verteilungskoeffizienten der Verbindung beeinflusst.

Im Zellinneren stellt sich erneut ein vom pH-Wert determiniertes Protolysegleichgewicht ein. Die protonierte Form kann dann mit dem Bindungsareal interagieren. Die bekannten Wirkcharakteristika und pharmakokinetischen Parameter der gebräuchlichen LA sind demnach auch ein Resultat ihrer durch ihre Struktur bestimmten physikochemischen Eigenschaften.

Neben der Wirkung der LA auf Na⁺-Kanäle ist in höheren Konzentrationen auch eine Blockade von K⁺-Kanälen [39, 40], Ca²⁺-Kanälen [41] und Inhibition von G-Proteinen und G-Protein-regulierten Kanälen beschrieben [31]. Weiterhin wird besonders für jene LA, die in ihren Strukturen nicht dem Löffgrenschemata entsprechen (Benzocain, Polidocanol), eine unspezifische Membranexpansion als alternativer und/oder zusätzlicher Wirkmechanismus der Ionenkanalblockade diskutiert [42].

Das Bild über die Wirkung von LA ist durch die Komplexität der vermuteten Mechanismen in der Ionenkanalblockade also noch uneinheitlich. Die Vielfalt der Wirkungsqualitäten von LA, Experimente mit Stereoisomeren sowie der klinische Einsatz enantiomerenreiner LA (s. 1.3.) erhärten aber die These, dass es sich bei der biologischen Wirkung von LA eher um den Effekt spezifischer wenn auch wenig selektiver Interaktionen mit Bindungsarealen oder Rezeptoren an Zellstrukturen handelt. Die lokalanästhetische Wirksamkeit von Substanzen anderer Wirkstoffklassen, wie z.B. einiger H₁-Antihistaminika, tricyclischer Antidepressiva (TCA) und Neuroleptika, die zu den LA verwandte Teilstrukturen aufweisen, ist ein weiteres Indiz für diese Vermutung.

In diesem Zusammenhang sei beispielhaft auf experimentelle [43] und theoretische [44] Arbeiten an TCA wie Amitriptylin verwiesen, in denen auch für diese Wirkstoffklasse lokalanästhetische Wirkungen beschrieben sind bzw. anhand struktureller Merkmale vorhergesagt werden.

1.3. Chirale Arzneistoffe unter besonderer Berücksichtigung der Lokalanästhetika

Heutzutage werden von den auf dem Markt befindlichen chiralen Arzneistoffen noch ca. 25 % als Racemate angeboten [45]. Dieser Anteil ist jedoch seit Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts rückläufig, da die entsprechenden Regularien der Zulassungsbehörden wie der FDA verstärkt in Richtung des Einsatzes enantiomerenreiner Wirkstoffe hinwirken. Wurden

1991 nur 21 % der neu eingeführten chiralen Arzneistoffe enantiomerenrein angeboten, stieg der Anteil im Jahr 2000 auf 76 % [46].

2001 machten Arzneimittel mit enantiomerenreinen Wirkstoffen mit einem Umsatz von 147 Mrd. US-Dollar 36 % des weltweiten Marktes aus. Die Wachstumsraten im Umsatz mit enantiomerenreinen Arzneistoffen betragen um die Jahrtausendwende über 13 % jährlich, während der Markt achiraler Wirkstoffe in diesem Zeitraum nur um 7 - 8 % wuchs [46]. Schätzungen aus dem Jahr 2001 [47] gehen für das Jahr 2008 von einem Umsatz von über 200 Mrd. US-Dollar mit reinen Enantiomeren aus. Im Zeitraum von 1999 - 2003 wurden in Deutschland 40 achirale und 60 chirale (ohne Peptide) Wirkstoffe zugelassen. Von den 23 chiralen Wirkstoffen mit nur einem Stereozentrum wurden 15 als reine Enantiomere eingeführt [48]. Abb. 4 gibt einen Überblick über die Neuzulassungen chiraler Arzneistoffe der letzten zwölf Jahre.

Die Gründe für diese Entwicklung und den sogenannten „chiral shift“ bei bereits als Racematen vermarkteten Wirkstoffen liegen vor allem in einer Verbesserung der Arzneimittelsicherheit.

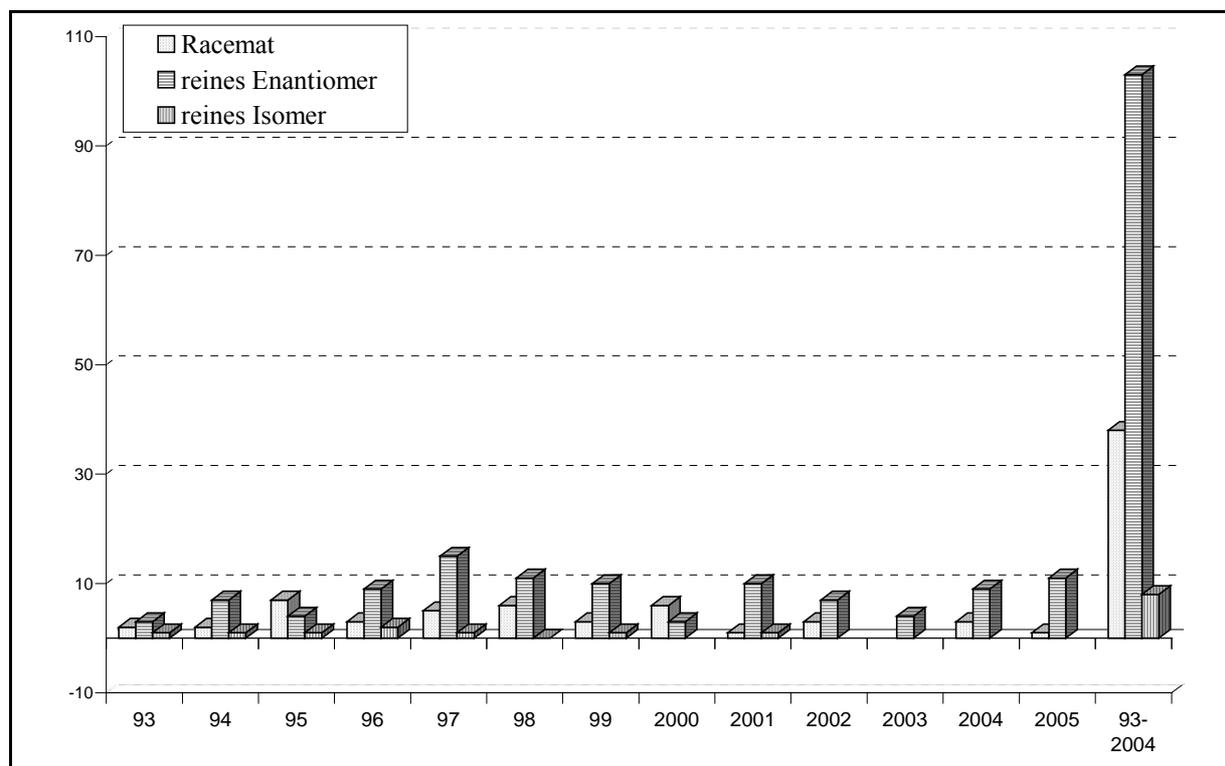


Abb. 4: Marktneueinführungen von chiralen Arzneistoffen der Jahre 1993 - 2005 in Deutschland (kumuliert aus den DAZ-Beilagen „Neue Arzneimittel“ bis 10/2005)

Ein Arzneimittel, das als Wirkstoff ein Racemat enthält, besteht zu 50 % aus „Müll“. Diese sinngemäß wiedergegebene, recht plakative Aussage von Ariens [49] weist eindringlich auf die Problematik der Interaktionen chiraler Xenobiotika mit den chiralen Strukturen des Organismus hin. Abb. 5 zeigt in einer differenzierteren Betrachtung die Komplexität der möglichen Wirkungsunterschiede zwischen Stereoisomeren auf.

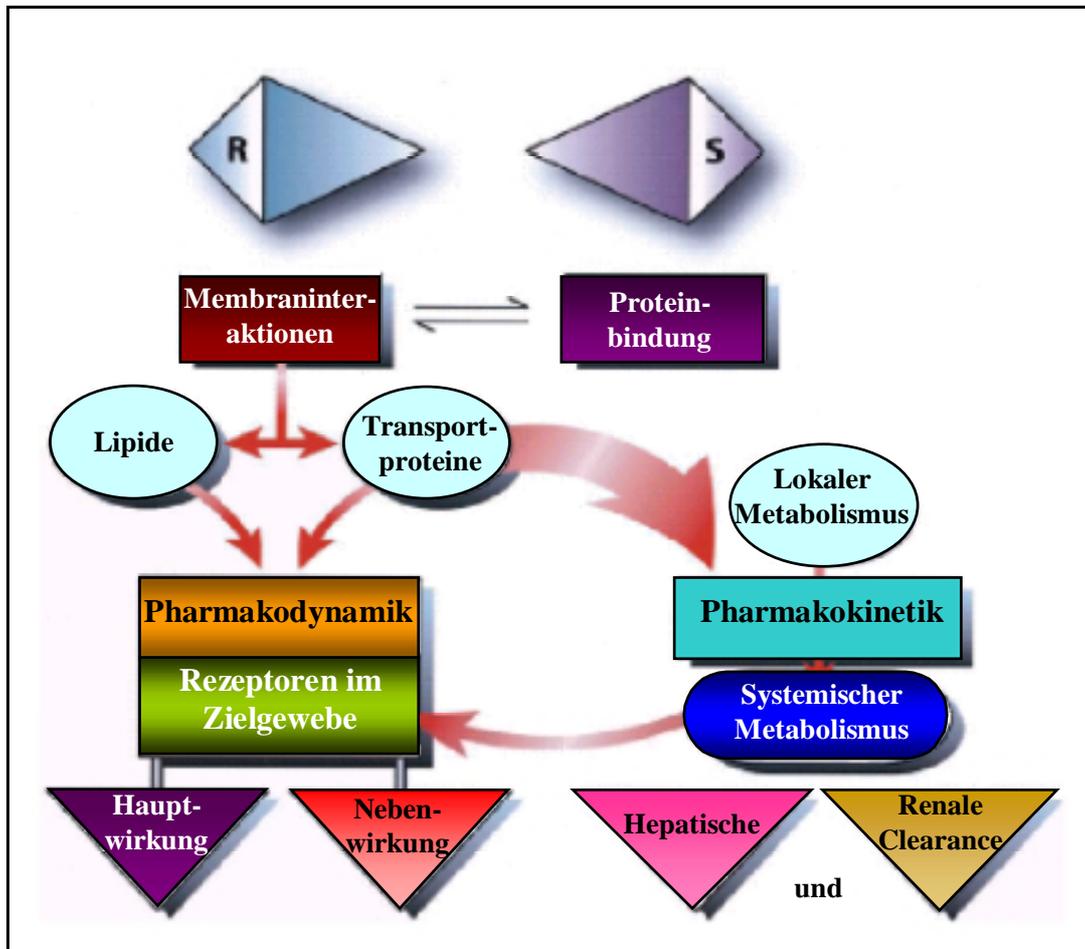


Abb. 5: Potentielle Wechselwirkungen chiraler Arzneistoffe mit körpereigenen Strukturen, die sowohl zu Unterschieden in der Wirkungsqualität als auch der Wirkstärke der Enantiomere führen können (modifiziert aus [50])

Die Unterschiede in der Wirkung von Enantiomeren auf den Organismus lassen sich nach [45] wie folgt klassifizieren:

1. Das Eutomer (das Enantiomer mit der größeren Wirkungsstärke im Hinblick auf die angestrebte Arzneimittelwirkung) ist der alleinige Träger der Hauptwirkung; das Distomer (das schwächer wirksame Enantiomer) ist mit einem eudesmischen Verhältnis (Distomer:Eutomer) von kleiner als 1:50 pharmakologisch praktisch inaktiv. Beispiele hierfür

- sind der Angiotensin-II-Rezeptorantagonist R-Losartan, das Antidepressivum S-Citalopram (Escitalopram) [45] und der GABA_A-Agonist S-Zopiclon (Eszopiclon) [51].
2. Das Distomer ist pharmakologisch deutlich geringer aktiv, wie im Falle von Verapamil, dessen S-Enantiomer am Ca²⁺-Kanal 10fach effektiver wirkt als die R-konfigurierte Form. Das Antiarrhythmikum R-Tocainid löst eine vierfach stärkere Na⁺-Kanalblockade als S-Tocainid [52] aus. S-Warfarin ist ein etwa 4mal stärker wirksames Antikoagulans als das R-Enantiomer [45]. Die etwa dreimal so große Affinität von S-Ketamin (Esketamin) zum NMDA-Rezeptor im Vergleich zum R-Isomer ist neben dem verbesserten Aufwacherhalten der Grund für die heutige Nutzung von Ketanest[®] in der Anästhesie [53].
 3. Die gewünschte Wirkung des Eutomers wird durch das Distomer antagonisiert bzw. das Distomer weist eine andere Wirkqualität auf, so bei Labetalol, dessen S,R-Isomer ein potenter α -Adrenorezeptorenblocker, das R,R-Isomer ein β -Adrenorezeptorenblocker und die S,S- und R,S-Isomere inaktiv sind [45]. Dextromethorphan wirkt als mildes Antitussivum ohne analgetische und atemdepressive Nebenwirkungen, während Levometorphan ein starkes Analgetikum mit etwa der fünffachen Potenz des Morphin ist [51].
 4. Die Enantiomere unterscheiden sich in ihrer Toxizität. Dies ist z.B. bei den LA Ropi- und Bupivacain der Fall, auf die später eingegangen werden soll. Die teratogene Wirkung des Thalidomid konnte ausschließlich dem S-Enantiomer zugewiesen werden, während die sedativ-hypnotische Wirkqualität der R-konfigurierten Form zukommt [54, 55].
 5. Die Enantiomere werden unterschiedlich metabolisiert, wie es am Beispiel des Prilocain, dessen S-Enantiomer wesentlich schneller zum Methämoglobinbildner o-Toluidin abgebaut wird als die R-Form [45, 56], ersichtlich ist. Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol verliert sein Chiralitätszentrum am Schwefel im Zuge der nichtenzymatischen Bioaktivierung zum Sulfenamid. Die Enantiomere des Prodrugs werden jedoch nach Resorption in unterschiedlichem Ausmaß von CYP-Isoenzymen zu inaktiven Metaboliten umgesetzt. Die Gesamtmenge der aus R-Omeprazol gebildeten Metabolite ist in der Summe etwa dreimal so hoch wie bei S-Omeprazol (Esomeprazol), was aufgrund der daraus resultierenden größeren AUC für das S-Enantiomer zur Markteinführung von Nexium[®] führte [57].

Die chiralen LA Articain und Mepivacain werden als Racemate vermarktet, vom 1996 eingeführten Ropivacain wird ausschließlich das S-(-)-Enantiomer eingesetzt. Seit 2004 steht in der Klinik neben dem Racemat auch das linksdrehende S-Isomer des Bupivacain (Levobupivacain) zur Verfügung. Anstoß zu dieser Hinwendung zum Einsatz enantiomerenreiner LA in der Regionalanästhesie waren Berichte über die gestiegenen Häufigkeiten kardio- und ZNS-

toxischer Nebenwirkungen, vor allem beim Einsatz der lang wirksamen LA Etidocain und Bupivacain [58].

An neuronalen Na⁺-Kanälen wurde für die kompetitive Verdrängung des Kanalaktivators Veratridin durch Bupivacain sowie an aktivatorfreien Kanälen eine Stereoselektivität von 1,6:1 für das R-(+)-Enantiomer gefunden. Die Selektivität kehrt sich bei der durch höhere Konzentrationen erreichbaren nichtkompetitiven Aufhebung einer BTX-induzierten Kanalöffnung zu 0,29:1 um. Die Autoren leiten daraus die Existenz eines Bindungsareals mit hoher und eines Areal mit niedriger Affinität zu LA im Na⁺-Kanal ab, wobei die Bupivacain-Enantiomere an diesen Bindungsstellen verschiedene Bindungs- und Dissoziationskinetiken aufweisen sollen [59]. An anderer Stelle wird die Stereoselektivität für die [³H]-BTX-Verdrängung von Na⁺-Kanälen in Rattenhirnsynaptosomen *in vitro* mit 3:1 (R:S) angegeben, wobei sich die Selektivität nach Hyperpolarisation der Zellmembran wiederum umkehren läßt. *In vivo* sinkt die Stereoselektivität auf 1,2:1 (R:S) [60].

Am isolierten Meerschweinchenherzen verlängert R-Bupivacain die AV-Überleitungszeit 54 % stärker als das S-Enantiomer [61]. Das weniger lipophile S-Ropivacain führt zu einer wesentlich geringeren AV-Verlängerung, wobei zwischen den Enantiomeren keine Unterschiede festgestellt werden konnten [62].

Die klinisch erreichten Plasmakonzentrationen von Bupivacain, die zu kardiotoxischen Nebenwirkungen führen, liegen im Bereich von 5 - 15 µM. An den Vorhöfen von Rattenherzen führen bereits Konzentrationen von 5,1 µM *rac*-Bupivacain und 6,1 µM S-Bupivacain zu einer 50 %igen Erniedrigung der [³H]-Noradrenalinausschüttung, was eine Erklärung für die verminderte Reizweiterleitung liefern könnte [63]. Eine Stereoselektivität konnte in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Die Stereoselektivität für Mepi-, Ropi- und Bupivacain an TTX-resistenten Na⁺-Kanälen *in vitro* wird als gering angegeben. S-Mepivacain wirkt in der nutzungsabhängigen Kanalblockade etwa 1,3mal stärker als sein Antipode. Die Bupi- und Ropivacainenantiomere wirken praktisch gleichwertig [64].

Die Wirkungen der Enantiomere von Ropi- und Bupivacain auf den Tonus der Koronargefäße des Meerschweinchens differieren deutlich. Während S-Bupivacain ein Vasokonstriktor mit langsamem Wirkungseintritt ist, führt R-Bupivacain zu einer schnellen Gefäßdilatation. In der Summe der Wirkungen ist beim Racemat eine leichte gefäßerweiternde Wirkung zu verzeichnen. S- und R-Ropivacain wirken vasokonstriktorisch, wobei dem S-Isomer die stärkere Wirksamkeit zukommt. Als mögliche Ursache für die Unterschiede in der Gefäßwirkung vermuten die Autoren eine stereoselektive Hemmung von K⁺_{ATP}-Kanälen durch S-Bupivacain so-

wie weitere noch nicht geklärte Angriffspunkte an den Membranen der glatten Muskelzellen [65].

Die LD₅₀ von S-Bupivacain bei Kleinsäugetieren beträgt etwa das 1,2 - 1,3fache des Wertes für R-Bupivacain. Die minimale Krampfdosis ist sogar um 70 % erhöht [66]. Die systemische Toxizität im Tierversuch ist für R-Bupivacain etwa 50 % höher als für S-Bupivacain [67].

Als Zusammenfassung der Beobachtungen, lässt sich feststellen, dass die geringe Stereoselektivität in der Hauptwirkung der LA *in vitro* für den klinischen Einsatz am Menschen nicht relevant ist. S- und *rac*-Bupivacain unterscheiden sich nicht in Onset und Anästhesiedauer [66]. Die im Vergleich zum Racemat verbesserten toxikologischen Eigenschaften des S-Enantiomers bringen jedoch ein höheres Maß an Arzneimittelsicherheit mit sich.

In den Jahren seiner Anwendung hat sich Ropivacain in der Qualität seiner Wirkung *rac*-Bupivacain als praktisch gleichwertig erwiesen [68]. Sein verbessertes Nebenwirkungsprofil im Hinblick auf Kardio- und ZNS-Toxizität wird eher als Resultat der veränderten physikochemischen Eigenschaften angesehen [62].

Das Konzept, durch den Einsatz des etwas schwächer wirksamen - aber dafür auch weniger toxischen - Enantiomers die therapeutische Sicherheit aufgrund verringerter Nebenwirkungen zu erhöhen, ist im Fall der homologen LA Ropivacain und S-Bupivacain aufgegangen. Neben der geringeren Affinität zu kardialen Na⁺-Kanälen scheinen auch andere - noch nicht aufgeklärte - stereoselektive Mechanismen (Beeinflussung anderer Ionenkanäle, Eingriffe in die Zellatmung) zu existieren, die für die Differenzen in der Toxizität der Enantiomere verantwortlich sind. Welcher der beiden enantiomerenreinen Verbindungen im klinischen Einsatz der Vorzug zu geben ist, werden weiterführende Studien in der Zukunft klären müssen.

1.4. Möglichkeiten zur Gewinnung reiner Enantiomere

Um reine Enantiomere zu erhalten, sind grundsätzlich zwei Verfahren anwendbar. Die erste Möglichkeit stellt die asymmetrische Synthese dar, die zweite die Racemattrennung auf einer Synthesestufe oder des racemischen Endproduktes (Abb. 6).

Die asymmetrische Synthese erfordert den Einsatz entsprechender Edukte, chiraler Zusätze oder chiraler Katalysatoren. Zur Racemattrennung werden chirale Hilfsstoffe in stöchiometrischen Mengen (z.B. Salzbildner) zur direkten oder in katalytischen Mengen (z.B. Enzyme) zur subtraktiven Trennung benötigt. Ein weites Feld stellen die Medien zur chromatographischen Racemattrennung im weitesten Sinne dar. Es existiert eine stetig wachsende

Auswahl an chiralen stationären Phasen (CSP) und Techniken für die vielfältigen Trennprobleme [70, 71]. Ein elegantes Verfahren zur Racemattrennung stellt darüber hinaus der enantioselektive Transport durch chirale Membranen dar [72, 73].

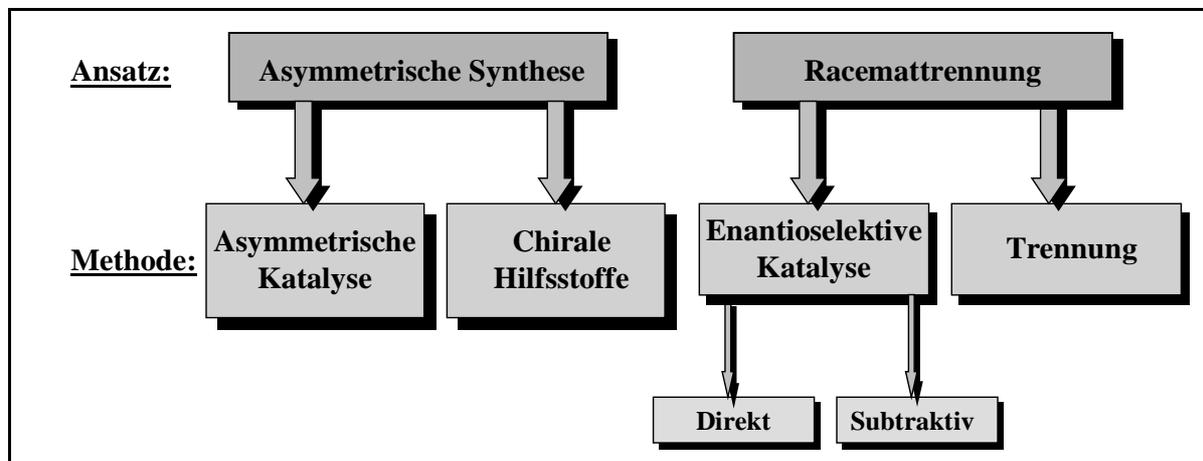


Abb. 6: Die grundlegenden Ansätze zur Gewinnung reiner Enantiomere (nach [69])

Die Auswahl der richtigen Strategie wird entscheidend vom Syntheseweg, strukturellen Eigenschaften der Zielverbindungen und nicht zuletzt von den Kosten für die Gewinnung des reinen Enantiomers geleitet.

2. Problemstellung

Aus der Gruppe der Fomocaine sind derzeit über 300 Verbindungen bekannt [74]. Die Muttersubstanz wurde erstmals 1957 beschrieben [29] und konnte 1967 als Oberflächenanästhetikum (Erbocain[®]) in die Therapie eingeführt werden. In den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde bereits eine Reihe chiraler Derivate des Fomocain synthetisiert [75]. Bei diesen Verbindungen wurde die Position des Chiralitätszentrums in der Zwischenkette und am Morpholinring variiert, um den Einfluß der Chiralität auf die lokalanästhetische Wirkung studieren zu können. Die Verbindungen O/G3 und O/G5 konnten in ihre Enantiomere getrennt und pharmakologisch untersucht werden. Sie zeigten jedoch eine im Vergleich zu Fomocain verringerte Wirksamkeit bei höherer Toxizität und fehlender Stereoselektivität in der Wirksamkeit der Enantiomere [76]. Es gab aber Hinweise auf stereoselektive Unterschiede in der Plasmaeiweißbindung und der Metabolisierung von O/G3 und O/G5 durch CYP-Isoenzyme [75, 76].

Aufgrund der Tatsache, dass die Anilidlokanästhetika mit Piperidin als basischem Molekülteil (Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain) ein Chiralitätszentrum im Heterocyclus tragen und hier eine Diskriminierung zwischen den Enantiomeren hinsichtlich Wirkung und/oder Toxizität festzustellen ist, sollte die Suche nach Verbesserungen der Leitstruktur Fomocain auf die chirale Substitution des Morpholinringes erweitert werden. Morpholin besitzt in den Positionen 2 und 6 bzw. 3 und 5 zueinander äquivalente prochirale Kohlenstoffatome. Dies führt bei der Einführung nur eines Chiralitätszentrums in das Molekül zu zwei möglichen Stereozentren, nämlich in Position 2 neben dem Sauerstoffatom und in Position 3 neben dem Morpholinstickstoff und damit zu zwei homologen Reihen neuer Fomocainderivate, die der pharmakologischen Testung zugeführt werden sollten.

Das in seinem pharmakologisch-toxikologischen Wirkungsprofil die günstigsten Eigenschaften aufweisende Racemat jeder Serie sollte in seine Enantiomere getrennt werden, die wiederum getestet werden sollten.

Das Hauptaugenmerk bei der Gewinnung der reinen Enantiomere der Zielverbindungen lag auf der Nutzung der im Arbeitskreis vorhandenen präparativen HPLC-Anlage mit einer Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm) und daraus folgend dem Studium des chromatographischen Verhaltens der chiralen Fomocainderivate an polysaccharidbasierten CSP. Parallel dazu sollte auch ein alternativer Weg zur Racemattrennung über die Bildung diastereomerer Salze untersucht werden.

Im Rahmen pharmakologischer Untersuchungen am Ganztier sollte an Ratten die oberflächenanästhetische Potenz an der Cornea, das Ausmaß von Leitungsanästhesie und Parese am N. ischiadicus und die LD₅₀ nach intraperitonealer Injektion der neuen Verbindungen gegen die Referenzen Procain, Tetracain und Fomocain bestimmt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Synthese und Analytik der chiralen Fomocainderivate

3.1.1. Syntheseplanung und -durchführung

Die klassische Fomocainsynthese geht von (3-Chlorpropyl)benzen aus, das in einer Chlormethylierung nach Blanc mit HCl (g) und Formaldehyd zu 1-(Chlormethyl)-4-(3-chlorpropyl)benzen (**1**) reagiert. In der zweiten Stufe wird mit Phenolat in Aceton zum 1-(3-Chlor-

propyl)-4-(phenoxy)methyl)benzen (**2**) umgesetzt, das im letzten Schritt in einer nukleophilen Substitution mit Morpholin im 40fachen Überschuss als Reaktionspartner und Lösungsmittel 4-[3-(4-Phenoxy)methyl)phenyl]propyl-morpholin (Fomocain INN) liefert [29]. Der Syntheseweg erfuhr im Laufe der Entwicklung einige Modifikationen. So konnte der gasförmige Chlorwasserstoff in der ersten Synthesestufe gegen das leichter zu handhabende Thionylchlorid ausgetauscht werden [77]. Zur Synthese von Fomocainen mit chiralen Morpholinen kann bis zur vorletzten Synthesestufe der selbe Weg beschriftet werden. Bei einem nur geringen Morpholinüberschuss im abschließenden Syntheseschritt werden durch die geringe Abgangstendenz des Chlorids nur geringe Umsatzgeschwindigkeiten mit niedrigen Ausbeuten erreicht. Durch Halogenaustausch mit LiBr unter Phasentransferkatalyse mit Trioctylmethylammoniumchlorid (TOMACl) nach [78] ist aus (**2**) das 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxy)methyl)benzen (**3**) mit über 90 %iger Ausbeute erhältlich, das die Fomocainsynthese mit einem 1,5- bis zweifachen Basenüberschuss in Toluol mit guten Ausbeuten erlaubt. Die Zusammenführung von (**2**) oder (**3**) mit den zu synthetisierenden Morpholinderivaten im Baukastenprinzip ergibt neue lokalanästhetisch wirksame Substanzen aus der Gruppe der Fomocaine (Abb. 7). Aufgrund des erhöhten Substanzbedarfs für die pharmakologisch-toxikologischen Untersuchungen (mindestens 2 g) sollten die Verbindungen im größeren Maßstab dargestellt werden.

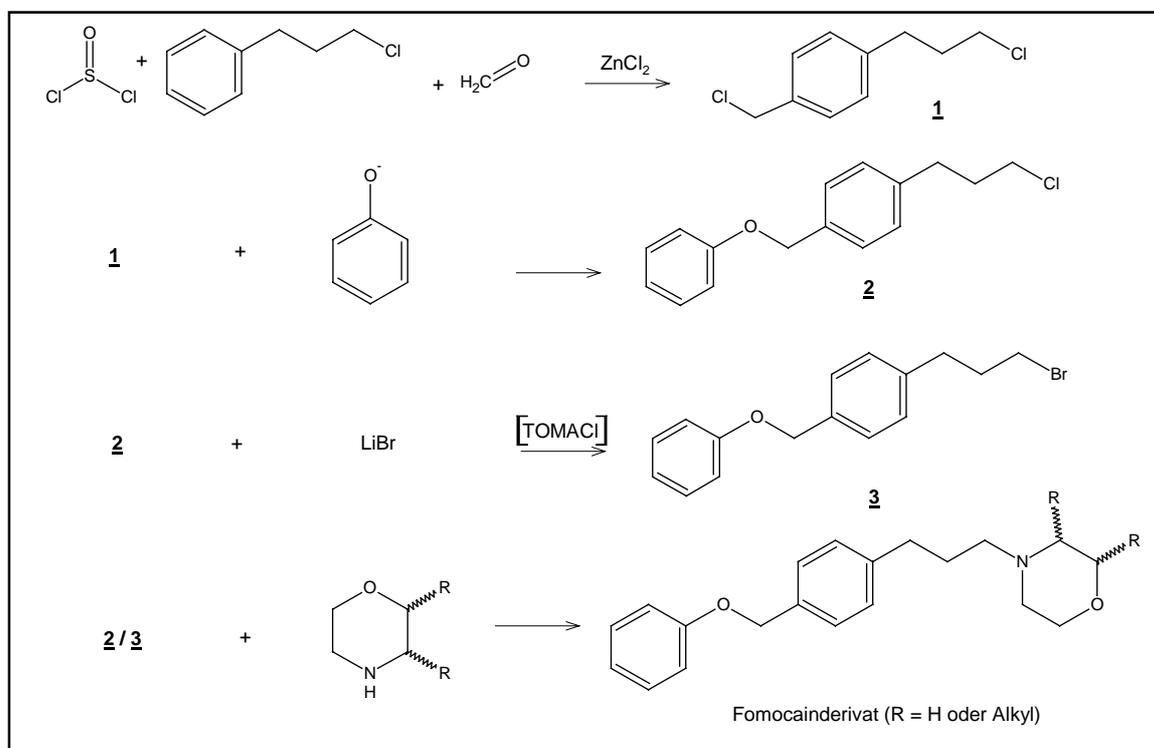


Abb.7: Syntheschema zur Darstellung von Fomocain und seinen chiralen Derivaten

Nach Knorr [79] lässt sich Morpholin durch Dehydratation von Diethanolamin in 70 %iger Schwefelsäure erhalten. Médard konnte später die Ausbeute der Reaktion durch Einsatz konzentrierter Schwefelsäure und Erhitzen auf 175 - 180 °C für 7 - 8 Stunden auf über 90 % erhöhen [80]. Die Dehydratationsmethode ließ sich auch auf andere Dialkanolamine übertragen, wenn auch zunächst mit niedrigen Ausbeuten [81]. Durch Ringschluss der entsprechenden Dialkanolamine ist bereits eine große Anzahl einfach und mehrfach substituierter C-Alkylmorpholine dargestellt worden. Tabelle 1 gibt über die bereits beschriebenen einfach substituierten C-Alkylmorpholine Auskunft.

Morpholinderivat	Zitate	Ausbeuten
2-Methylmorpholin	[75], [82], [83], [84], [85] (S-2-Methylmorpholin), [86]	[75] 71 %, [82] 57 %, [83] 80 %, [84] 48 %, [85, 86] k.A.
2-Ethylmorpholin	[82], [83], [85], (S-2-Ethylmorpholin), [86]	[82] 61 % (and. Weg), [83] 51 %, [85] k.A.
2-Propylmorpholin	[86]	k. A.
2-Isopropylmorpholin	[86]	k. A.
2-Butylmorpholin	[84]	64 %
3-Methylmorpholin	[83], [85] (R-3-Methylmorpholin)	[83] 93 % (als HCl), [85] k.A.
3-Ethylmorpholin	[75], [82], [85] (R-3-Ethylmorpholin))	[75] 68%, [82] 72 %, [85] k.A.
3-Propylmorpholin	[87]	47 %
3-Isopropylmorpholin	[85] (R-3-Isopropylmorpholin)	k.A.
3-Butylmorpholin	[87]	44 %

Tabelle 1: Aufstellung über bereits in der Literatur beschriebene einfach am Kohlenstoff alkylsubstituierte Morpholine

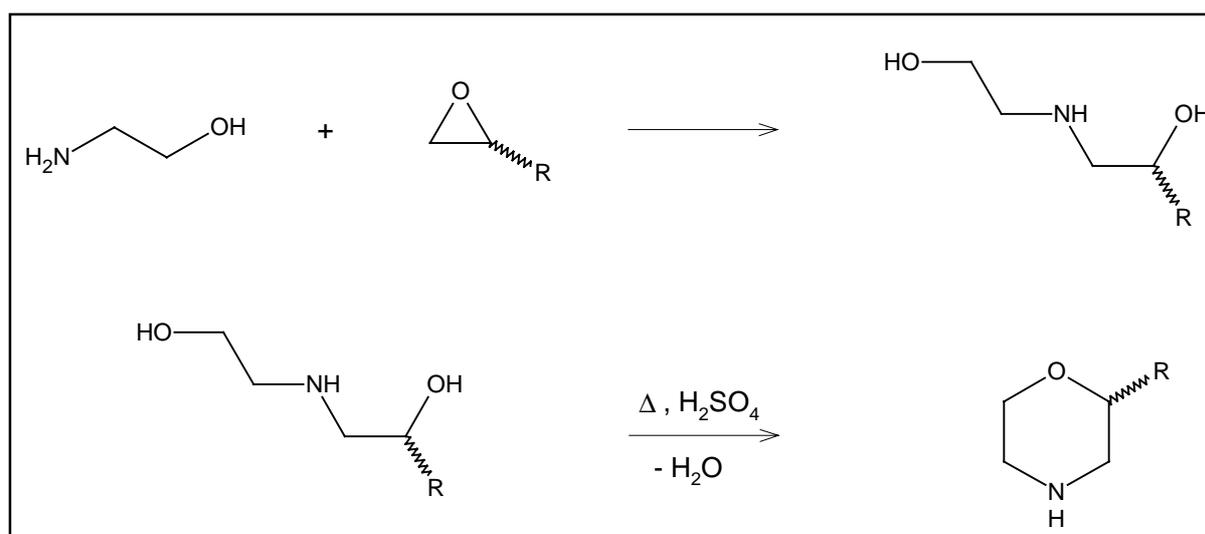


Abb. 8: Syntheschema zur Darstellung von 2-Alkylmorpholinen (R = CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉)

Die Edukte für die Ringschlussreaktion zu am C-2 alkylierten Morpholinen sind aus der Reaktion von 1,2-Epoxiden mit dem achtfachen Überschuss an 2-Aminoethanol in wässriger Lösung zugänglich (Abb. 8). Ethylenoxid und höhere 2-Aminoalkanole liefern die Ausgangsstoffe zur Synthese von 3-Alkylmorpholinen (Abb. 9).

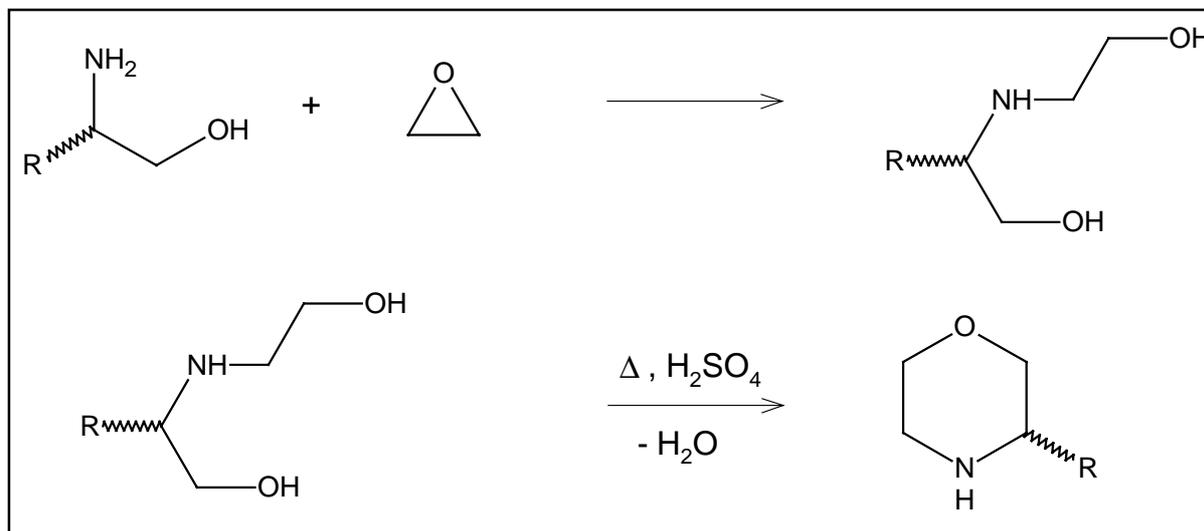


Abb. 9: Syntheschema zur Darstellung von 3-Alkylmorpholinen ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{i-C}_3\text{H}_7$)

Die Handhabung des bei Raumtemperatur gasförmigen Ethylenoxids bei der Synthese der 3-Alkylmorpholine gestaltete sich insofern schwierig, als dass es vor dem Einsatz in geeigneter Weise kondensiert werden musste, da das Gas beim Einleiten in die Lösungsmittel Ethanol oder Wasser nur ungenügend absorbiert wurde. Die Kondensation gelang durch langsames Einleiten des Gases aus der Druckgaspackung in eine Ethanol/ CO_2 -gekühlte Waschflasche (ca. $-60\text{ }^\circ\text{C}$), aus der dann das Ethylenoxid direkt in den Reaktionsansatz gegeben werden konnte. Die höheren Epoxide zur Synthese der 2-Alkylmorpholine liegen bei Raumtemperatur in flüssiger Form vor, so dass sie sicher über einen Tropftrichter dosiert werden konnten. Zur Ringschlussreaktion wurden alle erhaltenen *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)alkanole zu eisgekühlter konzentrierter Schwefelsäure getropft und anschließend für etwa 12 Stunden auf ca. $150\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Niedrigere Temperaturen verschlechterten die Ausbeuten, während zu hohe Temperaturen die ohnehin schon immense Teerbildung im Ansatz verstärkten. Die Morpholinderivate mussten nach Beendigung der Reaktion, Alkalisieren des Ansatzes und Abtrennen von den teerigen Nebenprodukten aus einer wässrig-alkalischen Lösung extrahiert werden. Morpholin und seine chiralen Abkömmlinge lassen sich, bedingt durch ihre hohe Hydrophilie, nur schlecht aus einer Wasserphase

ausethern. Zur Extraktion der Morpholinderivate wurde daher ein Perforator für spezifisch leichtere Flüssigkeiten eingesetzt, mit dem im Zeitraum von 48 Stunden die Basen mit Ether erschöpfend extrahiert werden konnten. Auf diese Weise wurden acht *rac*-C-Alkylmorpholine dargestellt, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Morpholin	Ausbeute 1. Stufe	Ausbeute Ringschluss	Ausbeute gesamt
2-Methylmorpholin (5)	77,3 %	62,0 %	47,9 %
2-Ethylmorpholin (9)	84,9 %	17,7 %	15,0 %
2-Propylmorpholin (13)	94,5 %	29,0 %	27,4 %
2-Butylmorpholin (17)	82,7 %	26,7 %	22,1 %
3-Methylmorpholin (21)	95,0 %	53,6 %	50,9 %
3-Ethylmorpholin (25)	86,3 %	69,0 %	59,5 %
3-Propylmorpholin (29)	63,0 %	80,5 %	50,7 %
3-i-Propylmorpholin (33)	86,9 %	80,5 %	69,9 %

Tabelle 2: Ausbeuten aus der Synthese der dargestellten *rac*-C-Alkylmorpholine

Die Reaktion des Aminoalkohols mit dem Epoxid verlief bei allen Synthesen glatt und mit zufrieden stellenden Ausbeuten. Es ist zu erkennen, dass im Fall der 2-substituierten Morpholine mit wachsender Kettenlänge des Alkylrestes die Ausbeute in der Ringschlussreaktion sank. Der Grund hierfür ist in der zunehmenden sterischen Hinderung durch die länger werdende Seitenkette neben einer der beiden zur Etherbildung benötigten Hydroxylgruppen zu suchen. Sind beide Alkoholfunktionen der *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)alkanole frei zugänglich, verläuft die Dehydratation zum zyklischen Ether glatt und mit weniger Nebenreaktionen (Teerbildung). Die Synthese des in 3-Stellung einen Isopropylrest anstatt analog zur 2-Substitution eine Butylgruppe tragenden Morpholins ergab sich aus der Fragestellung, wie sich ein verzweigter, raumerfüllender Rest neben dem basischen Zentrum auf die pharmakologischen Eigenschaften des daraus resultierenden Fomocainderivates auswirken würde. Die Reaktion von **2** oder **3** mit den Morpholinderivaten ergab acht Racemate bisher noch nicht pharmakologisch getesteter chiraler Fomocainderivate (Tabelle 3).

Im Gegensatz zur Ringschlussreaktion der Morpholine, für die sich die Alkylsubstitution neben dem Stickstoff als vorteilhaft erwies, erbrachten die Synthesen der 3-substituierten Fomocaine geringere Ausbeuten, was in diesem Fall auf eine stärkere Abschirmung des nukleophilen Stickstoffs durch größer werdende Alkylgruppen in Nachbarposition zurückzuführen ist.

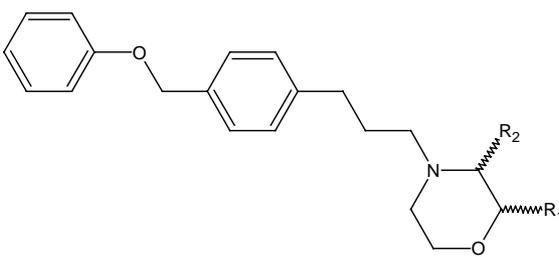
					
Substanzcode	R ₁	R ₂	Edukt	Ausbeute	Gesamtausbeute
O/W1 (6)	CH ₃	H	<u>2</u>	93,9 %	28,8 %
O/W3 (10)	C ₂ H ₅	H	<u>2</u>	84,8 %	26,0 %
O/W5 (14)	C ₃ H ₇	H	<u>2</u>	73,4 %	22,5 %
O/W7 (18)	C ₄ H ₉	H	<u>3</u>	83,7 %	23,5 %
O/W9 (22)	H	CH ₃	<u>2</u>	56,4 %	17,3 %
O/W11 (26)	H	C ₂ H ₅	<u>2</u>	49,7 %	15,2 %
O/W13 (30)	H	C ₃ H ₇	<u>3</u>	77,6 %	21,8 %
O/W15 (34)	H	i-C ₃ H ₇	<u>3</u>	54,4 %	15,3 %

Tabelle 3: Strukturen, Ausbeuten (letzte Synthesestufe) und Gesamtausbeuten (berechnet auf das eingesetzte (3-Chlorpropyl)benzen)) der chiralen Fomocainderivate

Wurde 2 als Edukt mit dem Morpholinderivat als Lösungsmittel und Reaktionspartner eingesetzt, betrug die Reaktionszeit bei 80 - 120 °C vier bis sechs Stunden, wonach das Morpholin durch Destillation bei vermindertem Druck zurückgewonnen werden musste. Temperaturerhöhungen über 120 °C oder Verlängerung der Reaktionszeit verbesserten die Ausbeuten nicht, sondern begünstigten eher Zersetzungsreaktionen, die durch starke Verfärbungen der Ansätze und nicht näher identifizierte fluoreszierende Nebenprodukte auffielen. Die Umsetzungen von 3 mit dem 1,5- bis 2fachen Einsatz an Morpholinbase in Toluol unter K₂CO₃-Zusatz erforderten zwar gerade bei den 3-Alkyl-Verbindungen Reaktionszeiten von bis zu einer Woche beim Erhitzen am Rückfluss, lieferten aber im Vergleich zum ersten Weg in höheren Ausbeuten sauberere Produkte, die keine weitere chromatographische Reinigung benötigten. Generell ist dem Syntheseweg über 3 der Vorzug zu geben, da hier der immer mit Verlusten verbundene Destillationsschritt zur Rückgewinnung des unter Umständen sehr teuren Eduktes entfallen kann.

Zu Fomocain existiert ein Analogon mit Diethanolamin als basischer Komponente (Oe7000), das bei verbesserter Wasserlöslichkeit ebenfalls gut lokalanästhetisch wirksam ist [88]. Da die entsprechenden chiralen Dialkanolamine als Zwischenstufen für die chiralen Morpholine zur Verfügung standen, war es naheliegend, auch die chiralen Abkömmlinge von Oe7000 durch Umsetzung der Basen mit 3 zu synthetisieren und analytisch zu charakterisieren (Tabelle 4).

Die weiterführenden pharmakologischen Untersuchungen mit den Derivaten sollten jedoch nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Substanzcode	R ₁	R ₂	Edukt	Ausbeute	Gesamtausbeute
O/W2 (<u>7</u>)	CH ₃	H	<u>3</u>	50 %	14,1 %
O/W4 (<u>11</u>)	C ₂ H ₅	H	<u>3</u>	47,9 %	13,5 %
O/W6 (<u>15</u>)	C ₃ H ₇	H	<u>3</u>	49,5 %	13,9 %
O/W8 (<u>19</u>)	C ₄ H ₉	H	<u>3</u>	47,2 %	13,3 %
O/W10 (<u>23</u>)	H	CH ₃	<u>3</u>	79,2 %	22,3 %
O/W12 (<u>27</u>)	H	C ₂ H ₅	<u>2</u>	95,5 %	29,3 %
O/W14 (<u>31</u>)	H	C ₃ H ₇	<u>3</u>	42,2 %	11,9 %
O/W16 (<u>35</u>)	H	i-C ₃ H ₇	<u>3</u>	12,6 %	3,5 %

Tabelle 4: Strukturen, Ausbeuten (letzte Synthesestufe) und Gesamtausbeuten (berechnet auf das eingesetzte (3-Chlorpropyl)benzen)) der chiralen Oe7000-Derivate

Die Struktur des eingesetzten Dialkanolamins scheint keinerlei Auswirkungen auf die Ausbeuten zu haben. Hier zeichnete die im Vergleich zu den 2-Alkylmorpholinen aufgehobene Fixierung der C-N-Bindungen mit ihrer resultierenden sterischen Abschirmung des Stickstoffs für die verminderten Ausbeuten verantwortlich. Kürzere Alkylsubstituenten in Nachbarschaft zum basischen Stickstoff führten offensichtlich durch ihren + I-Effekt zu einer Ausbeuteverbesserung. Die wachsende Raumerfüllung durch größer werdende Alkylreste war jedoch für eine immer stärker werdende Abschirmung des nukleophilen Zentrums verantwortlich, was besonders beim Wechsel von der Propylseitenkette zum voluminöseren Isopropylsubstituenten auffiel.

3.1.2. Strukturbeweise durch spektroskopische Untersuchungen und Reinheitsprüfungen der chiralen Fomocainderivate und Morpholine

3.1.2.1. Massenspektrometrie

Zur Strukturabsicherung wurden die synthetisierten C-Alkylmorpholine und die chiralen Fomocaine massenspektroskopisch untersucht.

Im Elektrospray-MS (ESI-MS) fragmentierten die Morpholine bei einer Signalaufzeichnung ab m/z 70 praktisch nicht. Alle Substanzen zeigten als Hauptsignal ihren jeweiligen Molpeak ($M+H^+$). Im GC-MS mit *Electron-Impact*-Ionisation (EI-MS, Elektronenstoßionisation) waren neben dem Molpeak unabhängig vom Alkylrest Signale bei m/z 86 (Morpholin nach Dealkylierung der Verbindung), 70 sowie das jeweilige Massensignal des abgespaltenen Alkylrestes zu erkennen.

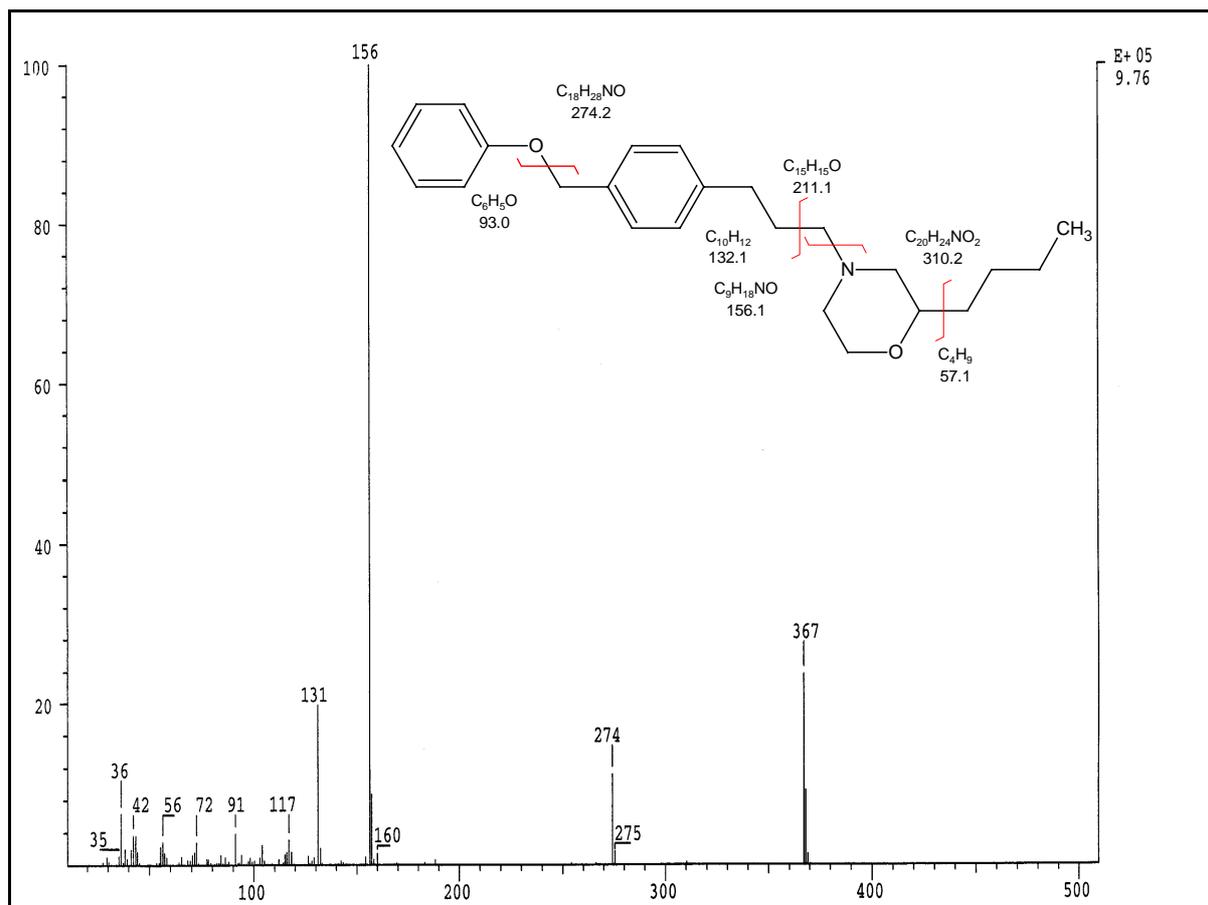


Abb. 10: EI-Massenspektrum von O/W7 (M_r 367,5)

Gleiches galt für die ESI-Spektren der chiralen Fomocaine, die sich durch ihren Molpeak zu erkennen gaben. Im EI-Modus fragmentierten die Verbindungen mit Substitution am C-3 des Morpholinrestes vornehmlich unter Abspaltung des Alkylsubstituenten vom Morpholin, Spaltung der Zwischenkette zwischen dem α - und dem β -C-Atom vom Stickstoff aus gesehen und unter Abspaltung von Phenol. Der Basispeak in den Spektren der 3-substituierten Verbindungen zeigte die Molmasse des Fomocain. Die am C-2 des Morpholins substituierten Fomocainderivate fragmentierten vornehmlich unter Zwischenkettenspaltung am α -C-Atom neben dem basischen Stickstoff. Der Morpholinrest mit einer Methylengruppe der Zwischenkette stellte das Hauptfragment dieser Serie dar. Abb. 10 zeigt exemplarisch für die 2-substituierte Reihe das EI-Spektrum von O/W7.

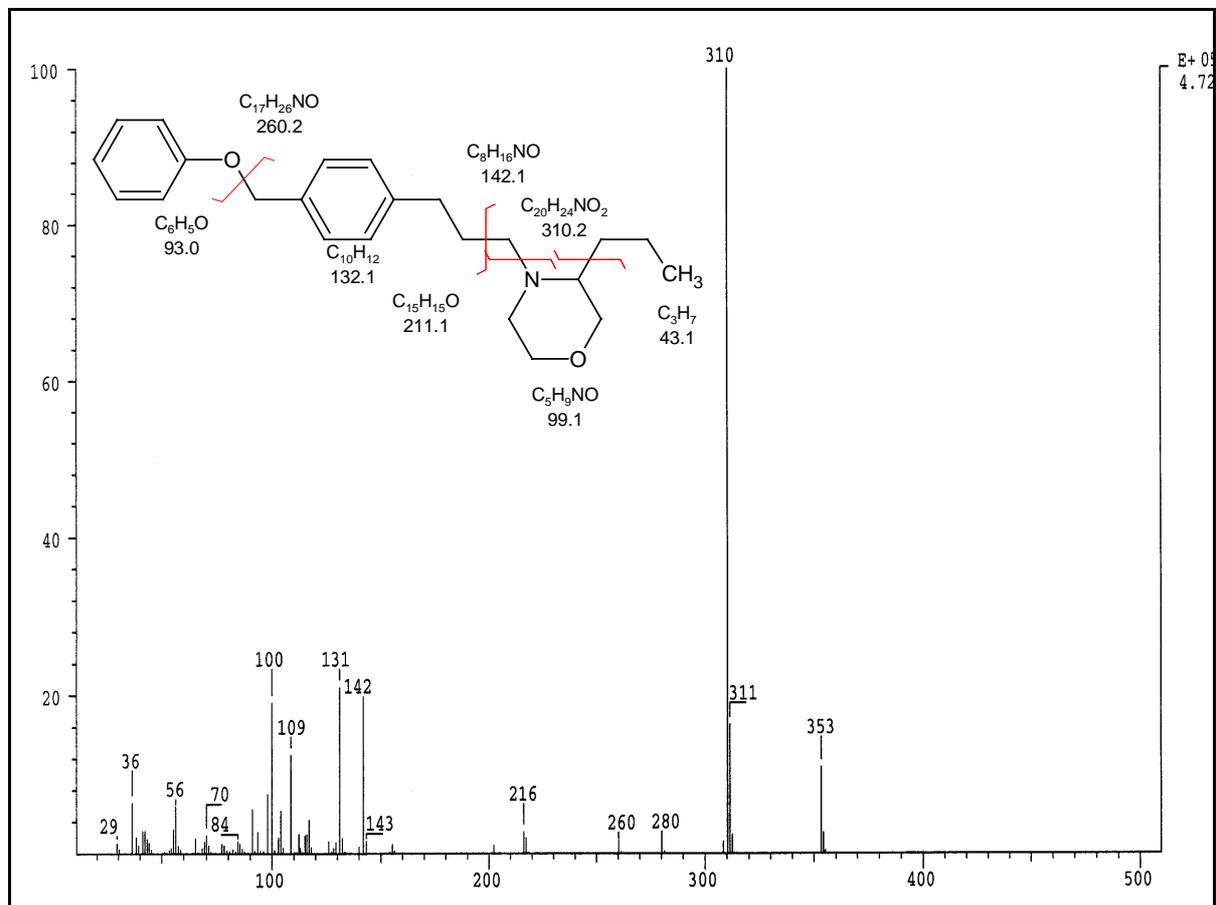


Abb. 11: EI-Massenspektrum von O/W13 (M_r 353,5)

Stellvertretend für die 3-substituierten Fomocainderivate steht das EI-Spektrum von O/W13 (Abb. 11).

3.1.2.2. NMR-Spektroskopie

Die Strukturen der synthetisierten Verbindungen konnten durch ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie aufgeklärt und bewiesen werden. Für jede homologe Reihe soll hier die Strukturaufklärung exemplarisch an einem ausgewählten Beispiel erläutert werden. Je nach Komplexität des erhaltenen ^1H -NMR-Spektrums wurden verschiedene weiterführende Experimente (C,H-COSY, H,H-COSY, NOESY, HMBC, TOCSY) durchgeführt, um zu einem zweifelsfreien Strukturbeweis zu gelangen. Von der lipophilen Kopfgruppe des Moleküls bis zum C-1 des endo-Rings sind ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aller Verbindungen in ihrer Signallage praktisch identisch, so dass hier nur einmal darauf eingegangen wird.

a) Fomocaine mit 2-substituierten Morpholinen (O/W3)

Zur Beschreibung der Signallagen und deren Zuordnung zu den entsprechenden Protonen bzw. Kohlenstoffatomen wurde eine vereinfachte Zählweise (Abb. 12) verwendet.

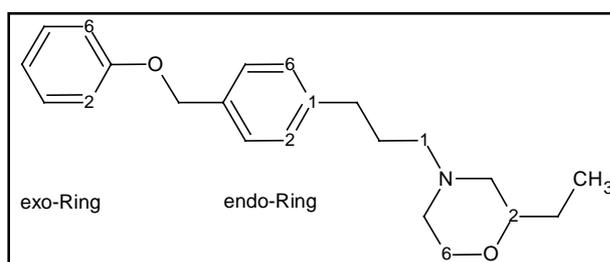


Abb. 12: Zählweise der Atome in O/W3 zur NMR-Auswertung; jeder Cyclus wird für sich gezählt, Aliphatische Ketten von ihrer Verknüpfungsstelle zum Heterocyclen

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von O/W3 (CDCl_3 , 60 MHz, Abb. 13a) zeigt 17 Signale für die 22 C-Atome des Moleküls, wobei 4 Signale zwischen 113,8 und 133,6 ppm je 2 äquivalenten C-Atomen der beiden aromatischen Ringe (C-2 und C-6, C-3 und C-5 von exo- und endo-Ring) zuzuordnen sind. Darüber hinaus fallen zwei C-Signale aus dem Aliphaten-/Heterocyclenbereich zusammen. Das am weitesten tieffeldverschobene Signal bei 158,2 ppm ist dem C-1 des exo-Rings sicher zuzuordnen. Die weiteren Signale der quartären C-Atome liegen bei 140,4 ppm (C-1 endo) und 133,6 ppm (C-4 endo). Im DEPT-Spektrum (Abb. 13b) der Verbindung zeigt sich das chirale C-2 des Morpholins als positives Signal (CH) bei 75,6 ppm, das C-2-Atom des Ethylsubstituenten liegt im Hochfeld bei 8,7 ppm. Die schwächer entschirmten C-Atome 2, 4 und 6 des exo-Rings liefern CH-Signale bei 113,8 ppm (C-2, C-6) und 119,9 ppm (C-4). Die weiteren CH- und die negativen CH_2 -Signale lassen sich so noch nicht zweifelsfrei zuordnen.

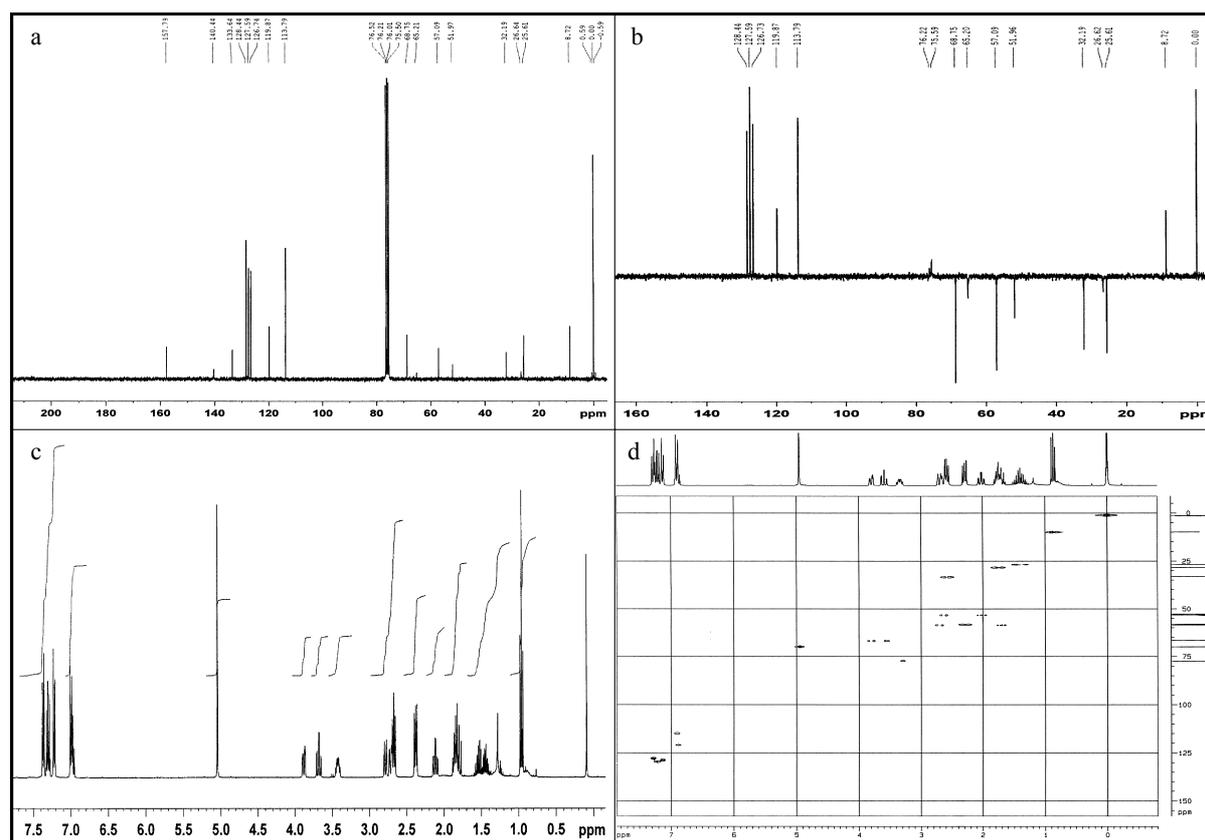


Abb. 13: NMR-Spektren von O/W 3 I a) ^{13}C -NMR (60 MHz), b) DEPT, c) ^1H -NMR, (400 MHz), d) C,H-COSY

Die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums wird durch die Einführung des Chiralitätszentrums am C-2 des Morpholinrings erschwert. Aufgrund des chiralen Kohlenstoffatoms wird die bei Raumtemperatur schnelle Ringinversion eingeschränkt, die Inversion des Stickstoffs jedoch nicht [89, 90]. Die Methylenprotonen des Moleküls werden dadurch diastereotop zueinander und liefern daher mehr oder weniger deutlich voneinander getrennte Signalgruppen, wobei für jedes Proton am C-3, 5 und 6 des Morpholins sowie für die Methylenprotonen des Ethylsubstituenten am C-2 eine geminale und mindestens zwei vicinale Kopplungen mit unterschiedlichen Kopplungskonstanten, die durch die verschiedenen Torsionswinkel verursacht werden (Karplus-Kurve) [91], erkennbar sind. Dieser Sachverhalt erschwert eine korrekte Analyse der Kopplungskonstanten bzw. macht sie aufgrund der teilweisen Überlagerungen der Signale unmöglich.

Basis für die Integration der Signale des ^1H -NMR-Spektrums von O/W3 (CDCl_3 , 400 MHz, Abb. 13c) ist das Singulett (2 H) der Methylengruppe des Benzylphenylethers bei 5,05 ppm. Die Gesamtintegration aller Signale zeigt 29 Protonen. Im Aromatenbereich finden sich 3 Protonen in einem Multiplett zwischen 6,96 und 7,01 ppm, die die an C-2 bzw. C-4 gebundenen Protonen des exo-Rings darstellen. Stärker tieffeldverschoben liegen 6 weitere

aromatische Protonen in Form zweier Dubletts (2 H) bei 7,22 und 7,37 ppm sowie eines Multipletts (2 H) bei 7,31 ppm, deren Zuordnung erst im NOESY-Spektrum (Abb. 14B) gelingt. Die Methylprotonen des Ethylsubstituenten erscheinen als Triplet (3 H) bei 0,96 ppm, das Triplet (2 H) bei 2,38 ppm kann den Methylenprotonen am C-1 der Propylenzwischenkette zugeordnet werden.

Mit diesen Informationen kann das ^{13}C -NMR-Signal bei 68,8 ppm über das C,H-COSY-Spektrum (Abb. 13d) zweifelsfrei dem C-Atom der Etherbrücke zwischen den Aromaten zugewiesen werden. Demzufolge muß das ^{13}C -Signal bei 65,2 ppm, dessen chemische Verschiebung ebenfalls der Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom zuzuschreiben ist, zum C-6 des Morpholins gehören. Im Umkehrschluß lassen sich dann die Signale für das Dublett/Dublett-Signal (1 H, AMX-Kopplung) bei 3,88 ppm und das Dublett/Triplett-Signal (1 H, AMX₂-Kopplung) bei 3,68 ppm im ^1H -NMR-Spektrum den Methylenprotonen am C-6 des Morpholins zuordnen. Erfahrungsgemäß erscheinen in einem aliphatischen Heterocyclus äquatoriale Protonen stärker tieffeldverschoben als axiale [90, 92, 93], sodass auch hier eine Zuordnung getroffen werden kann. Die unterschiedlichen Aufspaltungsmuster der beiden Protonen kommen durch die oben beschriebene Überlagerung der verschiedenen möglichen Kopplungen zustande. Das ^{13}C -Signal des chiralen C-Atoms bei 75,6 ppm gibt ein Korrelationssignal mit dem Multiplett (1 H) bei 3,42 ppm, zeigt also das entsprechende Proton an. Die Methylenprotonen am C-1 der Zwischenkette zeigen einen Crosspeak mit dem ^{13}C -Signal bei 52,0 ppm, womit auch dieses C-Atom identifiziert ist. Auf diesem Signal zeigen sich in der C,H-Korrelation auch noch die Signale von je einem Proton bei 2,78 als Dublett (1 H) und bei 1,80 ppm im hinteren Bereich eines Multipletts. Aus den Crosspeaks des COSY- (Abb. 14A) und des NOESY-Spektrums (Abb. 14B) ist ersichtlich, dass es sich hier um die Methylenprotonen am C-3 des Morpholins handeln muß, da nur Kopplungssignale mit dem vorher identifizierten Proton am chiralen C-Atom auftreten. Der ^{13}C -Peak bei 52,0 ppm zeigt also die chemische Verschiebung zweier C-Atome. Im NOESY-Spektrum sind ebenso Crosspeaks zwischen den Signalen bei 5,05 und dem Dublett (2 H) bei 7,35 ppm erkennbar, wodurch die räumliche Nähe zwischen der Methylengruppe der Etherbrücke und den Protonen an C-3 und C-5 des endo-Rings bewiesen ist. Gleiches gilt für die Korrelation zwischen dem Dublett (2 H) bei 7,21 ppm und dem Triplet (2 H) bei 2,67 ppm, was diese Signale den Protonen an C-2 und C-6 des endo-Rings (7,21) und den Methylenprotonen am C-3 der Zwischenkette zuordnen läßt. Das Multiplett bei 7,31 ppm muß dann zwangsläufig von den Protonen an C-3 und C-5 des exo-Rings verursacht worden sein, wie es anhand der Korrelationsdaten bestätigt werden kann. Die ^{13}C -NMR-Signale bei 128,4 ppm (C-3 und C-5 exo), 127,6 ppm (C-2 und

C-6 endo) sowie bei 126,7 ppm (C-3 und C-5 endo) sind damit auch über die C,H-Korrelation identifiziert. Ebenso läßt sich aus dem NOESY- und auch dem COSY-Spektrum die Lage des Signals der Methylenprotonen am C-2 der Zwischenkette im nicht vollständig aufgelösten Multipllett (2 H) bei 1,85 ppm ableiten, das zum Teil vom Signal des axialen Protons am C-3 des Morpholins überlagert wird. Die Methylengruppe am C-5 des Morpholins zeigt anhand der gefundenen Korrelationen Signale eines Dublett/Dubletts (1 H, AMX-Kopplung) bei 2,74 ppm und eines Dublett/Tripletts (1 H, AMX₂-Kopplung) bei 2,12 ppm. Die zwei nicht vollständig aufgelösten Multipletts (je 1 H) bei 1,55 und 1,26 ppm gehören dann zu den diastereotopen Protonen der Methylengruppe des Ethylsubstituenten, was die Korrelationsdaten eindeutig belegen.

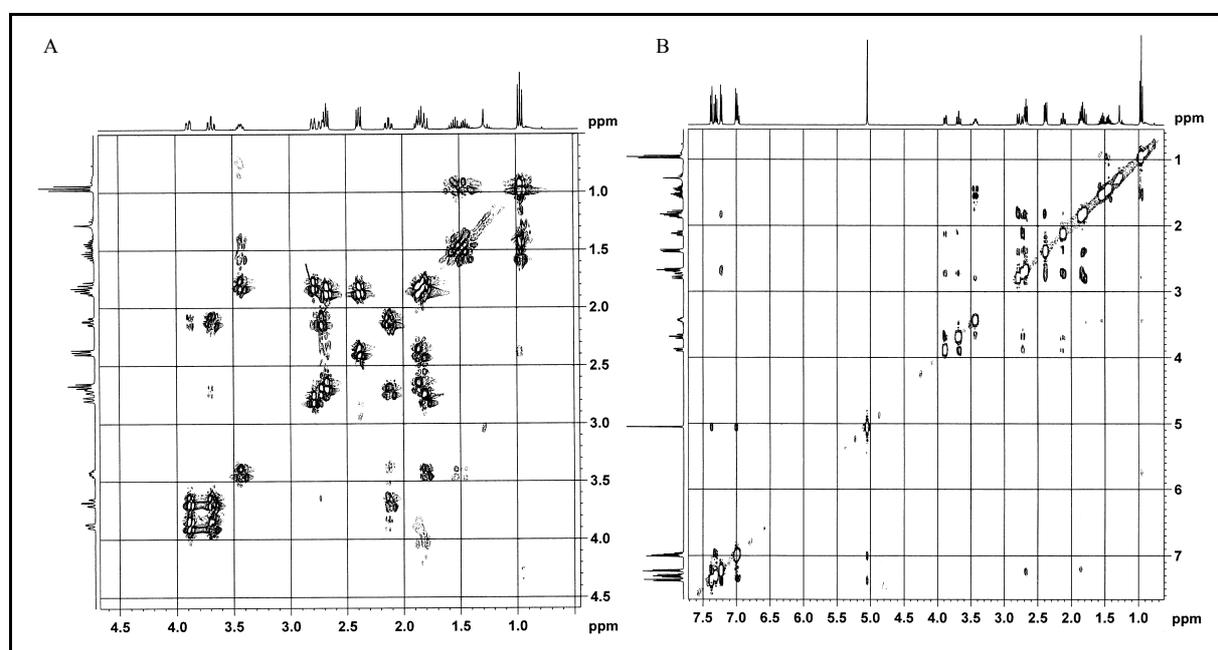


Abb. 14: NMR-Spektren von O/W3 II A) H,H-COSY (Ausschnitt mit den Signalen der Zwischenkette und des Heterocyclus), B) NOESY (komplettes Spektrum)

b) Fomocaine mit 3-substituierten Morpholinen (O/W13)

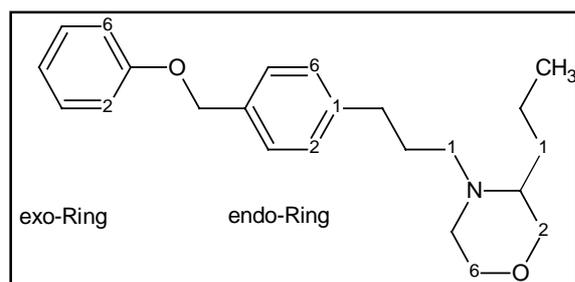


Abb. 15: Zählweise der Atome in O/W13 zur NMR-Auswertung; jeder Cyclus wird für sich gezählt, aliphatische Ketten von ihrer Verknüpfungsstelle zum Heterocyclus

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz) der Verbindung ist im Bereich der aromatischen C-Atome mit dem oben erläuterten Spektrum von O/W3 kongruent, so dass auf die Signallagen und die entsprechenden Zuordnungen zu den Protonensignalen im C,H-COSY nicht weiter eingegangen werden muß. Insgesamt wurden 19 Banden für die 22 C-Atome detektiert. Im HSQCDEPT-Spektrum (Abb. 16b) erkennt man das Chiralitätszentrum C-3 des Morpholins als positives Signal bei 59,4 ppm, die Methylgruppe des Propylsubstituenten liegt bei 14,5 ppm.

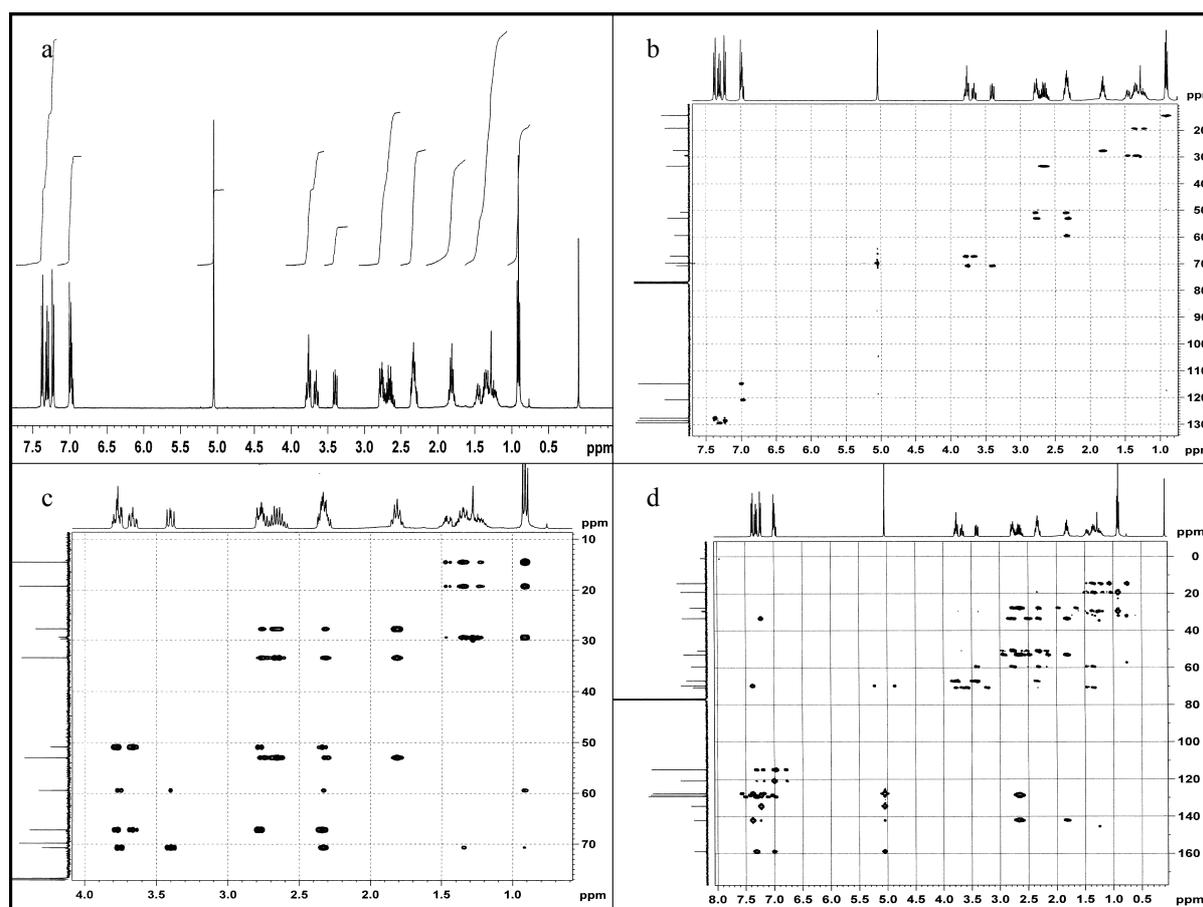


Abb. 16: NMR-Spektren von O/W13 I a) ^1H -NMR, b) HSQCDEPT, c) TOCSY, d) HMBC

Die Integration aller Protonen im ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz, Abb. 16a) unter Bezug auf das Singulett der Methylengruppe der Etherbrücke zwischen den Aromaten bei 5,05 ppm zeigt 31 Wasserstoffatome für das Molekül an. Die Auswertung des Spektrums wird dadurch erschwert, dass aufgrund der Einführung des Chiralitätszentrums am C-3 des Morpholins sechs diastereotopie Methylengruppen (C-2, C-5, C-6 des Morpholins, C-1 der Zwischenkette, C-1 und C-2 des Propylsubstituenten) erzeugt werden, deren Signale sich mehr oder weniger stark überlagern. So ist z.B. das über die C,H-Korrelation (Abb. 16b

HSQCDEPT) identifizierte Proton am Chiralitätszentrum am hochfeldseitigen Ende des Multipletts bei 2,30 ppm von zwei weiteren Signalen überdeckt. Im C,H-COSY läßt sich das C-Atom der Ethermethylengruppe dem Signal bei 69,8 ppm zuordnen. Die Signalgruppe der Methylenprotonen am C-3 der Zwischenkette zeigt sich als Multiplett (2 H) bei 2,64 ppm über den Crosspeak mit den sicher zugeordneten Protonen an C-2 und C-6 des endo-Rings bei 7,23 ppm. Das zweite Crosspeaksignal zu 2,64 ppm bei 1,81 ppm (Pentett, 2 H) gehört dann offensichtlich zu den Methylenprotonen am C-2 der Zwischenkette mit dem zugehörigen ^{13}C -Signal bei 27,7 ppm. Die Signalgruppe bei 1,81 ppm zeigt wiederum Kopplungssignale im NOESY- und H,H-COSY-Spektrum (Abb. 17) zu den mittleren Bereichen der Multipletts bei 2,75 und 2,34 ppm, was auf die diastereotopen Methylenprotonen am C-1 der Zwischenkette mit dem dazugehörigen ^{13}C -Signal bei 53,0 ppm hinweist. Im TOCSY-Spektrum (Abb. 16c) zeigt die Methylgruppe des Propylsubstituenten (Triplet, 3 H) u.a. Kopplungssignale zum ^{13}C -Signal bei 70,7 ppm, was den einzigen Schluß auf die Signalzugehörigkeit zum C-2 des Morpholins zulässt. Mit diesem Befund lassen sich im HSQCDEPT (Abb. 16b) die dazugehörigen Methylenprotonen dem hochfeldseitigen Bereich des Multipletts 3,74 ppm (1 H) und dem Dublett/Dublett (1 H, AMX-Kopplung) bei 3,40 ppm zuweisen. Demzufolge muß der tieffeldseitige Bereich des Multipletts (1 H) bei 3,77 ppm und das Dublett/Triplett (1 H, AMX₂-Kopplung) bei 3,66 ppm mit dem ^{13}C -Signal bei 67,2 ppm zum C-6 des Morpholins gehören. Die ^1H -NMR-Signale im tieffeldseitigen Bereich der Multipletts bei 2,77 (1 H) und bei 2,35 (1 H) ppm können damit zusammen mit dem ^{13}C -Signal bei 50,9 ppm der Methylengruppe C-5 des Morpholins zugewiesen werden, was auch die Crosspeaks im NOESY-, H,H-COSY- sowie die Korrelationen im HMBC- und TOCSY-Spektrum bestätigen.

Die vier verbleibenden Protonensignale der Methylengruppen C-1 und C-2 des Propylsubstituenten erscheinen als breitgezogenes Multiplett zwischen 1,25 und 1,46 ppm. Nur die Protonen am C-1 des Propylsubstituenten sind dem Chiralitätszentrum nahe genug, um im NOESY-Spektrum einen Crosspeak zu erzeugen. Deshalb muß der tieffeldseitige Bereich der Signalgruppe bei 1,44 ppm einem Proton an diesem C-Atom zugeordnet werden. Aus der C,H-Korrelation folgt damit, dass das ^{13}C -Signal bei 29,4 ppm das C-1 und zwangsläufig das Signal bei 19,3 ppm das C-2 des Propylsubstituenten darstellen.

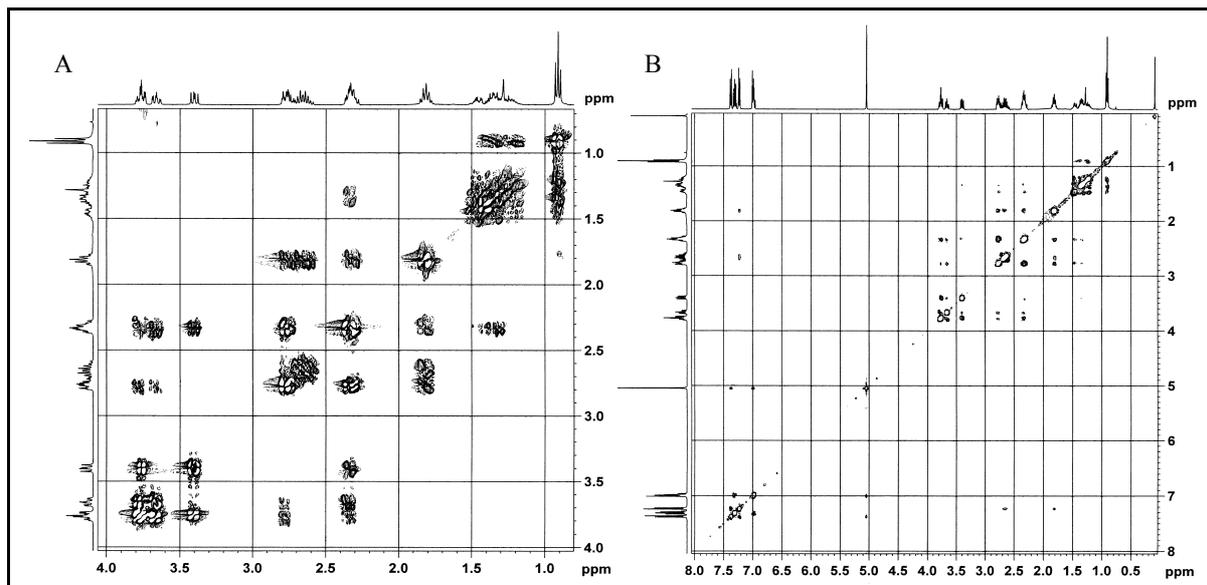


Abb. 17: NMR-Spektren von O/W13 II A) H,H-COSY (Ausschnitt mit den Signalen der Zwischenkette und des Heterocyclus), B) NOESY (komplettes Spektrum)

Ebenso wird klar, dass sich die ^1H -Signale des zweiten Protons am C-1 und ein Proton des C-2 im mittleren Bereich des Multipletts bei 1,35 ppm überlagern und dass die Linien am hochfeldseitigen Rand der Signalgruppe bei 1,25 ppm vom zweiten Proton am C-2 des Propylsubstituenten herrühren. Die Befunde aus dem H,H-COSY-, NOESY-, TOCSY- und HMBC-Experiment (Abb. 16d) bestätigen diese Zuordnung.

c) Chirale Fomocaine mit Diethanolamingrundstruktur (O/W12)

Zur Beschreibung der Signallagen und deren Zuordnung zu den entsprechenden Protonen bzw. Kohlenstoffatomen wurde eine vereinfachte Zählweise (Abb. 18) verwendet.

Die Lagen der ^1H - und ^{13}C -Signale der Verbindung im Aromatenbereich sind mit denen der oben beschriebenen Spektren praktisch identisch, dass auf ihre Zuordnung nicht mehr eingegangen werden muss.

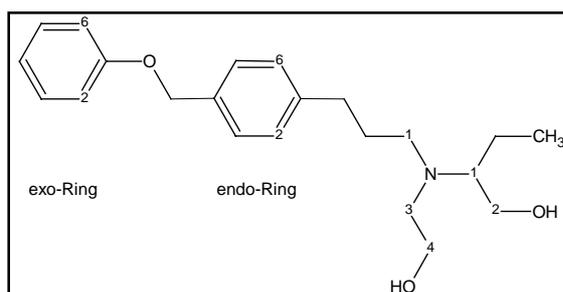


Abb. 18: Zählweise der Atome in O/W12 zur NMR-Auswertung; jeder Cyclus wird für sich gezählt, aliphatische Ketten von ihrer Verknüpfung zum Heteroatom aus

Im ^{13}C -Spektrum der Verbindung (100 MHz, o. Abb.) sind 18 Signale für die insgesamt 22 Kohlenstoffatome des Moleküls zu erkennen. Die Integration aller Protonen im ^1H -Spektrum (400 MHz, Abb. 19a) ergibt mit dem Singulett (2H) der Ethermethylengruppe bei 5,05 ppm als Basis 29 Protonen sowie eine Andeutung einer breiten OH-Bande um 3 ppm, die durch die alkoholischen Funktionen verursacht wurde. Die Signale von sieben Protonen liegen in einem breiten Multipllett zwischen 2,58 und 2,83 ppm praktisch übereinander, was die Auswertung des Spektrums zusätzlich zu den eingangs erwähnten diastereotopen Signalaufspaltungen erschwert. Im DEPT-Spektrum (Abb. 19b) zeigen sich die Methylgruppe bei 11,8 ppm sowie das Chiralitätszentrum bei 63,9 ppm. Aus dem C,H-COSY-Spektrum (Abb. 19c) kann deshalb das Signal des Protons am chiralen C-Atom dem Bereich um 2,75 ppm im ^1H -Spektrum zugeordnet werden.

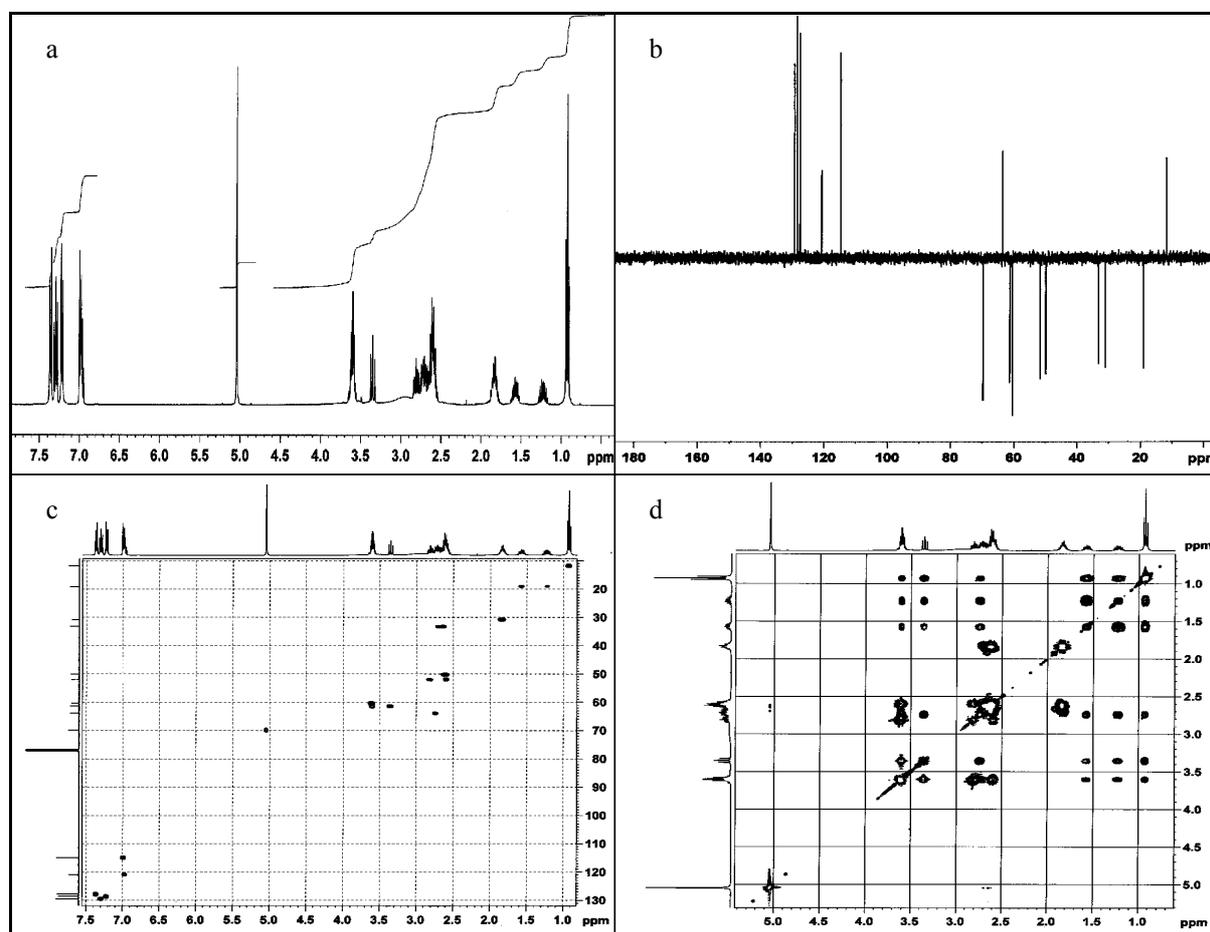


Abb. 19: NMR-Spektren von O/W12 I a) ^1H -NMR (400 MHz), b) DEPT, c) C,H-COSY, d) TOCSY

Das Methylgruppensignal bei 0,93 ppm zeigt im H,H-COSY-Spektrum (Abb. 20A) Cross-peaks zu den Multipletts bei 1,24 und 1,57 ppm, die damit zu den diastereotopen Protonen der

Methylengruppe des Ethylsubstituenten gehören. Ebenfalls aus dem H,H-COSY- und dem TOCSY-Spektrum (Abb. 19d) gelingt die Zuordnung der Methylengruppen neben den Hydroxylfunktionen. Die in Nachbarschaft zum Chiralitätszentrum liegende Gruppe „2“ ist deutlich diastereotop aufgespalten. Ein Proton erzeugt ein isoliertes Triplett bei 3,35 ppm, das zweite Signal liegt unter dem nicht aufgespaltenen Multipllett der beiden Protonen der Gruppe „4“. Die zugehörigen ^{13}C -Signale im C,H-COSY-Spektrum liegen dann bei 61,4 („2“) und 60,4 („4“) ppm. In der breiten Signalgruppe zwischen 2,58 und 2,83 ppm liegen eine weitere stark diastereotop (2,61 und 2,83 ppm) aufgespaltene Gruppe sowie zwei weniger deutlich verbreiterte Methylengruppen. Die aufgespaltenen Protonen erzeugen im H,H-COSY-Spektrum starke Crosspeaks mit den vorher als Methylengruppe „2“ identifizierten Protonen und müssen somit der Methylengruppe „3“ mit dem ^{13}C -Signal bei 51,9 ppm zugeordnet werden. Das C-1 der Zwischenkette gibt ein ^{13}C -Signale bei 50,1 ppm, dem über die C,H-Korrelation ein CH_2 -Signal um 2,62 ppm im ^1H -Spektrum zuzuweisen ist. Die Unterscheidung zwischen dem C-2 und dem C-3 der Zwischenkette gelingt über die Protonensignale im NOESY- (Abb. 20B) und im TOCSY-Spektrum (Abb. 19d).

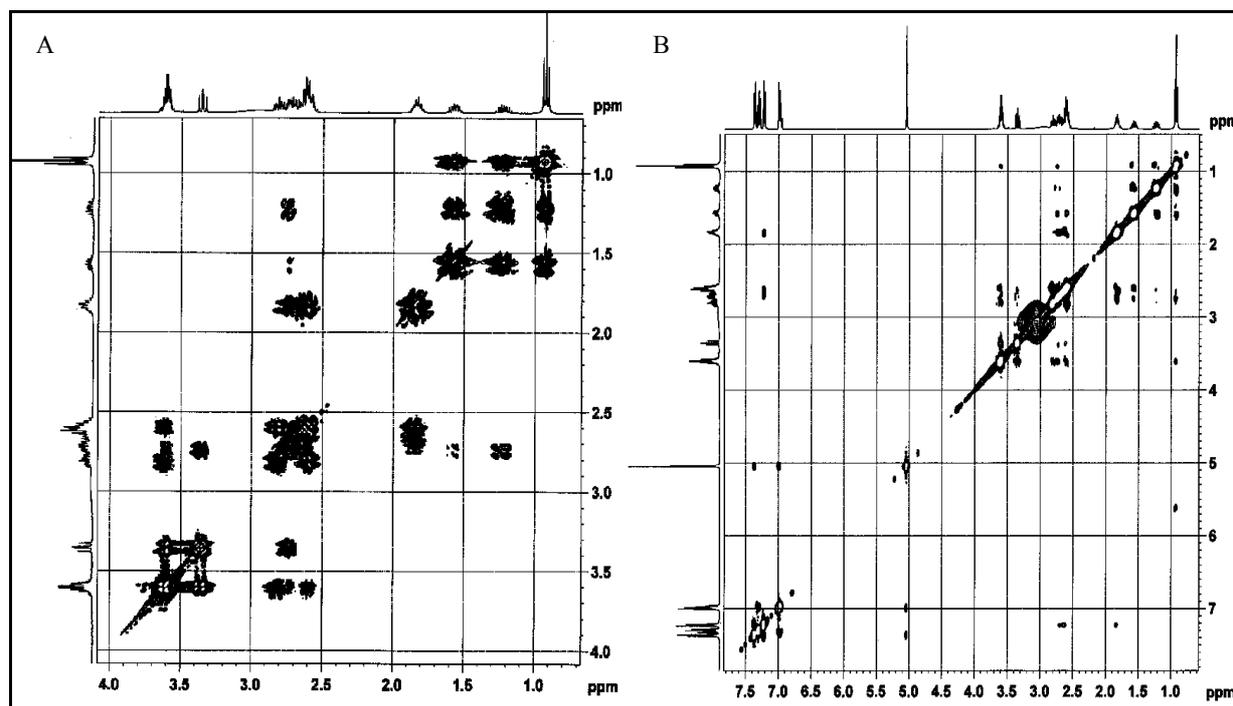


Abb. 20: NMR-Spektren von O/W12 II A) H,H-COSY Aliphaten, B) NOESY komplett

Die Crosspeaks zwischen den Methylenprotonen der Etherbrücke und der Signalgruppe um 2,6 ppm im TOCSY- sowie die Kopplung zwischen den Protonen am C-2 und C-6 des endo-Rings mit dieser Signalgruppe im NOESY-Spektrum identifizieren das Signal als zu den

Protonen am C-3 der Zwischenkette gehörig. Demzufolge muss dann das Multipllett bei 1,84 ppm im ^1H -Spektrum von den Methylenprotonen am C-2 der Zwischenkette verursacht worden sein. Die entsprechenden Kohlenstoffsignale finden sich dann bei 33,4 (C-3) bzw. 30,8 (C-2) ppm.

3.1.2.3. UV-Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie ist zur strukturellen Charakterisierung der Zielverbindungen wenig aussagekräftig. Die Verbindungen O/W1 bis 16 tragen alle den selben Chromophor, was ihre UV-Spektren praktisch kongruent werden lässt. Mithilfe der UV-Spektroskopie konnte jedoch die Messwellenlänge für die UV-Detektion bei den folgenden HPLC-Untersuchungen festgelegt werden. Alle Spektren weisen ein Maximum bei 221 nm auf. Ein deutlich geringeres Absorptionsmaximum liegt bei 271 nm mit einer schwach ausgeprägten Schulter bei 278 nm. In Tabelle 5 sind die UV-spektroskopischen Daten der Substanzen O/W1 bis 16 (Hydrochloride in MeOH) mit ihren spezifischen Absorptionen bei den charakteristischen Wellenlängen zusammengefasst.

Verbindung	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 221	ϵ 221	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 271	ϵ 271	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 278	ϵ 278
O/W1	2223	80464	190	6881	137	4959
O/W3	2172	81663	198	7461	146	5497
O/W5	2063	80461	180	7031	131	5105
O/W7	2014	81376	180	7260	131	5276
O/W9	2255	81603	208	7524	154	5569
O/W11	2225	83650	204	7659	151	5662
O/W13	2079	81085	153	5964	102	3990
O/W15	2098	81807	171	6680	126	4923
O/W2	2205	83789	227	8618	179	6811
O/W4	2073	81670	202	7944	156	6136
O/W6	1987	81081	192	7837	148	6046
O/W8	1935	81636	187	7902	145	6114
O/W10	2206	83814	227	8637	183	6967
O/W12	2069	81526	203	7991	159	6277
O/W14	1874	76470	194	7911	154	6270
O/W16	1855	75692	182	7430	141	5769

Tabelle 5: spez. Absorptionen $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ und molare Absorptionskoeffizienten ϵ der O/W-Verbindungen ($c = 4$ mg des Hydrochlorids/25,0 ml MeOH, 1:10 verdünnt)

Die molaren Absorptionskoeffizienten für das Hauptmaximum bei 221 nm sind für alle Substanzen praktisch gleich. Die spezifischen Absorptionen sinken naturgemäß mit steigenden Molmassen. Die geringen Unterschiede in den Absorptionskoeffizienten des zweiten Maximums und seiner Schulter eignen sich nicht zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Verbindungen.

3.1.2.4. Chromatographische Reinheitsuntersuchungen, Elementaranalysen

Alle synthetisierten C-Alkylmorpholine wurden gaschromatographisch mit FI-Detektion oder EI-MS-Detektion auf ihre Reinheit überprüft. Mit Werten von > 98 % der Peakflächen wurde für alle Verbindungen eine für einen weiteren Einsatz in der Synthese ausreichende Reinheit nachgewiesen.

Die chromatographische Reinheit der Fomocaine und Oe7000-Derivate konnte im Zuge des Screenings auf geeignete HPLC-Bedingungen zur Racemattrennung (s. 2.2.1.) nachgewiesen werden. Die Summe der detektierten Peakflächen der Enantiomere der Basen machte für jede Verbindung auf jeder CSP mehr als 99 % der Peakflächen aus, bei den Fomocainen sogar > 99,5 %.

Mit den Hydrochloriden der Verbindungen O/W1 bis 16 wurden Elementaranalysen (C, H, N) durchgeführt. Es konnte damit die molekulare Zusammensetzung und die hohe Reinheit der Substanzen für die pharmakologische Prüfung bestätigt werden.

3.1.3 Bestimmung der physikochemischen Parameter der O/W-Substanzen

Die protonierte Form eines basischen LA (BH^+) wird - wie eingangs ausgeführt - als Träger der Hauptwirkung in der Na^+ -Kanalblockade angesehen. Die am Wirkort vorliegende Anzahl an protonierten LA-Molekülen ist also neben dem Ausmaß der Affinität zum Bindungsareal ein wirksamkeitsbestimmender Faktor. Daher war es unerlässlich, die physikochemischen Parameter der synthetisierten Verbindungen, die das pharmakokinetische Verhalten der Moleküle bei ihrem Transport zum Na^+ -Kanal beeinflussen, zu ermitteln.

Aus dem **pK_s-Wert** lässt sich über die Henderson-Hasselbalch-Beziehung der Ionisationsgrad einer schwachen Base oder Säure bei dem physiologischen pH-Wert des Plasmas von 7,40 berechnen. Problematisch bei der Bestimmung der Säurekonstanten der O/W-Verbindungen

war die geringe Wasserlöslichkeit der freien Basen. Aufbauend auf den Ergebnissen von Glassl [75] wurde eine Titrationsmethode im wässrigen Milieu angewandt, bei der die freie Base erst um den Halbneutralisationspunkt auszufallen beginnt und sich so dem Gleichgewicht entzieht. Dazu wurden 10^{-3} molare Lösungen der Hydrochloride mit 0,01-M NaOH schrittweise titriert. Nach jeder Inkrementzugabe wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und zu jedem Titrationsgrad der pK_s -Wert berechnet. Die Säurekonstante der Verbindung wurde dann aus den arithmetischen Mittelwerten der Berechnungen zwischen Titrationsgrad 0,1 und 0,5 ermittelt ($n = 3$). Zur Überprüfung der Methode wurde Fomocain-HCl als verwandte Substanz mitgeführt.

Unter dem **Trübungs-pH** einer Substanz versteht man den pH-Wert, bei dem die erste bleibende Trübung einer Lösung durch ausfallende freie Base auftritt. Er ist abhängig vom pK_s -Wert der Verbindung, ihrer Wasserlöslichkeit bei gegebener Temperatur, ihrer Konzentration und der Ionenstärke der Lösung [94]. Aus dem Trübungs-pH-Wert lässt sich bei Kenntnis des pK_s -Wertes einer Verbindung ihre **Wasserlöslichkeit** abschätzen und damit auch die erreichbaren Konzentrationen an freier LA-Base in physiologischen Flüssigkeiten. Die Trübungs-pH-Werte der O/W-Verbindungen wurden durch Titration ihrer Hydrochloride in $0,25$ bis $0,5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösungen in 0,1-M KCl nach der von Glassl [75] modifizierten Methode von Büchi und Perlia [95] mit 0,01-M NaOH und Rücktitration mit 0,01-M HCl unter standardisierten Bedingungen bestimmt.

Der **Verteilungskoeffizient P** (Partition Coefficient) definiert das Konzentrationsverhältnis im Gleichgewicht der Verteilung einer Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Zur Abschätzung des Verhaltens von Substanzen bei der Diffusion durch Biomembranen und der Verteilung in Körpergeweben dient der n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient. Die zeitaufwändige Bestimmung von **P** durch Ausschütteln und Gehaltsbestimmung der Substanz in beiden Phasen wurde durch eine etablierte HPLC-Methode abgelöst [96, 97, 98]. Unter Ausschluss von Adsorptionsvorgängen wird in der Umkehrphasenchromatographie der Kapazitätsfaktor k' einer Verbindung nur von dem sich einstellenden Verteilungsgleichgewicht zwischen der stationären RP-18 Phase und der mobilen Phase (Methanol-Puffergemisch) bestimmt. Zwischen dem dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (**lgP**) und $\lg k'$ besteht ein linearer Zusammenhang. Mit sechs LA, deren **lgP**-Werte aus der Literatur entnommen wurden [99, 100] und Thioharnstoff zur Bestimmung der Totzeit wurde das System kalibriert und aus der erhaltenen Kalibriergerade ($\lg P = f(\lg k')$, $R^2 = 0,9792$) die **lgP**-Werte der O/W-Verbindungen über ihre unter den selben Bedingungen ermittelten Kapazitätsfaktoren berechnet. Der Verteilungskoeffizient **P**

beschreibt nur das Verhalten von ungeladenen Substanzen bzw. des nicht ionisierten Anteils von Säuren oder Basen. Für pH-abhängig ionisierbare Substanzen wurde daher der **Distribution Coefficient D** eingeführt, der das Verteilungsverhalten des ungeladenen Anteils einer sauren oder basischen Verbindung bei einem bestimmten pH-Wert beschreibt. In Tabelle 6 sind die ermittelten Werte für die physikochemischen Parameter der O/W-Verbindungen zusammengefasst.

Code	pK _s	% BH ⁺ (pH 7,4)	Trübungs-pH	L _B [mmol/l]	lgP	lgD (pH 7,4)
O/W1	7,24	40,9	6,82	0,1747	3,94	3,71
O/W3	6,96	26,6	6,18	0,0712	4,12	3,99
O/W5	6,28	7,1	6,03	0,0900*	4,47	4,44
O/W7	5,62	1,6	5,49	0,1064*	4,80	4,79
O/W9	7,55	58,5	7,04	0,1180	3,81	3,43
O/W11	7,12	34,4	6,55	0,1064	4,00	3,82
O/W13	6,71	17,0	6,13	0,1724	4,28	4,20
O/W15	6,55	12,4	6,00	0,1099	4,20	4,14
Fomocain	7,27	42,6	7,09	0,1989	3,85	3,62
O/W2	8,35	89,9	8,73	0,3529	2,94	1,92
O/W4	8,54	93,2	8,40	0,2101	3,08	1,91
O/W6	8,32	89,3	7,58	0,1449	3,27	2,30
O/W8	7,88	75,1	7,25	0,0949	3,53	2,93
O/W10	8,74	95,6	8,59	0,2073	3,06	1,70
O/W12	8,51	92,8	7,91	0,1004	3,12	1,98
O/W14	7,69	66,1	6,79	0,0559	3,81	3,34
O/W16	7,70	66,6	7,20	0,1201	3,29	2,81
Oe7000 [99]	8,55	93,4	8,97	0,3985	2,77	1,59

Tabelle 6: Physikochemische Parameter der O/W-Verbindungen, (* bestimmt mit c = 0,25 mmol/l)

Es wird deutlich, dass mit wachsender Kettenlänge des Substituenten am Chiralitätszentrum die pK_s-Werte innerhalb einer homologen Reihe kleiner werden, die Basizität des tertiären Stickstoffes also sinkt. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass der Alkylsubstituent mit wachsender Größe das basische Zentrum immer stärker räumlich abschirmt und so den Angriff eines Protons am Stickstoff erschwert. Eine direkte Folge der verminderten Basizität ist das sich für eine lokalanästhetische Wirkung der chiralen Fomocaine deutlich verschlechternde Verhältnis von protonierter zu nicht protonierter Form bei größer werdenden Substituenten. Mit wachsender Molmasse der Verbindungen wird auch die ohnehin schon geringe Wasserlöslichkeit des Fomocain weiter verringert. Dadurch ergeben sich für die chiralen Fomocaine die gleichen Probleme in der Herstellung einer stabile flüssigen Zubereitung in den für vorgesehenen pharmakologischen Untersuchungen sinnvollen Konzentrationen (bis

5 % m/V) wie für die Muttersubstanz [99]. Die **lgP**-Werte der chiralen Fomocaine sind ein Maß für ihre Lipophilie, was im Organismus zu einer verstärkten Anreicherung in lipophilen Kompartimenten sowie zu einer erhöhten Neigung zu Plasma- und Gewebeproteinbindung führen kann. So wurde für die Verbindungen O/W3 und O/W13 mit Werten von > 99,5 % eine nahezu vollständige Bindung an humane Plasmaproteine gefunden. Die Alkylsubstitution am Morpholinring des Fomocain führte also anhand der experimentell bestimmten physikochemischen Konstanten eher zu einer Verschlechterung der zu erwartenden pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungen, was bei der Auswertung der pharmakologischen Daten zu beachten war.

Die chiralen Derivate von Oe7000 wiesen bei immer noch mäßiger Wasserlöslichkeit durchgehend günstigere physikochemische Eigenschaften auf. Die Wasserlöslichkeit der Basen wurde durch das Vorliegen zweier alkoholischer Funktionen etwa um den Faktor 2 bis 2,5 im Vergleich zum heterocyclischen Analogon erhöht. Die pK_s -Werte wurden um mindestens eine Einheit erhöht, was mit höheren Ionisationsgraden bei physiologischem pH einherging. Bei den Molekülen mit Diethanolamingrundstruktur ist die Fixierung des Stickstoffatoms im Ringsystem aufgehoben, was offensichtlich die Positionierung des basischen Zentrums für einen sauren Angriff begünstigt. Die Verteilungskoeffizienten sind für **P** um den Faktor 10, für **D** bei pH 7,4 sogar um den Faktor 100 zugunsten der hydrophilen Phase verschoben, was geringere Proteinbindungsraten erwarten lässt, wie es beim Vergleich von Oe7000 mit Fomocain bereits bestätigt werden konnte [99].

3.2. Racemattrennung der O/W-Verbindungen und der chiralen Morpholine

3.2.1. Analytische Racemattrennung durch HPLC

3.2.1.1. Chirale stationäre Phasen für die HPLC

Mit der Entwicklung neuer chiraler stationärer Phasen (CSP) für die HPLC wurde es möglich, schnell und sicher im Vergleich zu anderen Methoden (Polarimetrie, NMR, Chromatographie nach Derivatisierung) Wirkstoffe auf ihre Enantiomerenreinheit zu prüfen und Verfahren zur präparativen Racemattrennung zu entwickeln. Die CSP können in zwei große Gruppen unterschieden werden. Auf der einen Seite stehen Phasen mit auf einem Träger immobilisierten kleinen chiralen Molekülen als Selektoren, die so genannten „Bürsten“- (brush) oder Pirkle-

CSP. Die zweite Gruppe umfasst chirale synthetische (z.B. Polyacrylamide, Polymethacrylate) und halbsynthetische (modifizierte Polysaccharide) sowie natürliche (z.B. Proteine) Polymere auf einer Trägermatrix (Abb. 21) [73]. Daneben existieren auch Phasen für spezielle Anwendungen, bei denen in Polymergelen durch Prägung mit chiralen Molekülen chirale Hohlräume geschaffen werden [101, 102].

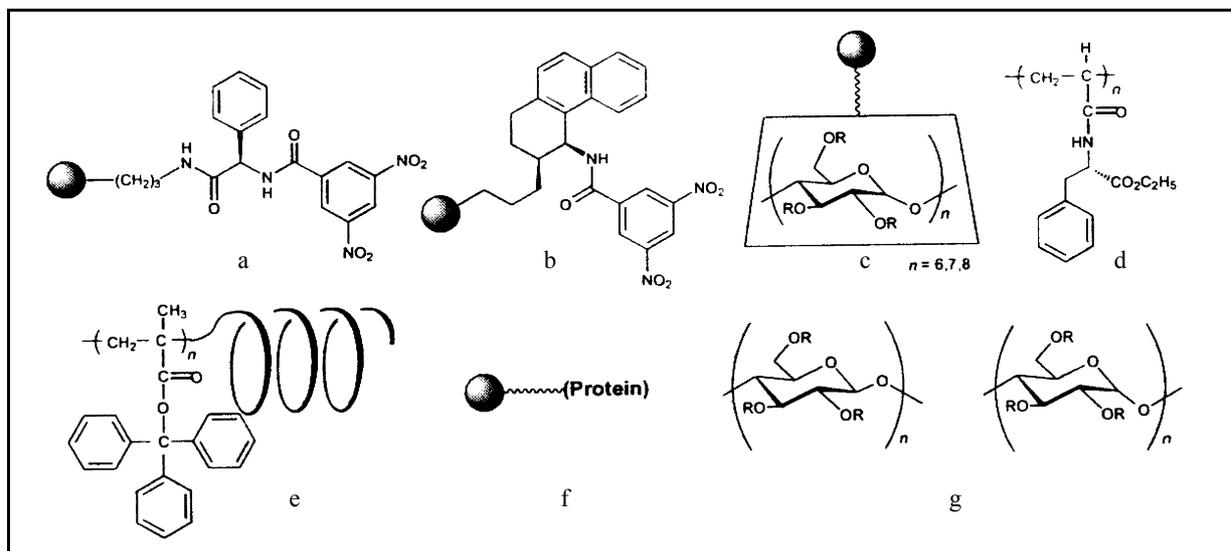
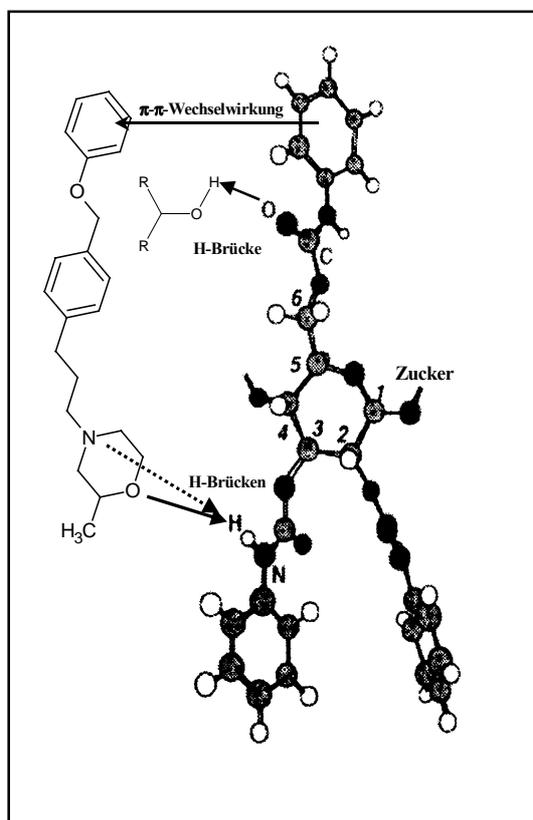


Abb. 21: Strukturen einiger ausgewählter CSP: a-c) „Bürsten“-Phasen auf Kieselgel, d) chirale Polyacrylamide, e) chirale helicale Polymethacrylate, f) Proteine auf Kieselgel, g) Polysaccharidderivate (aus [73])

Das Prinzip der Racemattrennung beruht auf unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Enantiomere mit den chiralen Zentren der CSP. Die Mechanismen, die an CSP zu einer Racemattrennung führen, sind noch nicht endgültig geklärt und differieren zudem zwischen den verschiedenen CSP und Analyten. Diskutiert werden u.a. Einschlüsse in chirale Kavitäten, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe, π - π - und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Enantiomere mit der CSP. An einer für das jeweilige Trennproblem geeigneten CSP ist dann ein Enantiomer, bedingt durch die räumliche Ausrichtung der Substituenten am Chiralitätszentrum, zu stärkeren Interaktionen und/oder Interaktionen über mehr Punkte als das andere Enantiomer in der Lage und wird somit später von der Säule eluiert. Je größer die Differenz der Gibbs-Energien ($\Delta\Delta G^*$) in der Interaktion ist, desto größer wird nach Gleichung (1) die Selektivität k_α der Trennung [73].

$$\Delta\Delta G^* = -RT \ln k_\alpha \quad (1)$$

Etwa 80 % aller chiralen Trennprobleme lassen sich an einer Chiralcel[®] OD- [Cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)] oder OJ- [Cellulose-tris(4-methylbenzoat)] bzw. einer Chiralpak[®] AD- [Amylose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)] oder AS-Phase (Amylose-tris[(S)- α -methyl-benzylcarbamate]) lösen, allein 60 % an Chiralcel[®] OD oder Chiralpak[®] AD [103]. Die chiralen Polymere werden zur Herstellung einer HPLC-Säule auf einer Kieselgelschicht aufgetragen, wo sie wie im Falle der Phenylcarbamate als flüssigkristalliner Film die Matrixpartikel überziehen [104, 105]. Als Hauptmechanismus der chiralen Erkennung wird für diese CSP-Klasse die Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Carbamoyl-Carbonylsauerstoff als H-Akzeptor und dem Carbamoyl-NH als H-Donator angesehen [73]. Dabei hat die Substitution am Phenylrest Einfluss auf die Polarität der Carbamoylreste und damit auf das Trennvermögen des chiralen Selektors. So erniedrigen z.B. elektronenschiebende Substituenten am Phenylring die Acidität am Carbamoyl-NH und führen zu einer schwächeren Adsorption von Molekülen, die als H-Akzeptor agieren. In NMR-Studien mit Cellulose-tris(phenylcarbamaten) in Lösungen mit verschiedenen Racematen konnten stereoselektive Verschiebungen von Signalen solcher Protonen, die an der Ausbildung von H-Brücken beteiligt sind, nachgewiesen und mit den Daten aus der chromatographischen Racemattrennung korreliert werden [105, 106, 107]. Neben der Interaktion der Analyten mit der CSP über H-Brücken tragen in untergeordnetem Maß außerdem noch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über die Carbonylgruppe und π - π -Wechselwirkungen über den Aromaten zur chiralen Erkennung durch Phenylcarbamatephasen



bei [73]. Abb. 22 illustriert die Ausbildung von H-Brücken zwischen einem Cellulose-tris(phenylcarbamate) und geeigneten Strukturen. Beim Einsatz eines Alkohols als Bestandteil der mobilen Phase ist auch aufgrund dieser Befunde die mögliche Konkurrenz der Alkoholkomponente mit den Analyten um die H-Brückenbildung in die Suche nach geeigneten Trennbedingungen mit einzu beziehen [56].

Abb. 22: Interaktionsmöglichkeiten eines chiralen Fomocainderivates mit einer Cellulose-tris(phenyl-carbamate)-Einheit am Beispiel von O/W1 und eines Alkohols als Bestandteil der mobilen Phase; (nicht maßstabsgerecht) nach [73]

Nicht nur die eingesetzte Konzentration und damit die Polarität der mobilen Phase sondern auch die Struktur des Alkohols (primär, sekundär oder tertiär, linear oder verzweigt) wirkt sich demzufolge auf das Trennergebnis aus.

3.2.1.2 Analytische Racemattrennung durch HPLC an drei verschiedenen CSP

Unabhängig davon, welche Substanzen sich aus den pharmakologischen Untersuchungen als Kandidaten für eine präparative Racemattrennung herausstellen sollten, wurde für jede der synthetisierten chiralen Zielverbindungen einschließlich der Morpholine eine analytische Methode benötigt, mit der der Erfolg einer präparativen Trennung überprüft werden konnte. Zur Auswahl einer geeigneten CSP gibt der Hersteller Daicel (Daicel Chemical Industries, Tokio) grob orientierende Richtlinien an, die sich aus strukturellen Merkmalen der zu trennenden Verbindung ableiten [103]. Die strukturellen Merkmale sowie die relativ hohe Lipophilie und geringe Ionisationstendenz der chiralen Fomocaine und Oe7000-Derivate lenkten die Wahl auf die Normalphasensäulen Chiralcel[®] OD sowie Chiralpak[®] AD und AS. Abb. 23 zeigt die Strukturen der Polymere, die zur Herstellung der genannten CSP auf eine Kieselgelmatrix aufgetragen werden.

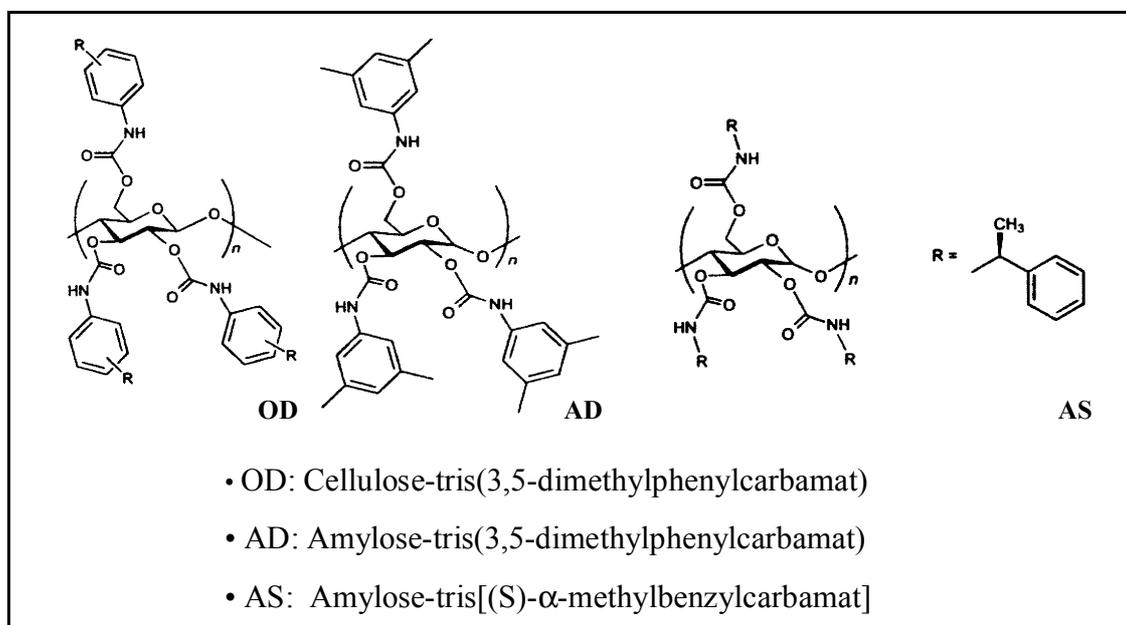


Abb. 23: Strukturen der Polymere zur Herstellung der CSP Chiralcel[®] OD sowie Chiralpak[®] AD und AS

Morpholin und seine C-Alkylderivate verfügen mit einem Absorptionsmaximum von etwa 205 nm über keinen Chromophor, der eine UV-Detektion in der HPLC ermöglichen würde. Durch Umsetzung der Morpholine mit Benzoylchlorid zu den entsprechenden Benzamiden NBM1 bis 8 konnte einerseits ein zusätzliches Strukturmerkmal, das eine Racemattrennung an den ausgewählten CSP ermöglichte, eingeführt werden, andererseits wurde eine UV-aktive Verbindung erhalten, die problemlos bei 220 nm detektiert werden konnte.

Für die Optimierung der Trennungen im Hinblick auf die Möglichkeit einer präparativen chromatographischen Racemattrennung an der im Arbeitskreis vorhandenen Anlage wurden Zielparameter definiert, die es in Anlehnung an Erfahrungen mit Arbeiten an anderen Trennproblemen an der präparativen Chiralcel[®] OD-Säule [108, 109, 110, 111] zu erreichen galt, um die Methode sicher vom analytischen in den präparativen Maßstab übertragen zu können. Die Forderungen zielten auf eine minimale Analysenlaufzeit bei maximaler Selektivität der Trennung. Empirisch wurden eine maximale Retentionszeit von 40 min für das zuletzt eluierte Enantiomer und eine mindestens zu erreichende Selektivität k_α von 1,40 festgelegt, was es durch Modifizierungen von mobiler Phase, Flussrate und Säulentemperatur innerhalb der vom Säulenhersteller empfohlenen Grenzen [112] zu erreichen galt. Für die ausschließlich analytische Verwendung der Methoden sollte Basislinientrennung der Enantiomere mit Werten für die Auflösung R_s der Peaks von 1,20 und besser innerhalb von maximal 45 min ausreichen. Die generelle Vorgehensweise bei der Suche nach geeigneten Chromatographiebedingungen wurde anhand der Herstellerempfehlungen [103] und der von Kirkland [113] vorgeschlagenen Strategie zur Optimierung von Racemattrennungen an einer Chiralcel[®] OD Phase gestaltet. Das Screening wurde unter Standardbedingungen mit allen verfügbaren Racematen durchgeführt. Beim Auffinden geeigneter Chromatographieparameter wurden die Trennbedingungen für das jeweilige Racemat individuell angepasst. Abb. 24 zeigt schematisch die angewandte Optimierungsstrategie für die Trennungen an den drei ausgewählten CSP auf.

Auf den Einsatz basischer Hilfsstoffe wie Diethyl- oder Diisopropylamin zur Schärfung der Peaks der basischen Verbindungen wurde bewusst verzichtet, da diese Amine in den Fließmitteln mit geringen Alkoholkonzentrationen in den erforderlichen Konzentrationen von bis zu 0,1 % (V/V) nicht löslich gewesen wären und außerdem zur Schonung der teuren stationären Phase bei einer eventuell durchzuführenden präparativen Trennung nicht zum Einsatz kommen durften. Die Variation der Flussrate beeinflusste ausschließlich die Retentionszeiten der Enantiomere, nicht aber Selektivität und Peakauflösung der Trennungen.

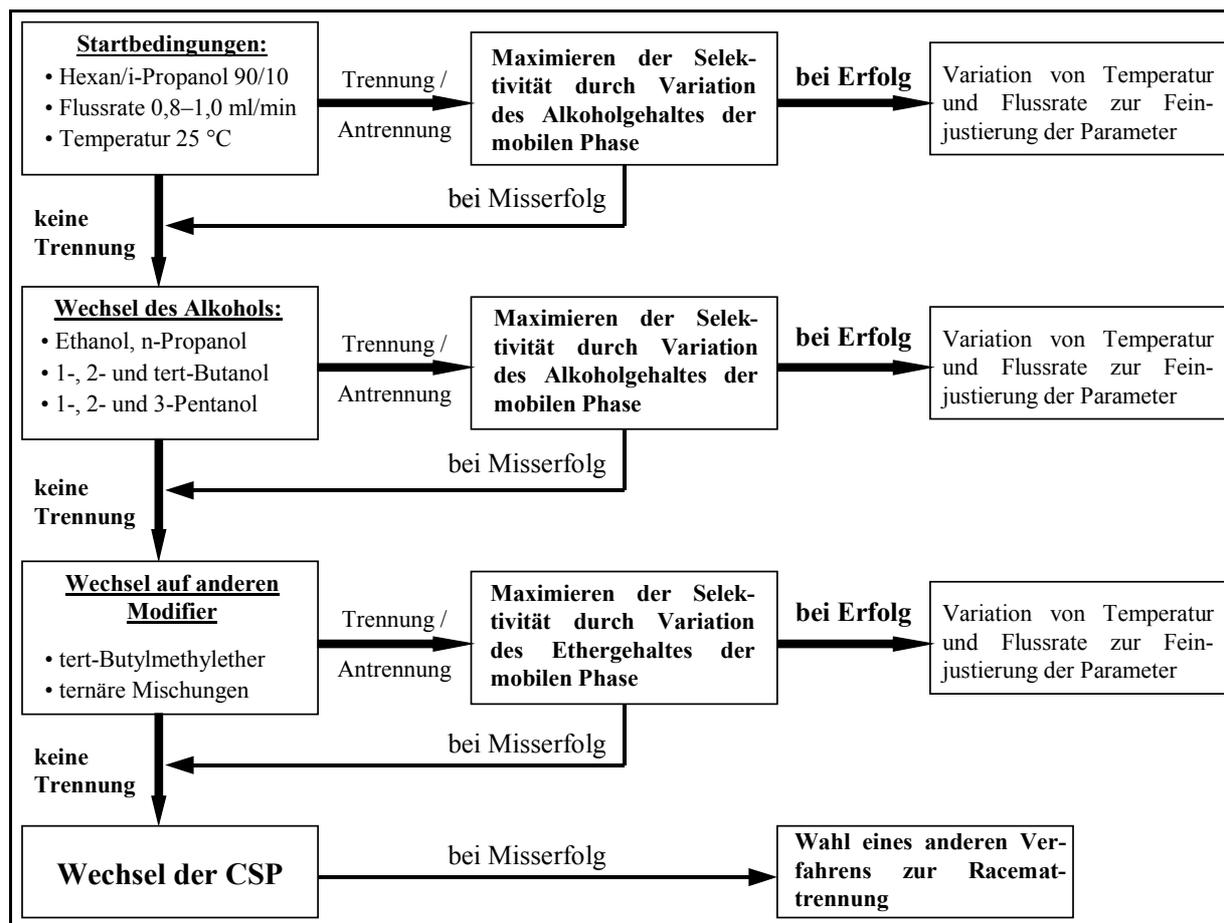


Abb. 24: Strategie zur Optimierung der Chromatographieparameter zur Racemat-trennung der O/W- und der NBM-Verbindungen an den CSP Chiralcel[®] OD sowie Chiralpak[®] AD und AS

Mit der Veränderung der Säulentemperatur zur Feineinstellung der Chromatographieparameter wurde durch Temperaturerhöhung bei allen Verbindungen eine Verringerung der Retentionszeiten bei gleichzeitiger leichter Verschlechterung der Selektivität der Trennungen festgestellt. Im untersuchten Temperaturbereich zwischen 15 °C und 35 °C sank k_a linear mit steigender Temperatur. Als positiver Nebeneffekt der Temperaturerhöhung konnte generell eine Verbesserung der Peakschärfe beobachtet werden. Für die Festlegung der bei der Racemattrennung angelegten Säulentemperatur musste demzufolge ein Kompromiss zwischen hoher Selektivität und geringerer Bandenbreite gefunden werden, was besonders bei den Trennungen im präparativen Maßstab ins Gewicht fiel.

a) Chromatographische Racemattrennung an der Chiralcel[®] OD-Phase

Das Hauptaugenmerk bei den durchgeführten Versuchen lag auf der Suche nach Chromatographiebedingungen, die eine präparative Trennung der chiralen Fomocainderivate an der dem Arbeitskreis zur Verfügung stehenden präparativen Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm) ermöglichen sollten.

Die chiralen Oe7000-Derivate ließen sich trotz vielfältiger Veränderungen der Chromatographiebedingungen nicht an der Chiralcel[®] OD-Phase trennen. Für die chiralen Fomocaine lässt sich feststellen, dass die analytischen Racemattrennungen der 2-substituierten Derivate mit besseren Werten für Selektivität und Auflösung gelang als die Trennung der entsprechenden 3-substituierten Verbindungen. Innerhalb einer homologen Reihe nahm die Selektivität der Trennungen mit wachsender Seitenkettenlänge ab. Die Retentionszeiten beider Enantiomere sanken, die des zuletzt eluierten Enantiomers jedoch stärker. Der Wechsel zu einer Alkoholkomponente im Eluenten, die in ihrer H-Brückenbildung sterisch stärker gehindert ist, verbesserte wieder die Trennleistungen für die höher substituierten Verbindungen. Außer O/W15 konnte jedes Racemat der chiralen Fomocainderivate basisliniengetrennt werden. Jedoch wurden nur für O/W5 Trennbedingungen gefunden, die eine Übertragung in den präparativen Maßstab zulassen würden.

Das Verhalten der chiralen Fomocainderivate auf der OD-Phase legte den Schluss nahe, dass der Hauptmechanismus in der Diskriminierung zwischen den Enantiomeren durch die OD-Phase in der Ausbildung von H-Brücken zwischen dem Morpholinsauerstoff und dem Carbamoyl-NH der CSP liegt. Ein kleinerer Substituent neben dem Sauerstoff führte hier zu einer Verbesserung der chiralen Erkennung als eine längere Alkylkette, die durch ihre Sperrigkeit die Interaktionen beider Enantiomere mit der CSP beeinträchtigte.

Ein anderes Bild ergab sich bei den 4-Benzoylmorpholinen. Hier konnten bessere Selektivitäten für die Morpholinderivate mit den größeren Alkylsubstituenten erreicht werden. NBM5 konnte an der Chiralcel[®] OD-Phase nicht in seine Stereoisomere getrennt werden. Zudem fiel im Zuge der Versuche zur präparativen Racematspaltung von 2-Ethylmorpholin und O/W3 sowie von 3-Propylmorpholin und O/W13 (s. Abschnitte 3.2.2.3. und 3.2.2.4.) eine Umkehr in der Elutionsreihenfolge der Enantiomere an der OD-Phase auf. Die isopropylsubstituierten Verbindungen O/W15 und NBM8 ähneln in ihrem chromatographischen Verhalten eher den ethyl- (O/W11 und NBM6) als den propylsubstituierten Analoga O/W13 und NBM7.

Verbindung	% (V/V) Modifier	Flussrate [ml/min]	T [°C]	t _R E1 [min]	t _R E2 [min]	k' 1	k' 2	k _α	Rs
O/W1 (6)	2,5 i-Propanol	0,7	25	28,62	35,16	5,03	6,41	1,274	n.b.
O/W3 (10)	2,5 t-Butanol	1,0	25	28,87	38,57	6,97	9,65	1,385	2,62
O/W5 (14)	2,5 3-Pentanol	0,9	25	22,45	29,93	4,76	6,68	1,403	4,19
O/W7 (18)	2,5 3-Pentanol	0,9	25	22,11	28,43	4,67	6,29	1,347	3,74
O/W9 (22)	2,5 n-Butanol	0,7	25	22,97	26,92	3,95	4,80	1,215	1,77
O/W11 (26)	2,5 t-Butanol	0,9	25	45,11	51,03	10,57	12,09	1,144	1,42
O/W13 (30)	2,5 t-Butanol	0,9	25	36,32	42,55	8,31	9,91	1,193	1,93
O/W15 (34)	2,5 t-Butanol	0,9	25	36,60	39,61	8,38	9,16	1,093	0,92
NBM1 (38)	30 TBME	1,3	35	39,12	42,18	12,26	13,30	1,085	1,00
NBM2 (39)	30 TBME	1,3	35	33,63	36,88	10,40	11,50	1,106	1,18
NBM3 (40)	30 TBME	1,3	35	31,95	35,96	9,83	11,19	1,138	1,46
NBM4 (41)	30 TBME	1,3	35	39,82	45,13	12,50	14,30	1,144	1,59
NBM5 (42)	keine Trennung	1,3	35	42,52	---	---	---	---	---
NBM6 (43)	30 TBME	1,3	35	38,13	46,33	11,92	14,71	1,234	2,24
NBM7 (44)	30 TBME	1,3	35	33,93	44,13	10,50	13,96	1,329	3,64
NBM8 (45)	30 TBME	1,3	35	30,08	35,83	9,20	11,15	1,212	2,28

Tabelle 7: Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralcel[®] OD-Phase

b) Chromatographische Racemattrennung an der Chiralpak[®] AS-Phase

Die AS-Phase ist von den drei getesteten CSP die einzige, an der die Trennung von NBM5 gelang. Die Verbindungen mit Diethanolamingrundstruktur konnten zumindest angetrennt werden, obwohl keine der Trennungen für einen präparativen Ansatz ausreichend erschien. Nur für O/W2, 14 und 16 konnte in der Gruppe der Oe 7000-Derivate Basislinientrennung der Enantiomerenpeaks erreicht werden.

Bemerkenswert gute Trennleistungen wurden für O/W1 und O/W3 erreicht. Die gefundenen Selektivitäten von 4,831 und 2,235 versprechen gut durchzuführende Trennungen im präparativen Maßstab. Die Verlängerung der Alkylkette am C-2 des Morpholins von -CH₃ auf -C₄H₉ führte zu einem vollständigen Verlust der chiralen Erkennung (Abb. 25), wobei die Retentionszeit des zuerst eluierten Enantiomers praktisch unverändert blieb und die des zweiten Enantiomers sich dieser annäherte. Der größer werdende Substituent schränkte also nur die Wechselwirkungen des zweiten Stereoisomers mit der stationären Phase ein.

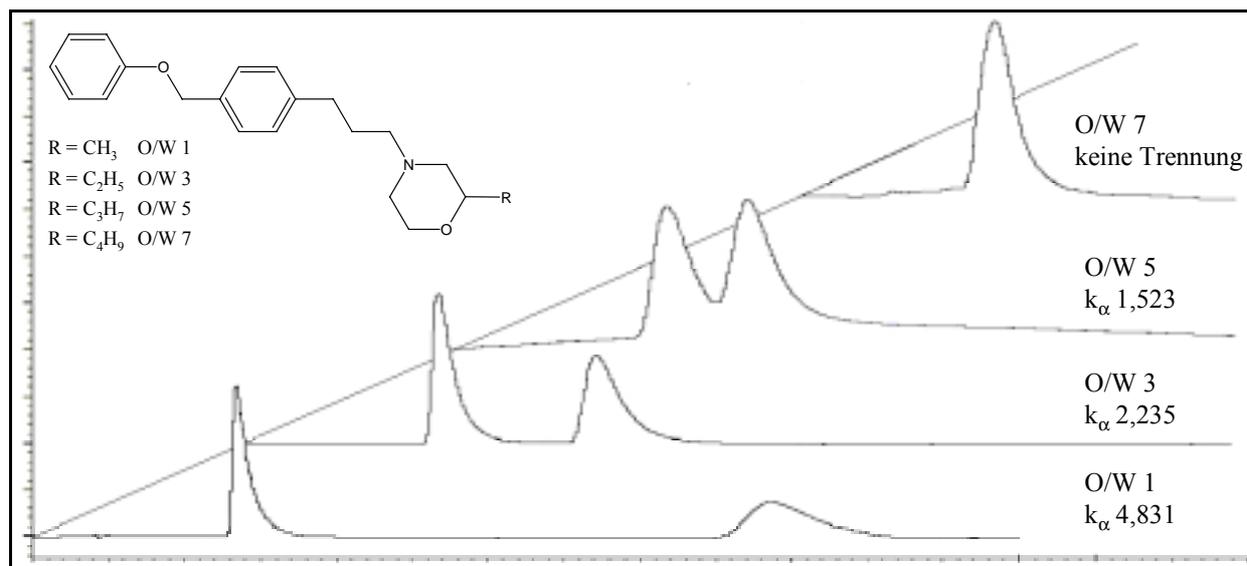


Abb. 25: Trennleistung für die 2-substituierten chiralen Fomocainderivate an der Chiralpak[®] AS-Phase in Abhängigkeit von der Substituentengröße (mobile Phase n-Hexan/i-Propanol 95/5)

Dieser Effekt war bei den 3-substituierten Fomocainderivaten und den 4-Benzoylmorpholinen in geringerer Ausprägung ebenso zu beobachten. Als Grund für die Verschlechterung der Trennleistung kann eine sterische Hinderung der Interaktion des Analyten mit der chiralen Trennmatrix angenommen werden. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbamat-NH und dem Morpholinsauerstoff, der durch einen größer werdenden Substituenten in 2-Position stärker abgeschirmt wird, scheint an der AS-Phase die Hauptrolle für die Diskriminierung zwischen den Enantiomeren der chiralen Fomocainderivate zu spielen. Tabelle 8 fasst die Daten der analytischen Racemattrennungen an der Chiralpak[®] AS-Phase zusammen.

Verbindung	% (V/V) Modifier	Flussrate [ml/min]	T [°C]	t _R E1 [min]	t _R E2 [min]	k' 1	k' 2	k _α	Rs
O/W1 (6)	5 i-Propanol	0,9	25	13,42	48,63	2,19	10,58	4,831	10,27
O/W3 (10)	5 i-Propanol	0,9	25	12,59	22,98	2,00	4,47	2,235	3,10
O/W5 (14)	5 i-Propanol	0,9	25	14,24	19,50	2,39	3,64	1,523	2,09
O/W7 (18)	5 i-Propanol	0,9	25	6,33	k. T.	---	---	---	---
O/W9 (22)	5 n-Propanol	0,9	25	8,93	10,24	1,13	1,44	1,274	1,00
O/W11 (26)	5 n-Propanol	0,9	25	7,42	8,08	0,77	0,92	1,278	
O/W13 (30)	5 i-Propanol	0,9	25	7,22	8,92	0,59	0,64	1,555	
O/W15 (34)	5 Ethanol	0,9	25	5,65	5,93	0,35	0,41	1,171	
O/W2 (7)	20 i-Propanol	0,9	25	41,28	55,58	8,83	12,23	1,385	1,42
O/W4 (11)	30 i-Propanol	0,9	25	11,94	k. T.	---	---	---	---
O/W6 (15)	30 i-Propanol	0,9	25	9,33	11,58	1,22	1,76	1,443	n. b.
O/W8 (19)	30 i-Propanol	0,9	25	8,58	k. T.	---	---	---	---
O/W10 (23)	30 i-Propanol	0,9	25	11,13	13,13	1,67	2,13	1,275	0,95
O/W12 (27)	10 i-Propanol	0,9	25	27,66	31,74	5,59	5,56	1,173	n. b.
O/W14 (31)	10 i-Propanol	0,9	25	14,23	18,57	2,39	3,42	1,431	1,22
O/W16 (35)	10 i-Propanol	0,9	25	17,51	25,08	3,17	4,97	1,578	1,88
NBM1 (38)	5 Ethanol	0,8	25	25,48	26,13	4,668	4,82	1,031	n. b.
NBM2 (39)	2,5 Ethanol	1,0	30	27,74	30,79	6,75	7,60	1,127	1,28
NBM3 (40)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--
NBM4 (41)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--
NBM5 (42)	2,5 Ethanol	1,0	30	32,48	34,69	8,49	9,13	1,075	1,33
NBM6 (43)	5 2-Butanol	0,8	30	39,28	43,62	7,85	8,91	1,134	1,49
NBM7 (44)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--
NBM8 (45)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--

Tabelle 8: Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralpak® AS-Phase

c) Chromatographische Racemattrennung an der Chiralpak® AD-Phase

An der AD-Phase erreichen innerhalb der 2-substituierten Fomocainderivate die Werte für Selektivität und Auflösung ein Maximum bei der Propylsubstitution. Diese Entwicklung konnte für die entsprechenden Oe7000-Derivate O/W 2, 4, 6 und 8 nicht beobachtet werden, wohl auch aufgrund der gegebenen freien Drehbarkeit der Seitenketten im Vergleich zum eher rigiden Heterocyclus und der damit aufgehobenen räumlichen Fixierung des Stereozentrums. Bei allen chiralen Fomocainderivaten mit Alkylsubstitution am C-3 des Morpholinrings konnte keine Basislinientrennung erreicht werden.

An der AD-Phase sinkt aber im Gegensatz zur AS-Phase die Retentionszeit des zuerst eluierten Enantiomers mit wachsender Seitenkettenlänge bis zur Propylsubstitution bei stärker zurückge-

haltenem zweiten Enantiomer. Es sind also wie an der OD-Phase die Interaktionen von beiden Stereoisomeren mit der stationären Phase betroffen (Abb. 26).

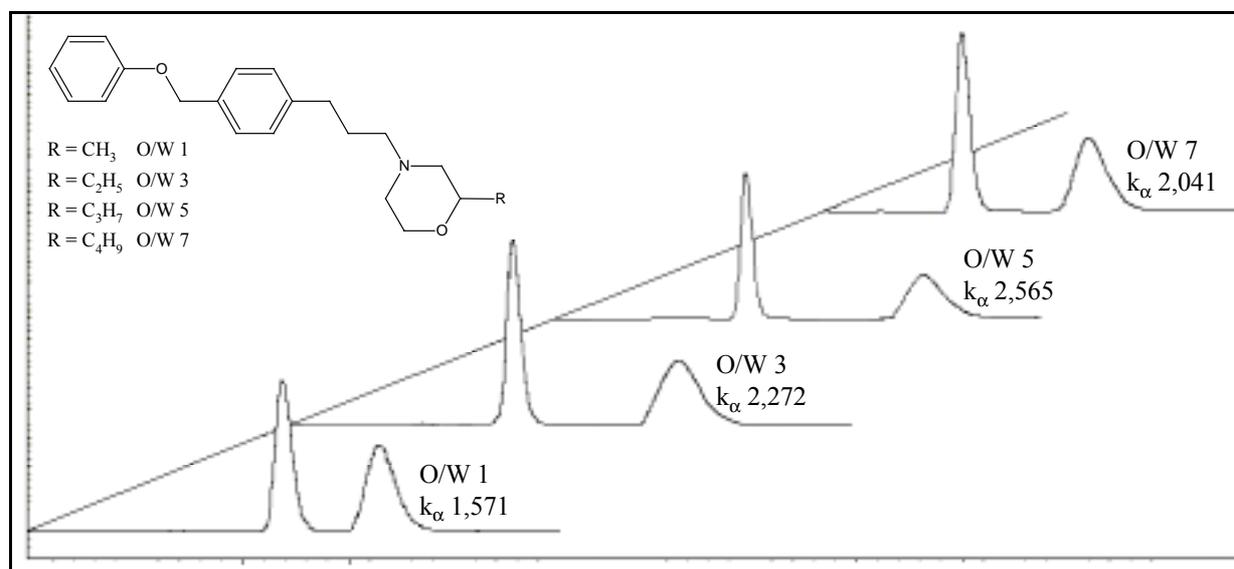


Abb. 26: Trennleistung für die 2-substituierten chiralen Fomocainderivate an der Chiralpak[®] AD-Phase in Abhängigkeit von der Substituentengröße (mobile Phase n-Hexan/Ethanol 99/1)

Umgekehrt verhielt es sich mit den 4-Benzoylmorpholinen, von denen die 3-substituierten Derivate bessere Werte für Selektivität und Auflösung zeigten. Analog zur OD-Phase verhielten sich die 3-isopropylsubstituierten Verbindungen eher wie die 3-Ethylverbindungen als die unverzweigten Propylanaloga. Die AD-Phase erwies sich für die Racemattrennung von O/W12 und NBM2 als ungeeignet. Tabelle 9 zeigt eine Zusammenfassung der analytischen Racemattrennungen an der Chiralpak[®] AD-Phase.

Mit der getroffenen Auswahl an CSP konnte für jedes synthetisierte Racemat zumindest eine analytisch verwendbare HPLC-Methode zur Enantiomerentrennung gefunden werden, wobei an der OD-Phase nur für O/W5 Trennbedingungen ermittelt wurden, die an der vorhandenen Anlage eine präparative Racemattrennung zugelassen hätten. Die beiden auf Amylose aufbauenden CSP Chiralpak[®] AS und AD scheinen generell besser zur Trennung sowohl der chiralen Fomocain- als auch der Oe7000-Derivate und 4-Benzoylmorpholine geeignet zu sein. Die Trennungen der 2-substituierten Fomocaine gelangen an jeder getesteten CSP besser als die ihrer 3-substituierten Analoga.

Über die Elutionsreihenfolge der Enantiomere der chiralen Fomocaine an den eingesetzten polysaccharidbasierten CSP ließen sich - wie es auch für andere Substanzklassen beschrieben wurde [73] - keine allgemein gültigen Aussagen formulieren. So wurde im Fall der Verbind-

ungen O/W3 und O/W13, für die 3-propylsubstituierte Verbindung beim Wechsel von der OD- auf die AD-Phase eine Umkehr der Elutionsreihenfolge festgestellt. Für O/W3 blieb die Elutionsreihenfolge dagegen unverändert.

Verbindung	% (V/V) Modifier	Flussrate [ml/min]	T [°C]	t _R E1 [min]	t _R E2 [min]	k' 1	k' 2	k _a	Rs
O/W1 (6)	1 Ethanol	0,8	25	11,88	16,48	2,05	3,22	1,571	2,24
O/W3 (10)	1 Ethanol	0,8	25	10,06	17,90	1,58	3,59	2,272	3,24
O/W5 (14)	1 Ethanol	0,8	25	9,29	17,72	1,38	3,54	2,565	3,92
O/W7 (18)	1 Ethanol	0,8	25	9,63	15,59	1,47	3,00	2,041	2,93
O/W9 (22)	1 Ethanol	0,8	25	14,56	17,60	2,73	3,51	1,286	1,50
O/W11 (26)	1 Ethanol	0,8	25	12,33	13,85	2,16	2,55	1,181	0,93
O/W13 (30)	1 Ethanol	0,8	25	10,08	11,56	1,58	1,96	1,241	1,14
O/W15 (34)	2,5 n-Butanol	0,8	25	1,417	7,792	0,90	1,00	1,111	n.d.
O/W2 (7)	10 Ethanol	0,8	25	21,16	25,32	4,43	5,49	1,239	1,35
O/W4 (11)	5 Ethanol	0,8	30	37,78	42,59	8,69	9,92	1,108	0,95
O/W6 (15)	5 i-Propanol	0,8	30	38,82	44,88	8,95	10,51	1,174	1,09
O/W8 (19)	5 Ethanol	0,8	30	33,98	41,00	7,71	9,51	1,233	1,44
O/W10 (23)	10 Ethanol	0,8	25	20,43	22,80	4,24	4,85	1,144	0,78
O/W12 (27)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--
O/W14 (31)	10 n-Propanol	0,8	25	12,63	16,44	2,24	3,22	1,437	1,74
O/W16 (35)	10 n-Propanol	0,8	25	10,33	15,65	1,65	3,01	1,824	2,29
NBM1 (38)	2,5 i-Propanol	0,8	30	34,43	37,25	7,83	8,55	1,092	1,18
NBM2 (39)	keine Trennung	---	-	-	--	--	--	--	--
NBM3 (40)	2,5 n-Butanol	0,8	25	31,51	34,55	7,08	7,86	1,110	1,18
NBM4 (41)	2,5 n-Butanol	0,8	25	28,87	30,61	6,40	6,85	1,070	n.d.
NBM5 (42)	2,5 n-Butanol	0,8	25	33,88	37,30	7,69	8,56	1,113	n.d.
NBM6 (43)	2,5 n-Butanol	0,8	25	32,87	40,19	7,43	9,31	1,523	1,56
NBM7 (44)	2,5 2-Butanol	0,8	25	33,58	37,29	7,01	8,56	1,125	1,06
NBM8 (45)	2,5 2-Butanol	0,8	25	35,38	41,14	8,07	9,55	1,183	1,39

Tabelle 9: Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralpak[®] AD-Phase

3.2.2. Präparative Racemattrennung durch Bildung diastereomerer Salze

3.2.2.1. Auswahl des Kristallisationsverfahrens

Da an der OD-Phase im Hinblick auf mögliche präparative Trennungen der chiralen Fomocaine nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden konnten, musste nach praktikablen alternativen Wegen zur Racematspaltung gesucht werden. Unter den gegebenen Voraussetzungen kam nur die Bildung diastereomerer Salze als Methode zur Racemattrennung in Frage. In die Versuche

wurden die synthetisierten C-Alkylmorpholine mit eingeschlossen, um über den Umweg über eine Racematspaltung auf der Morpholinstufe eventuell eine kostengünstigere Methode zur enantiomerenreinen Synthese der Zielverbindungen erhalten zu können oder zumindest nichtracemische Fomocainderivate zu synthetisieren, die unter den gegebenen Bedingungen an der präparativen OD-Säule einfach aufgereinigt werden konnten.

In achiraler Umgebung sind die Enantiomere einer chiralen Verbindung durch physiko-chemische Methoden praktisch nicht zu unterscheiden. Sie können lediglich über die Drehung der Polarisationssebene linear polarisierten Lichts differenziert werden. Nur in seltenen Fällen kristallisieren die Enantiomere aus einem Lösungsmittel getrennt nebeneinander aus und können manuell ausgelesen werden, wie es 1847 Louis Pasteur mit der enantioselektiven Kristallisation von Natriumammoniumtartrat gelang [114]. Im Regelfall bilden jedoch die Enantiomere in einem achiralen Lösungsmittel ein Eutektikum im statistischen Verhältnis von 1:1 und kristallisieren als Racemat aus.

Die Isomere diastereomerer Verbindungen unterscheiden sich wiederum in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z.B. Löslichkeit oder Schmelz- und Siedepunkt. Durch Zusatz eines geeigneten enantiomerenreinen chiralen Hilfsstoffes zu einem Racemat können Diastereomerenpaare erzeugt und diese durch die Auswahl tauglicher Bedingungen getrennt werden. Für sauer oder basisch reagierende Verbindungen bietet sich die Bildung diastereomerer Salze mit enantiomerenreinen Basen wie Brucin, Strychnin und chiralen Phenylethylamin-derivaten oder Säuren wie Wein- und Mandelsäurederivaten, Phenylphosphorsäuren und Camphersulfonsäuren zur Racematspaltung an. Auch unter Zuhilfenahme von computer-gestützten Modellen [115], Kristallstrukturanalysen diastereomerer Salze [116, 117] und empirischen Korrelationen [118] wird die Suche nach dem geeigneten Salzbildner und den passenden Kristallisationsbedingungen auch heute noch vom „*Trial-and-error*“-Prinzip diktiert [119]. Das Studium der Phasendiagramme diastereomerer Mischungen kann das Auffinden geeigneter Bedingungen erleichtern. Abb. 27a) zeigt ein Phasendiagramm mit den Löslichkeitsisothermen einer diastereomeren Mischung, die im Randbereich ein Eutektikum bildet.

In diesem Fall kann zur Spaltung des Racemates **R** das schlechter lösliche Diastereomer **p** aus einer Lösung der Zusammensetzung zwischen den Punkten **O** und **S** in reiner Form in einem Kristallisationsschritt vom leichter löslichen Diastereomer **n** abgetrennt werden. Der Wert für die Ausbeute nähert sich um so stärker dem theoretischen Maximalwert von 50 % an, je näher das Eutektikum **E** an den Rändern des Phasendiagramms liegt.

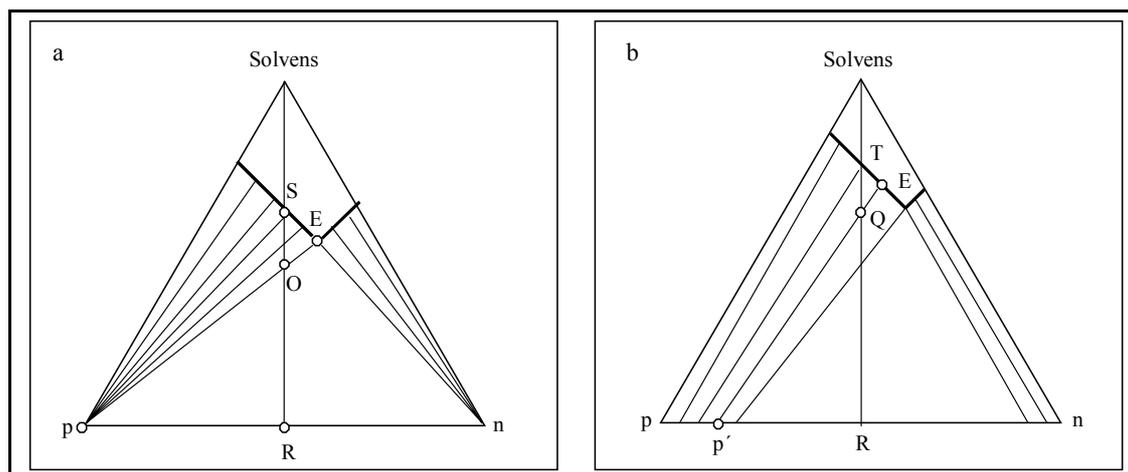


Abb. 27: Phasendiagramme zur Beschreibung des Löslichkeitsverhaltens diastereomerer Salze in einer ternären Mischung (nach [119])

- a) ideale Löslichkeitsisothermen für ein **p,n**-Diastereomerenpaar,
- b) eutektisches Phasendiagramm mit festen Lösungen im Randbereich

Häufiger weisen die Phasendiagramme jedoch Bereiche fester Lösungen an den Rändern auf (Abb. 27b). Hier resultiert aus einer Kristallisation aus dem System **Q** ein unreiner Feststoff **p'** in einer Lösung der Zusammensetzung **T**, was mehrere Kristallisationsschritte zur Aufreinigung eines Enantiomers nötig macht [119].

Einen besonderen Ansatz, um schneller zu einer erfolgreichen Kristallisationsmethode zu kommen, verfolgten Vries und Mitarbeiter. Sie setzten bei der nach ihrem Heimatland benannten „Dutch Resolution“ Mischungen von strukturell eng verwandten Salzbildnern einer sogenannten „Substanzfamilie“ zur Kristallisation in der Erwartung ein, dass das am schwersten lösliche diastereomere Salz mit der am besten zur Racematspaltung geeigneten Komponente schneller aus der Lösung auskristallisieren würde als aus einem einfachen Ansatz. Im Ergebnis erhielten sie schnell kristallisierende Niederschläge mit größeren Enantiomerenüberschüssen als beim Einsatz nur eines Salzbildners. Überraschenderweise enthielten die gebildeten Salze mehrere Komponenten der Reagenzmischungen in nichtstöchiometrischer Zusammensetzung, die sich auch durch mehrmaliges Umkristallisieren kaum veränderte [120]. Dieser Befund deutete auf die Entstehung von definierten Mischkristallen hin und nicht auf die Bildung von Salzgemischen [119]. Definierte Mischungen der Salzbildner einer „Familie“ in äquimolaren oder anderen ganzzahligen stöchiometrischen Verhältnissen erwiesen sich zufälligen Kombinationen als überlegen. Im Regelfall wurde zur Kristallisation das Racemat mit einer äquimolaren Mischung von zwei oder drei verwandten Salzbildnern eingesetzt [120]. Die Phasendiagramme der resultierenden Systeme verkomplizieren sich naturgemäß durch das Hinzufügen weiterer

Dimensionen. Abb. 28 zeigt ein vereinfachtes Phasendiagramm einer Vierkomponentenmischung mit zwei Salzbildnern unter Ausschluss der Bildung fester Lösungen. Es entstehen zwei schwerer (**p1** und **p2**) und zwei leichter lösliche (**n1** und **n2**) diastereomere Salze, die anhand der Lage ihres Eutektikums und des Verlaufs der Löslichkeitsisothermen in den entsprechenden Verhältnissen auskristallisieren [121].

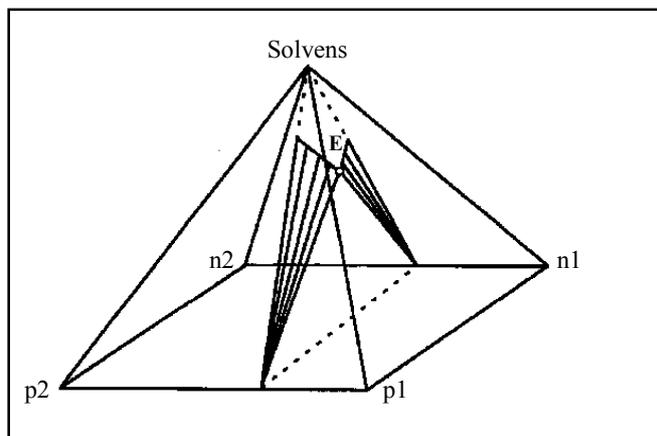


Abb. 28: Löslichkeitsisothermen diastereomere Salze in einem Vierkomponentensystem (nach [121])

Auch solche Systeme können Bereiche fester Lösungen in ihren Phasendiagrammen aufweisen. Genau diese Bildung fester Lösungen mit einer höheren Packungsdichte und unter Umständen erniedrigter Löslichkeit im Solvens im Vergleich zu einer festen Lösung oder Kristallen aus nur zwei Komponenten könnte der Grund für die verbesserte Enantiomerenanreicherung in der „Dutch Resolution“ sein [119]. In weiterführenden Arbeiten [122, 123] wurde der Einfluss verwandter Substanzen auf die Keimbildung im Kristallisationsansatz untersucht. Die Hemmung der Bildung von Kristallisationskeimen in der „Dutch Resolution“ wurde als häufiger Effekt beobachtet. Die Keimbildung der leichter löslichen Komponente wird dabei stärker gehemmt als die des schlechter löslichen Salzes, was eine weitere schlüssige Erklärung für die guten Trennleistungen bei der Racematspaltung mit Mischungen strukturell eng verwandter Salzbildner liefert.

Unter Einsatz eines sogenannten T-Mixes aus Toluyl- und Anisoylweinsäure im Verhältnis 2:1 im Lösungsmittel Ethanol konnten Vries und Mitarbeiter 2-Ethylmorpholin durch zweimaliges Umkristallisieren zu 96 % *ee* anreichern [120, keine Angabe der Konfiguration].

Dieses Ergebnis gab den Anstoß, die „Dutch Resolution“ auch auf die anderen synthetisierten C-Alkylmorpholine und die chiralen Fomocainderivate anzuwenden.

3.2.2.2. Vorversuche im analytischen Maßstab

In analytischen Testreihen musste zunächst die Tauglichkeit des Ansatzes für die gegebenen Trennprobleme überprüft werden. Je 0,1 mmol chirale Fomocainbase bzw. 1 mmol C-Alkylmorpholin wurden mit einer äquimolaren Menge der in Tabelle 10 aufgeführten Trennreagenzien in Ethanol zur Kristallisation gebracht und hplc auf das resultierende Enantiomerenverhältnis geprüft (Bedingungen s. Kapitel 3.2.1.).

Trennreagenz	chirale Fomocainderivate	C-Alkylmorpholine
Dibenzoylweinsäure T1	+	-
Ditoluylweinsäure T2	+	-
Dianisoylweinsäure T3 (37)	+	-
T-Mix T_a (T1:T2:T3 = 0:2:1)	+	+
T-Mix T_b (T1:T2:T3 = 1:1:1)	+	+
Campher-10-sulfonsäure CSS	+	-

Tabelle 10: In den Vorversuchen zur Racematspaltung durch Bildung diastereomerer Salze eingesetzte Trennreagenzien (+ untersucht, - nicht untersucht)

Für die analytischen Versuche wurden ausschließlich R-konfigurierte Trennreagenzien eingesetzt. **T1** (Fluka), **T2** und **CSS** (VWR) waren käuflich zu erhalten, **T3 (37)** stammte aus eigener Synthese. **CSS** wurde deshalb in die Versuche mit einbezogen, weil Glassl [75] mit diesem Reagenz die Racematspaltung der Verbindungen O/G3 und O/G5 gelang.

Die Versuche mit den chiralen Fomocainen verliefen allesamt erfolglos. Es trat entweder keine Kristallisation ein oder im gebildeten Salz wurde keines der Enantiomere angereichert. Außer 3-i-Propylmorpholin konnten alle C-Alkylmorpholine mit wenigstens einem T-Mix zur Kristallisation - meist schon nach weniger als 24 Stunden - gebracht werden. Tabelle 11 zeigt die Trennerfolge bei den chiralen Morpholinen nach einmaligem Umkristallisieren der Salze. Die Enantiomerenverhältnisse beziehen sich auf die Peakflächen in der analytischen HPLC als 4-Benzoylmorpholine.

Es zeigte sich, dass der Mix **T_b** in allen Fällen der Mischung **T_a** überlegen ist. Besonders für 3-Ethylmorpholin wurde eine starke Anreicherung von E2 (als NBM6) in nur einem Kristallisationsschritt erreicht. Von den übrigen Resultaten erwiesen sich die fett hervorgehobenen bei Durchführung von mindestens zwei Kristallisationsschritten für einen Trennansatz im präparativen Maßstab als durchführbar.

C-Alkylmorpholin	Mix T _a		Mix T _b	
	% E1	% E2 (% ee)	% E1	% E2 (% ee)
2-Methylmorpholin (5)	40,0	60,0 (20,0)	21,3	78,7 (57,4)
2-Ethylmorpholin (9)	27,0	73,0 (46,0)	16,4	83,6 (67,2)
2-Propylmorpholin (13)	-	keine Trennung	33,7	66,3 (29,6)
2-Butylmorpholin (17)	47,7	52,3 (4,6)	33,3	66,7 (33,4)
3-Methylmorpholin (21)	35,4	64,6 (29,2)	23,7	76,3 (52,6)
3-Ethylmorpholin (25)	keine Kristallisation		8,7	91,3 (82,6)
3-Propylmorpholin (29)	73,4 (46,8)	26,6	keine Kristallisation	
3-Propylmorpholin (33)	keine Kristallisation			

Tabelle 11: Zusammenfassung der Trennerfolge bei der Racematspaltung der C-Alkylmorpholine nach der „Dutch Resolution“

3.2.2.3. Präparative Trennung von 2-Ethyl- und 3-Propylmorpholin

Aus den pharmakologischen Tests (s. Abschnitt 3.3.) stellten sich die Verbindungen O/W3 und O/W13 als diejenigen mit dem günstigsten Wirkungsprofil innerhalb ihrer homologen Reihen heraus. Da eine direkte chromatographische Racemattrennung dieser Substanzen an der präparativen OD-Säule unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht möglich war, wurde ein zweistufiges Verfahren zur Gewinnung der reinen Enantiomere angewandt. Der erste Schritt stellte die Anreicherung eines Enantiomers durch Racematspaltung von 2-Ethyl- und 3-Propylmorpholin über die Bildung diastereomerer Salze nach der „Dutch Resolution“ dar. Mit den so erhaltenen nichtracemischen C-Alkylmorpholinen mit mindestens 70 % ee wurden die entsprechenden Fomocainderivate dargestellt, die dann im zweiten Schritt an der OD-Phase chromatographisch aufgereinigt wurden (s. Abschnitt 3.2.3.)

a) Präparative Racematspaltung von 2-Ethylmorpholin

Aus 14,40 g 2-Ethylmorpholin wurden durch einen Fällungsschritt mit einer äquimolaren Menge des S-konfigurierten Mixes T_b nach einmaligem Umkristallisieren des Salzes 3,10 g der Morpholinbase erhalten, die als *rac*-NBM2 ein Enantiomerenverhältnis von 86,0/14,0 (72 % ee) zeigte. Das 4-Benzoylderivat hatte in Diethylether eine spezifische Drehung α_D^{20} von +21,7°, die nichtracemische Base in Methanol war ebenfalls rechtsdrehend ($\alpha_D^{20} = +14,1^\circ$). Aus der ethanolischen Lösung dieser Kristallisation wurden 8,68 g 2-Ethylmorpholin im Enantiomerenverhältnis 34,8/65,2 extrahiert. Die nach dem gleichen Verfahren durchgeführte

Kristallisation dieses Rückstandes mit dem **R**-konfigurierten Mix **T_b** führte zu 2,68 g linksdrehendem (Methanol, $\alpha_D^{20} = -13,6^\circ$) 2-Ethylmorpholin, dessen Enantiomerenverhältnis als *nrac*-NBM2 (Diethylether, $\alpha_D^{20} = -25,8^\circ$) mit 7,6/92,4 (84,8 % *ee*) bestimmt wurde.

Aus den auf diese Weise erhaltenen Morpholinen wurden nach der im Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Methode die nichtracemischen Verbindungen (-)-O/W3 (84 % *ee*) (**46**) und (+)-O/W3 (74 % *ee*) (**47**) zu je 2,32 g synthetisiert und für die präparative HPLC zurückgestellt (Abb. 29).

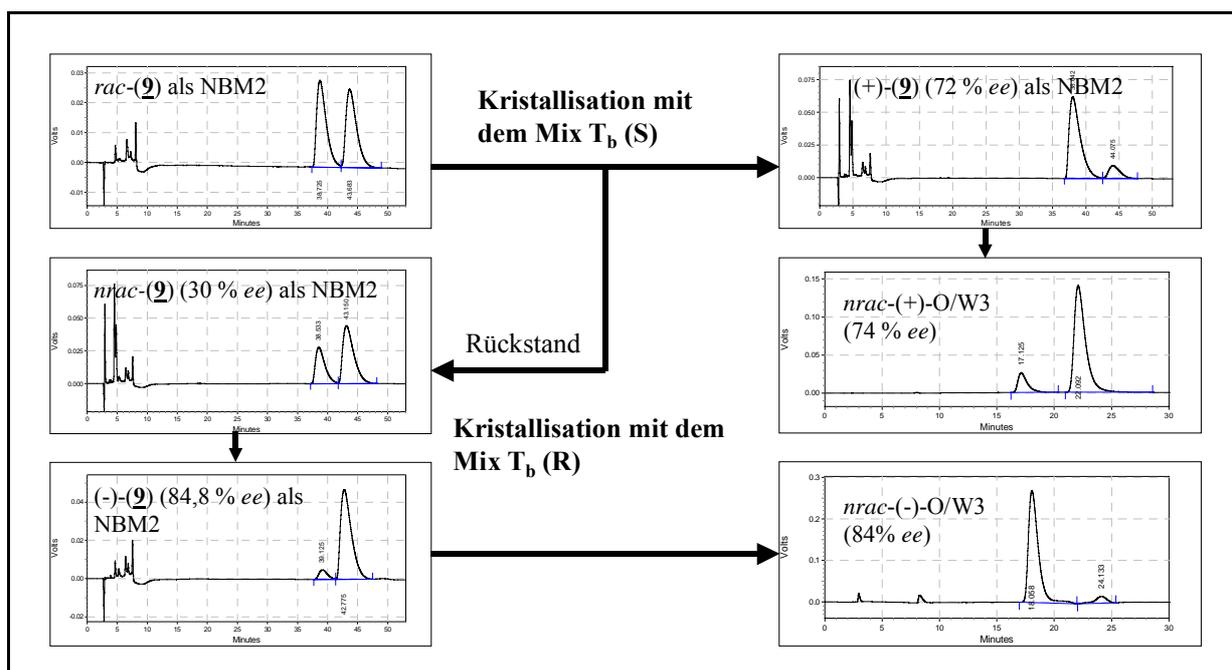


Abb. 29: Originalchromatogramme zu den einzelnen Kristallisationsschritten bei der präparativen Racematspaltung von **9** und den sich anschließenden Synthesen der *nrac*-O/W3-Chargen

b) Präparative Racematspaltung von 3-Propylmorpholin

Aus 12,93 g 3-Propylmorpholin wurden nach zwei Kristallisationsschritten mit jeweils äquimolaren Mengen des Mixes **T_a** in der **R**-Konfiguration und dazwischenliegender Basenextraktion 2,04 g nichtracemisches 3-Propylmorpholin erhalten. Das daraus dargestellte *nrac*-NBM7 wies ein Enantiomerenverhältnis von 92,7/7,3 (85,4 % *ee*) bei einer spezifischen Drehung in Diethylether von $\alpha_D^{20} = +56,1^\circ$ auf. Die Base in Methanol war linksdrehend ($\alpha_D^{20} = -7,2^\circ$). Aus dem ethanolischen Überstand der ersten Kristallisation wurden 5,37 g Morpholin-

base extrahiert, die mit dem entsprechenden Einsatz an S-konfiguriertem Mix T_a zur Kristallisation gebracht wurden. Es resultierten 2,33 g nichtracemisches 3-Propylmorpholin im Enantiomerenverhältnis (als *nrac*-NBM7) von 8,8/91,2 (82,4 % *ee*). Die spezifische Drehung des Amids in Diethylether wurde mit $\alpha_D^{20} = -52,0^\circ$ bestimmt. Die Morpholinbase in Methanol war rechtsdrehend ($\alpha_D^{20} = +9,4^\circ$).

Die nichtracemischen Fomocainderivate (-)-O/W13 (83 % *ee*) (**48**) und (+)-O/W13 (79,5 % *ee*) (**49**) zur chromatographischen Reinigung wurden aus den erhaltenen Morpholinen nach der beschriebenen Methode zu 2,295 g bzw. 2,035 g dargestellt (Abb. 30).

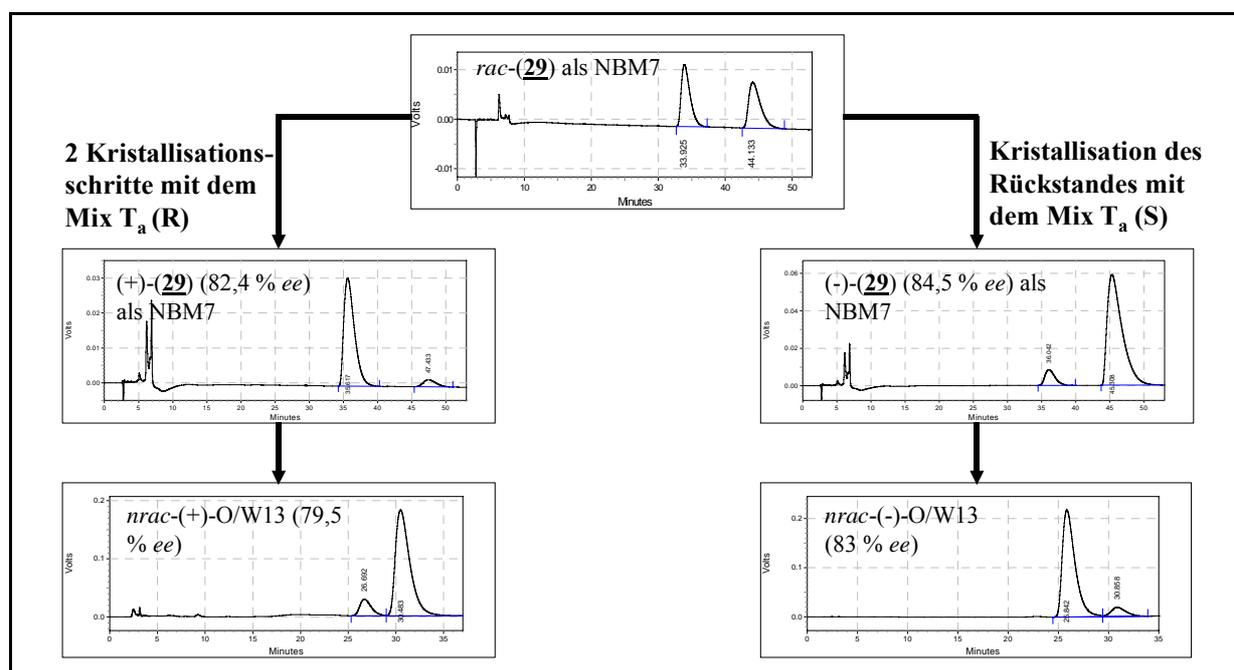


Abb. 30: Originalchromatogramme zu den einzelnen Kristallisationsschritten bei der präparativen Racematspaltung von **29** und den sich anschließenden Synthesen der *nrac*-O/W13-Chargen

3.2.3. Präparative Racemattrennung durch HPLC an einer Chiralcel[®] OD-Säule

In den analytischen Vorversuchen zur Racemattrennung der O/W-Substanzen konnten mit einer mobilen Phase der Zusammensetzung n-Hexan/tert-Butanol 97,5/2,5 die besten Trennergebnisse für O/W3 und O/W13 erreicht werden. Die gefundene Methode musste für den präparativen Ansatz im Hinblick auf maximale Selektivität und Säulenbeladung sowie minimale Laufzeit optimiert werden. Der Alkoholanteil wurde auf 2 % reduziert, was eine leichte Verbesserung der Selektivität von 1,385 auf 1,387 für O/W3 bzw. von 1,193 auf 1,194

für O/W13 bei geringfügig verlängerter Analysenlaufzeit bewirkte. Zur Ermittlung der maximalen Säulenbeladung wurde der Substanzauftrag auf die analytische Säule schrittweise so weit erhöht, bis im Chromatogramm gerade noch Basislinientrennung zu verzeichnen war. Zur Übertragung der Flussrate auf den präparativen Maßstab wurde der empirisch gefundene Faktor 150 [110] eingesetzt, der in der präparativen Trennung zu vergleichbaren Retentionszeiten führen sollte. Die maximale Säulenbeladung aus den analytischen Trennungen multipliziert mit dem Packungsmaterialfaktor 250 [103] ergab die Säulenbeladung für eine erste Trennung an der präparativen Säule. Die so festgelegten Startbedingungen sollten eine sichere präparative Trennung ohne große Substanzverluste garantieren. Erfahrungsgemäß konnte eine endgültige Optimierung der Trennbedingungen nur im präparativen Maßstab erfolgen, da es durch die stark vergrößerten Säulendimensionen zu Verschiebungen der Retentionszeiten kommen kann und die im Vergleich zur verwendeten analytischen Säule verdoppelte mittlere Partikelgröße der stationären Phase immer zu Verschlechterung der Trennleistung durch Peakverbreiterung führt.

Die allgemeine Vorgehensweise bei der präparativen HPLC an der Chiralcel[®] OD-Säule soll hier exemplarisch am Beispiel der Aufreinigung von (-)-O/W3 (84 % *ee*) erläutert werden.

Die Probetrennung wurde bei einer Säulentemperatur von 25 °C mit 100 mg Substanz bei einer Flussrate von 224 ml/min durchgeführt. Da die Peaks im Chromatogramm basisliniengetrennt erschienen, wurde der Substanzauftrag auf 250 mg erhöht. Die oben angesprochene Peakverbreiterung machte sich hier bereits stark bemerkbar, was sich in den Fraktionsgrößen von ca. 1000 ml für das erste bzw. 2000 ml für das zweite Enantiomer und einer Übergangsfraktion von ca. 400 ml ausdrückte. Deshalb wurde unter Tolerierung der leicht verminderten Selektivität die Säulentemperatur im nächsten Lauf auf 30 °C gesteigert. Hier resultierten schärfere Peaks bei verkürzter Trennzeit und einer geringeren Übergangsfraktion von ca. 250 ml. Nach Reproduktion des Trennergebnisses wurden bei auf 230 ml/min gesteigerter Flussrate jeweils 500 mg der Verbindung aufgereinigt (Abb. 31). Unter diesen Bedingungen war das subjektive Optimum der Trennung erreicht, d.h. die Reinheit der aufgefangenen Fraktionen ging gegen 100 % bei einer akzeptablen Mischfraktion von ca. 400 ml und einer Gesamtlaufzeit der Trennung von unter 40 min. Die gesammelten Fraktionen wurden getrennt einrotiert und die mobile Phase vollständig zurückgewonnen. Aus insgesamt sieben Läufen mit in der Summe 2,55 g (-)-O/W3 (84 % *ee*) wurden 1,72 g praktisch enantiomerenreines (-)-O/W3 (99,8 % *ee*) erhalten, was 72,3 % der theoretischen Ausbeute für das (-)-Enantiomer entspricht. Die zusätzlich angefallenen 134 mg (+)-O/W3 (90,7 % *ee*) wurden zum Trennansatz zur Reinigung von (+)-O/W3 gegeben.

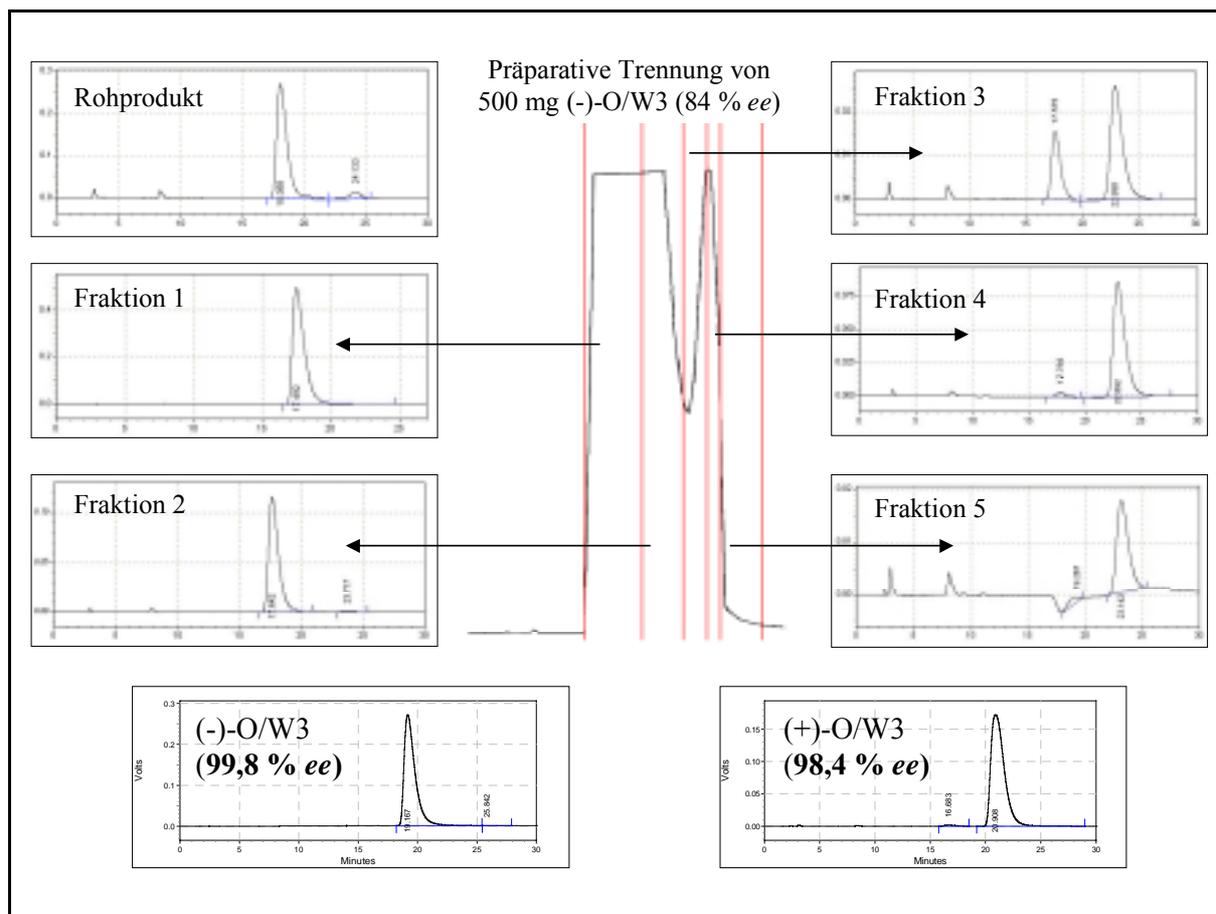


Abb. 31: Originalchromatogramme aus der analytischen Überprüfung der Fraktionen eines Laufes zur chromatographischen Reinigung von 500 mg (-)-O/W3 (84 % ee); chromatographische Reinheiten der Endprodukte aus insgesamt 7 Läufen mit (-)-O/W3 (84 % ee) und 8 Läufen mit (+)-O/W3 (74 % ee)

In die weiteren Trennungen der Verbindungen (+)-O/W3 (74 % ee), (-)-O/W13 (83 % ee) und (+)-O/W13 (79,5 % ee) flossen stets die in der Variation der Trennbedingungen gemachten Erfahrungen aus den vorherigen Läufen mit ein. Die Veränderung von Flussrate, Substanzauftrag und Säulentemperatur hatten immer das Ziel, in der präparativen Trennung möglichst scharfe Peaks bei möglichst kleinen Übergangsfractionen zu erhalten.

Für alle durchgeführten präparativen Trennungen stellten die gewählten Bedingungen einen Kompromiss zwischen erreichter Reinheit, der erzielten Ausbeute und möglichst geringer Anzahl von Trennversuchen und damit geringem Ressourcenverbrauch und Zeitaufwand dar. Dies wird besonders im Fall der Trennungen der nichtracemischen O/W13-Chargen deutlich. Hier konnten in keiner Aufzeichnung eines präparativen Chromatogramms zwei Peaks detektiert werden, da schon in den analytischen Vorversuchen die Bedingungen für eine erfolgreiche präparative Racemattrennung nur unzureichend erfüllt werden konnten. Hier

konnte nur durch gezieltes Schneiden der chromatographischen Bande die vor bzw. hinter dem Hauptpeak laufende Schulter des jeweils anderen Enantiomers abgetrennt und so der Enantiomerenüberschuss auf wenigstens 87 % *ee* angehoben werden. Die Hydrochloride der Enantiomere von O/W3 und O/W13 wurden zur pharmakologischen Prüfung gegeben und dort unter den selben Bedingungen wie ihre Racemate getestet.

Tabelle 12 fasst die erreichten Ergebnisse in der präparativen Chromatographie der nichtrace-mischen Fomocainderivate zusammen.

Verbindung	Einsatz	Auftrag	Läufe	Ausbeute (+)	Ausbeute (-)	α_D^{20}
(+)-O/W3 (74 % <i>ee</i>)	2,32 g	400 mg	8	1,82 g (98,4% <i>ee</i>)	0,18 g (99,8 % <i>ee</i>)	+7,5°
(-)-O/W3 (84 % <i>ee</i>)	2,45 g	550 mg	7	1,72 g (99,9 % <i>ee</i>)	0,13 g (90,7 % <i>ee</i>)	-7,6°
(+)-O/W13 (79,5 % <i>ee</i>)	2,04 g	500 mg	4	1,56 g (87 % <i>ee</i>)	---	+33,3°
(-)-O/W13 (83 % <i>ee</i>)	2,30 g	500 mg	8	1,57 g (87,2 % <i>ee</i>)	---	-33,4°

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ausbeuten aus der chromatographischen Reinigung der Enantiomere von O/W3 und O/W13

3.3. Biopharmazeutische und pharmakologische Untersuchungen

3.3.1. Interaktionen der chiralen Fomocainderivate mit dem CYP-Enzymsystem

3.3.1.1. Abbau von *rac*-O/W3 und *rac*-O/W13 durch Rinderleberhomogenate

Unterschiede in der pharmakologischen Wirkung und Toxizität von Enantiomeren sind einerseits von ihrer eigenen Wirkstärke an den Zielstrukturen abhängig oder aber andererseits das Resultat von stereoselektiven Metabolisierungsvorgängen, die im Organismus zu Aktivierung/Deaktivierung bzw. Giftung/Entgiftung führen können. Um eventuelle Wirkunterschiede der Enantiomere von O/W3 und O/W13 in den pharmakologisch-toxikologischen Versuchen am Ganztier besser deuten zu können, musste die Metabolisierung der Substanzen auf eventuell vorhandene Stereoselektivität untersucht werden. Schon früher konnte nämlich für die strukturell eng verwandten Verbindungen O/G3 und O/G5 gezeigt werden, dass die jeweils linksdrehenden Enantiomere im Abbau durch Leberhomogenate bevorzugt werden [75, 76]. Durch Inkubation der Substanzen mit Rinderleberhomogenaten sollte *in vitro* die hepatische Biotrans-

formation der Racemate von O/W3 und O/W13 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht werden. Aus schlachtfrischer Rinderleber wurden nach einer Standardmethode [99, 124] durch fraktionierte Zentrifugation der 10000 g Überstand und die Mikrosomen gewonnen. Für die gewählten Inkubationszeiten von 0, 10, 20, 30, 45, 60 und 90 min sowie den Blindwert wurde pro Verbindung je ein Inkubationsansatz mit dem 10000 g Überstand und der Mikrosomensuspension hergestellt. Zum Ausschluß nichtenzymatischer Abbauvorgänge wurde ein Vergleichsansatz mit durch Hitzeeinwirkung (80 °C/30 s) denaturiertem Homogenat mitgeführt. Zur Abtrennung der O/W-Verbindungen nach Ende der Inkubation wurden die Ansätze nach Alkalisieren auf pH 10 auf einer mit Extrelut[®] NT (1 g/ml zu extrahierender Lösung) gepackten Säule adsorbiert und die lipophilen Basen mit Diethylether eluiert. Diese Vorgehensweise ersparte die zeitaufwändige Extraktion der Basen durch Ausschütteln mit nachfolgender Trocknung des Extraktionsmittels [125]. Die Etherextrakte wurden nach Eindampfen und Aufnehmen in n-Hexan hplc an der Chiralpak[®] AD-Phase auf ihr Enantiomerenverhältnis untersucht. Aufgrund starker Schwankungen in der extrahierten Substanzmenge durch die ausgepögte Proteinbindung der Substanzen sowie Unregelmäßigkeiten in der Säulenpackung (Wiederfindungsraten zwischen 20 und 105 %) eignete sich die gewählte Methode nicht zur quantitativen Bestimmung der zum Zeitpunkt X noch vorhandenen Substratmenge und erlaubte somit keine Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit. Jedoch ließ sich über die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses erkennen, welches Enantiomer ggf. bevorzugt von den im Leberhomogenat enthaltenen Enzymen umgesetzt wurde. Sowohl im 10000 g Überstand als auch bei der Inkubation mit Mikrosomen änderte sich das Enantiomerenverhältnis der noch nicht metabolisierten Substanz im Laufe von 90 min zuungunsten des (+)-Enantiomers, das demzufolge bei Gabe des Racemates schneller abgebaut wurde als sein Antipode. Im 10000 g Überstand mit seiner größeren Breite an metabolisierenden Enzymen und insgesamt höheren Aktivitäten aufgrund der kürzeren Belastungen des Präparates bei dessen Gewinnung war diese Tendenz deutlicher ausgeprägt als in den Versuchen mit Mikrosomen. Abb. 32 zeigt die Entwicklung der Enantiomerenverhältnisse von O/W3 und O/W13 - ausgedrückt als Verhältnis der Peakflächen im Chromatogramm - über den Versuchszeitraum von 90 min. Es ist davon auszugehen, dass die Metabolisierungsgeschwindigkeiten bei Gabe der reinen Enantiomere höher sind, als bei Gabe des Racemates, da hier keine (wahrscheinlich kompetitiven) Konkurrenzreaktionen der Enantiomere um die Enzyme auftreten.

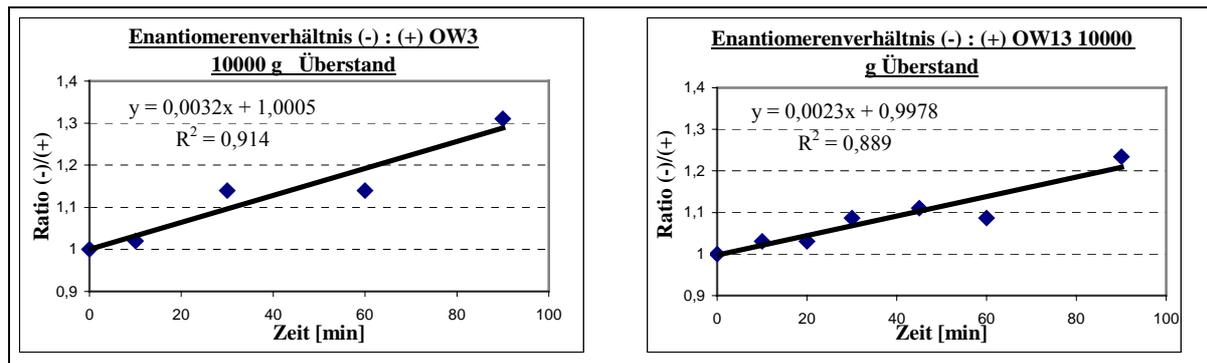


Abb. 32: Enantiomerenverhältnisse (ausgedrückt als Verhältnisse der Peakflächen (+) : (-)) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit beim Abbau von *rac*-O/W3 und *rac*-O/W13 durch 10000 g Überstände

Die für O/W3 und O/W13 beobachteten Stereoselektivitäten in der Metabolisierung sind zwar messbar, aber von zu geringem Ausmaß, um als alleinige Erklärung für pharmakologische Unterschiede zwischen den Enantiomeren dienen zu können, zumal ja die lokale Anwendung den üblichen Applikationsweg für LA darstellt. Einzig die schnellere Bildung toxischer Metabolite oder die schnellere Entgiftung des jeweiligen rechtsdrehenden Enantiomers könnte zu unterschiedlichen Toxizitäten der Enantiomere bei systemischer Applikation führen. Die Qualifizierung und Quantifizierung des Metabolismus der chiralen Fomocaine war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die extrem hohe Plasmaeiweißbindungsrate (PEB) von über 99,5 % für O/W3 und O/W13 machte weiterführende Untersuchungen zu einer durchaus möglichen stereoselektiven Differenzierung in der PEB der Enantiomere unnötig.

3.3.1.2. Interaktionen der chiralen Fomocainderivate mit CYP-Isoenzymen aus Rattenlebermikrosomen *in vitro*

Ein Großteil der Phase-I-Reaktionen in der Biotransformation von Xenobiotika wird durch CYP-Isoenzyme katalysiert. Am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena wurden Experimente zum *in-vitro*-Interaktionspotential der chiralen Fomocainderivate mit einigen CYP-Subfamilien sowie die indirekte Beeinflussung einiger CYP-abhängiger Oxidasefunktionen an Rattenleberpräparaten untersucht (Tabelle 13) [126]. Als Referenz wurde für alle Versuche die Leitsubstanz Fomocain mitgeführt.

Test	Modellreaktion	CYP
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	1A
ECOD	Ethoxycumarin-O-Deethylierung	1A, 2A, 2B, 2C
PROD	Pentoxyresorufin-O-Depentylierung	2B
EMND	Ethylmorphin-N-Demethylierung	3A
LCCL	stimulierte mikrosomale lucigeninverstärkte Chemilumineszenz	
LMCL	stimulierte mikrosomale luminolverstärkte Chemilumineszenz	
LPO	NADPH-/Fe ²⁺ stimulierte Lipidperoxidation	
WBCL	luminolverstärkte Chemilumineszenz in Vollblut	
H ₂ O ₂	stimulierte H ₂ O ₂ -Bildung	

Tabelle 13: Modellreaktionen zur Bestimmung des Interaktionspotentials der chiralen Fomocainderivate mit dem CYP-Enzymsystem

Die chiralen Fomocainderivate hemmten in den Tests konzentrationsabhängig die Umsetzung der jeweiligen Substrate. Dabei ließen sich klare Struktur-Effekt-Beziehungen innerhalb der homologen Reihen erkennen (Abb. 33). Mit wachsender Substituentengröße nahm in beiden Serien die Affinität zu CYP-Isoenzymen im Vergleich zu Fomocain ab. Als Ursache hierfür kommt eine sterische Hemmung durch die sperrigen Alkylketten beim Transport zur Bindungstasche und/oder bei der Bindung an das katalytische Zentrum der Enzyme in Frage. Besonders im EROD-Test war dieser Effekt bei den 3-substituierten chiralen Fomocainderivaten stärker ausgeprägt als bei den 2-substituierten, was auf eine Beteiligung des Morpholinstickstoffes bei der Bindung von Fomocain und seinen Derivaten an CYP-Isoenzyme hindeutete. Im PROD-Test wurde durchgehend (Tabelle 14) das größte Interaktionspotential der chiralen Fomocaine mit der CYP2B-Subfamilie festgestellt, was gleichzeitig bedeuten könnte, dass die Verbindungen aus der Gruppe der Fomocaine vornehmlich über Isoenzyme dieser Unterfamilie metabolisiert werden. Das geringste Interaktionspotential wurde im EMND-Test für die CYP3A-Subfamilie gefunden. Dieser Befund verspricht für die Fomocaine ein erhöhtes Maß an Arzneimittelsicherheit, da gerade über einige Isoenzyme der Unterfamilie 3A (besonders CYP3A4) eine Vielzahl von Arzneistoffen biotransformiert wird, wie z.B. die Ca²⁺-Antagonisten Verapamil und Diltiazem, die Antiepileptika Phenytoin und Carbamazepin, die Makrolidantibiotika Erythromycin und Clarithromycin, einige Statine und HIV-Protease-Inhibitoren u.v.a.m [127].

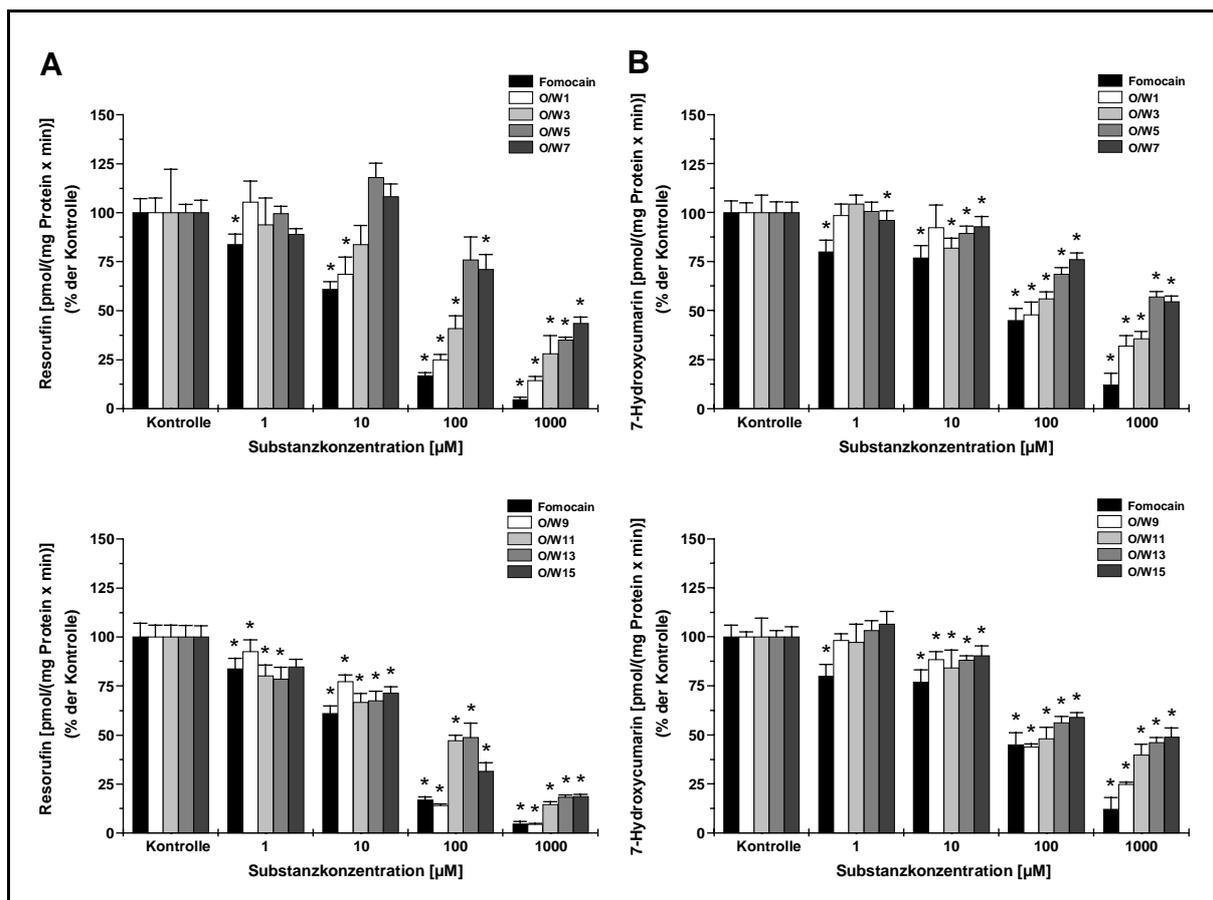


Abb. 33: Ergebnisse des EROD- (A) und des ECOD-Tests (B) für die chiralen Fomocain-derivate (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p = 0,05$)

Den chiralen Fomocainen kamen keine indirekten antioxidativen Eigenschaften im LMCL- und H_2O_2 -Test (Abb. 34A) zu. Geringfügig mit einem Maximum des Effektes für O/W13 wurde die lucigeninverstärkte Chemilumineszenz (LCCL) gehemmt. Die Verbindungen mit einer Alkylkette am C-3 des Morpholins hemmten die der Lipidperoxidation (LPO) vorgeschalteten CYP-Isoenzyme deutlich stärker als die 2-substituierten Fomocainderivate (Abb. 34B). Bei der Bestimmung der luminolverstärkten Chemilumineszenz im Vollblut wurden maximale Hemmeffekte für O/W3 und O/W13 gefunden. Generell ließen sich außer der klaren Diskriminierung zwischen der 2- und der 3-substituierten Serie für die antioxidativen Eigenschaften keine deutlichen Struktur-Effekt-Beziehungen innerhalb der homologen Reihen ableiten.

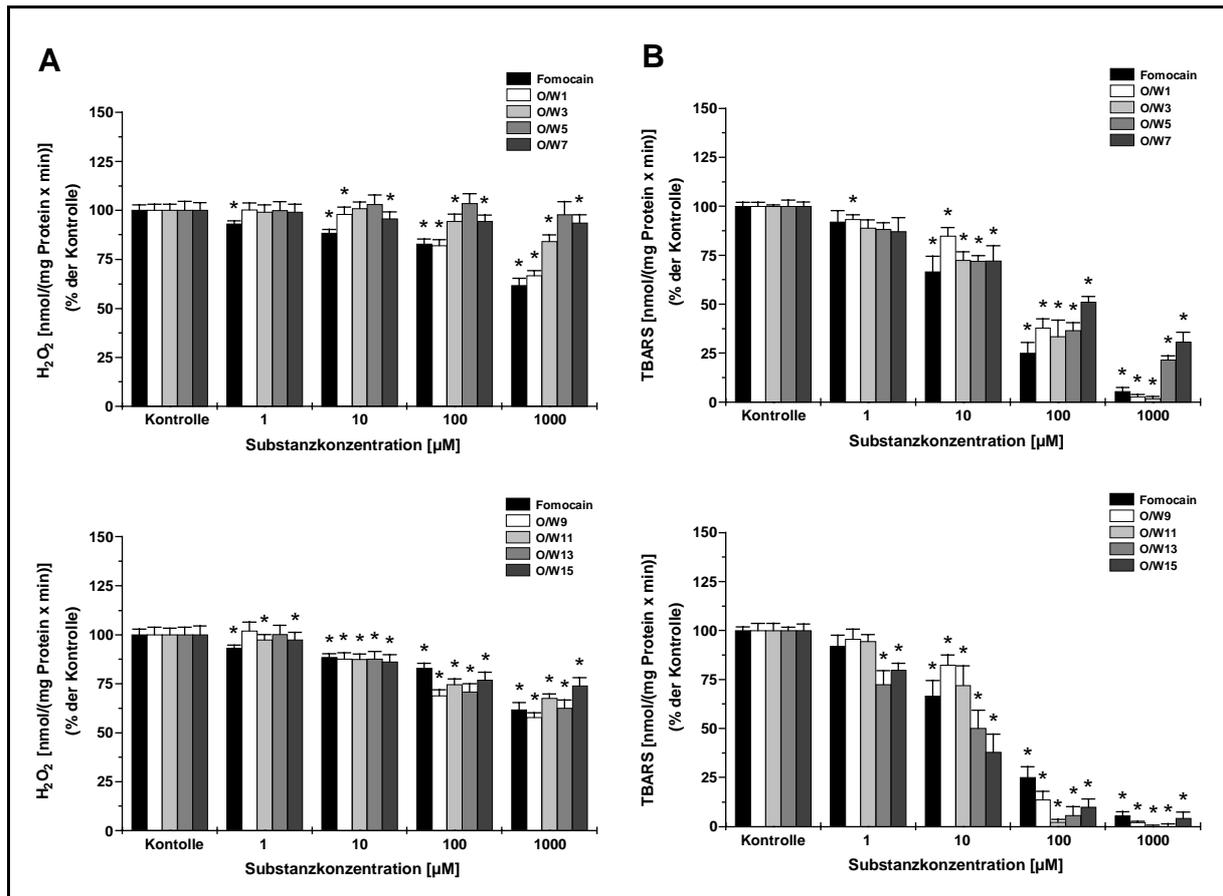


Abb. 34: Ergebnisse des H_2O_2 - (A) und des LPO-Tests (B) für die racemischen chiralen Fomocainderivate (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, $p = 0,05$)

Der sprunghafte Abfall der Hemmstärke beim Wechsel von der Propylsubstitution bei O/W5 auf die Butylsubstitution bei O/W7 im LCCL- und LPO-Test deutet auf einen „cut-off“ in der Interaktion der 2-substituierten chiralen Fomocaine mit CYP-vermittelten Oxidasefunktionen hin. Tabelle 14 fasst die erhobenen Daten für die Versuche mit einer Testsubstanzkonzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ zusammen.

Substanz	CYP-vermittelte Monooxygenasefunktionen				CYP-vermittelte Oxidasefunktionen				WBCL
	EROD	ECOD	PROD	EMND	LCCL	LMCL	H ₂ O ₂	LPO	
Fomocain	17,0 ± 1,4 *	45,1 ± 6,0 *	10,4 ± 1,3 *	76,3 ± 2,5 *	62,4 ± 5,1 *	86,0 ± 9,1 *	83,0 ± 2,4 *	25,1 ± 5,4 *	102,1 ± 6,2
O/W1	25,1 ± 2,6 *	47,9 ± 6,3 *	11,3 ± 1,6 *	81,2 ± 4,7 *	70,3 ± 4,3 *	90,0 ± 6,7 *	82,1 ± 2,9 *	37,9 ± 4,6 *	36,3 ± 6,1 *
O/W3	40,9 ± 6,4 *	56,1 ± 3,5 *	8,3 ± 2,0 *	81,5 ± 3,8 *	54,4 ± 4,3 *	99,9 ± 7,7	94,5 ± 3,5 *	33,5 ± 8,4 *	28,0 ± 9,7
O/W5	76,0 ± 11,5 *	68,7 ± 3,3 *	21,4 ± 1,7 *	90,3 ± 3,7 *	56,0 ± 13,8 *	103,6 ± 7,0	103,7 ± 4,7	36,6 ± 4,0 *	60,7 ± 9,2 *
O/W7	71,0 ± 7,6 *	76,0 ± 3,3 *	31,1 ± 2,4 *	85,8 ± 3,0 *	77,5 ± 7,0 *	105,5 ± 10,1	94,5 ± 3,2 *	51,1 ± 2,8 *	63,8 ± 8,4 *
O/W9	14,0 ± 0,8 *	43,8 ± 1,7 *	9,9 ± 1,1 *	80,7 ± 3,6 *	44,5 ± 5,0 *	85,4 ± 7,6 *	68,9 ± 3,1 *	13,7 ± 4,3 *	49,1 ± 9,1 *
O/W11	47,1 ± 2,9 *	48,0 ± 5,9 *	5,3 ± 0,5 *	81,0 ± 3,1 *	51,2 ± 2,1 *	86,4 ± 9,8 *	74,7 ± 2,8 *	2,2 ± 1,3 *	18,7 ± 6,7 *
O/W13	48,9 ± 7,1 *	56,3 ± 3,2 *	6,4 ± 0,5 *	75,1 ± 6,2 *	27,1 ± 3,6 *	88,3 ± 7,1 *	70,9 ± 4,0 *	5,7 ± 4,4 *	2,3 ± 4,1 *
O/W15	31,5 ± 4,4 *	58,9 ± 2,4 *	4,1 ± 1,1 *	85,2 ± 5,9 *	33,5 ± 6,9 *	87,6 ± 7,6 *	76,9 ± 3,9 *	9,9 ± 4,1 *	60,7 ± 7,4 *

Tabelle 14: Zusammenfassung der Daten aus den *in-vitro*-Versuchen mit den chiralen Fomocainderivaten zur Interaktion mit dem CYP-Enzymsystem [100 µM, n = 6]; alle Angaben in % der Kontrollwerte (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p = 0,05)

Bei der Bestimmung der Interaktionsstärken der Enantiomere von O/W3 und O/W13 mit den CYP-vermittelten Monooxygenase- und Oxidasefunktionen konnten klare Stereoselektivitäten in den Interaktionen festgestellt werden. So hemmte (+)-O/W3 durchgehend in stärkerem Ausmaß den Umsatz der jeweiligen Substrate als (-)-O/W3 mit Selektivitäten von 1 : 1,10 im EMND- bis zu 1 : 1,56 im EROD-Test. Bei der Ermittlung der antioxidativen Eigenschaften konnten ebenfalls stärkere Interaktionen des rechtsdrehenden Enantiomers mit den vorgeschalteten CYP-Isoenzymen festgestellt werden (Abb. 35).

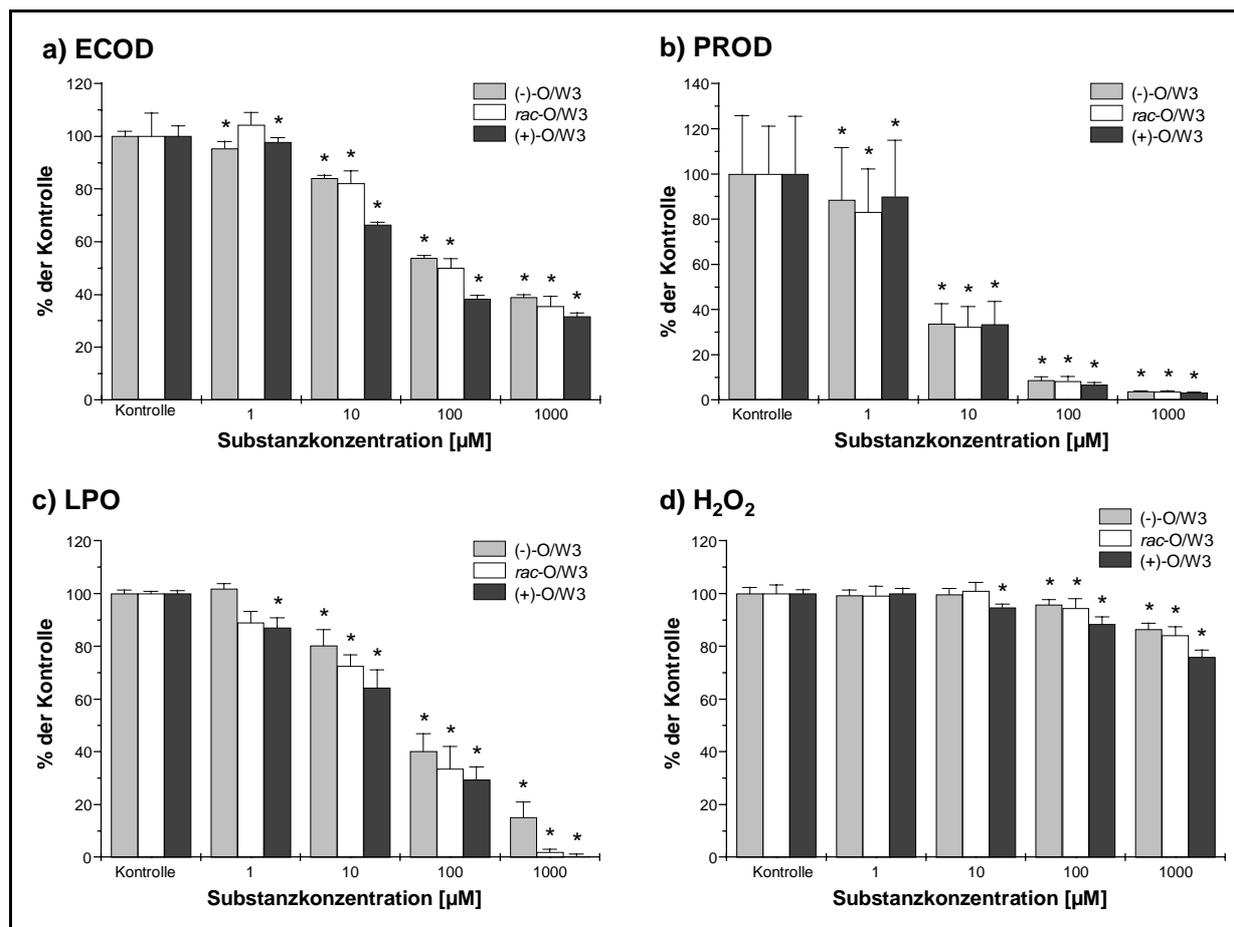


Abb. 35: Ergebnisse des ECOD- (a), PROD- (b), LPO- (c) und H₂O₂-Tests (d) für die Enantiomere von O/W3 im Vergleich zum Racemat (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p = 0,05)

Mit umgekehrter Stereoselektivität interagierten die Enantiomere des 3-substituierten chiralen Fomocainderivats O/W13 mit den CYP-Isoenzymen (Abb. 36). Hier war das (-)-Enantiomer mit einer Selektivität von 1,23 : 1 im EMND- bzw. 1,25 : 1 im ECOD-Test der stärkere Inhibitor für die entsprechenden Enzymfamilien. Praktisch keine Stereoselektivität konnte im EROD- und im PROD-Test gefunden werden. Die antioxidativen Eigenschaften von (-)-O/W13 im H₂O₂- und LPO-Test übertrafen die von (+)-O/W13 um ca. 30%.

Tabelle 15 fasst die aufgenommenen Werte für die Interaktionen der Enantiomere von O/W 3 und O/W13 mit CYP-Isoenzymen in den ausgewählten Modellreaktionen zusammen und führt die dabei bestimmten Stereoselektivitäten auf.

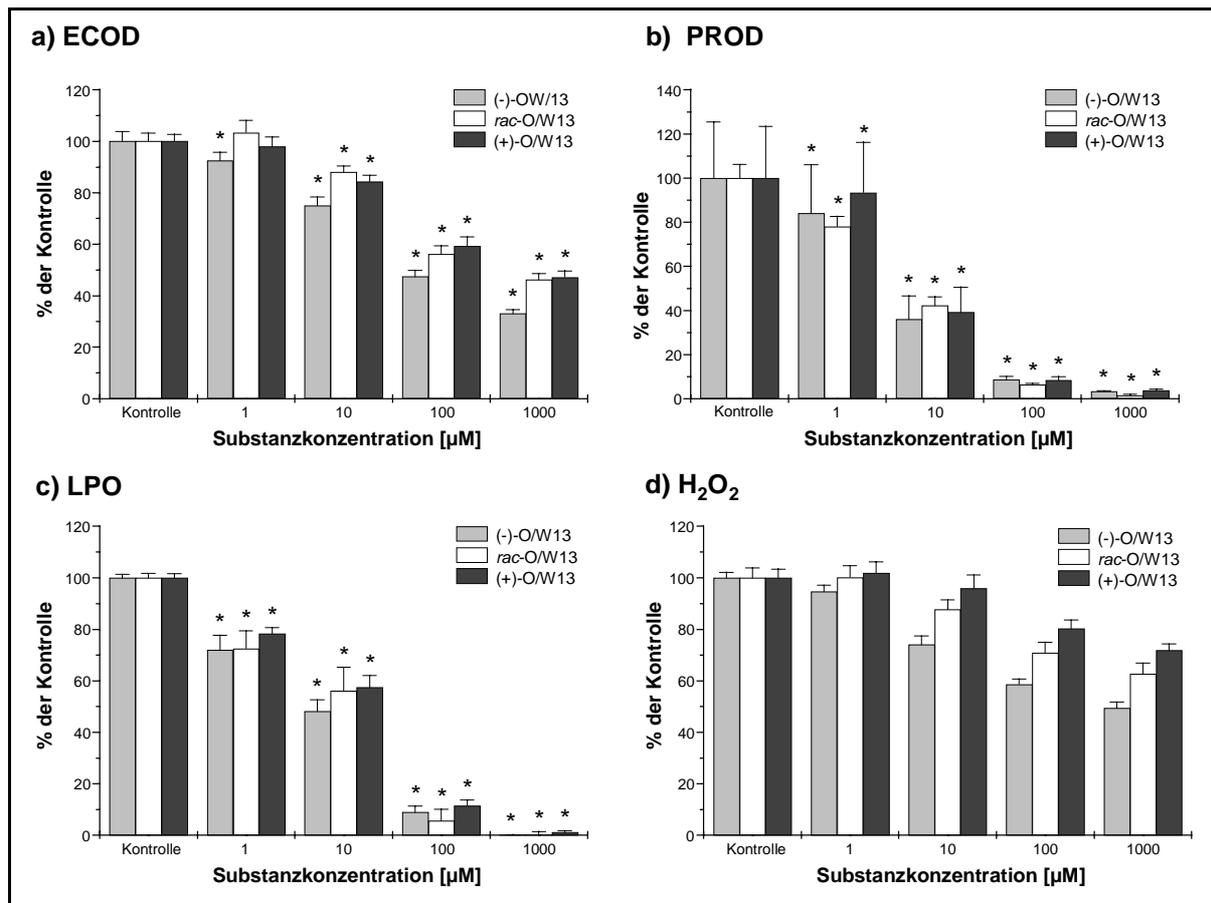


Abb. 36: Ergebnisse des ECOD- (a), PROD- (b), LPO- (c) und H₂O₂-Tests (d) für die Enantiomere von O/W13 im Vergleich zum Racemat (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p = 0,05)

Die *in-vitro*-Versuche zum Interaktionspotential der chiralen Fomocainderivate und der Enantiomere von O/W3 und O/W13 mit CYP-Isoenzymen bestätigten die ersten Befunde aus der Bestimmung des Abbaus von *rac*-O/W3 und *rac*-O/W13 durch Rinderleberhomogenate. Es konnten in beiden Modellen geringe Stereoselektivitäten im Metabolismus der chiralen Fomocaine nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus den Abbauversuchen deuten jeweils auf eine Bevorzugung des rechtsdrehenden Enantiomers in den Phase-I-Reaktionen hin. Die für (-)-O/W13 gefundene stärkere Hemmung von Isoenzymen der CYP-Subfamilien 1A, 2A, 2B, 2C und 3A steht dazu nicht im direkten Gegensatz, da eine Hemmung der Umsetzung eines Modellsubstrates nicht zwangsläufig auf einen eigenen Abbau des Inhibitors hinweist. Neben der kompetitiven Hemmung des Enzyms durch Konkurrenz des Inhibitors mit dem Substrat um die Bindungsstelle am Protein bestehen durch einen nichtkompetitiven oder einen allosterischen Mechanismus weitere Möglichkeiten zur Interaktion. Die durchgeführten

Versuche lassen jedoch keine Aussage über die Art der Wechselwirkungen der chiralen Fomocainderivate mit dem CYP-Enzymsystem zu.

Substanz	CYP-vermittelte Monooxygenasefunktionen				CYP-vermittelte Oxidasefunktionen	
	EROD	ECOD	PROD	EMND	H ₂ O ₂	LPO
(-)-O/W3	28,2 ± 3,7 *	53,9 ± 2,4 *	9,5 ± 1,8 *	77,6 ± 7,2 *	95,9 ± 1,2 *	40,4 ± 17,3 *
(+)-O/W3	18,1 ± 3,1 *	38,4 ± 3,0 *	7,4 ± 1,4 *	70,5 ± 4,8 *	88,2 ± 4,4 *	29,5 ± 12,1 *
Selektivität (-) : (+)	1 : 1,56	1 : 1,4	1 : 1,29	1 : 1,10	1 : 1,09	1 : 1,37
(-)-O/W13	17,2 ± 3,3 *	47,4 ± 2,9 *	9,4 ± 1,8 *	68,9 ± 4,8 *	58,8 ± 6,6 *	8,9 ± 5,8 *
(+)-O/W13	17,1 ± 1,7 *	59,1 ± 6,0 *	8,8 ± 1,3 *	84,5 ± 8,8 *	80,5 ± 8,0 *	11,4 ± 5,0 *
Selektivität (-) : (+)	1 : 1	1,25 : 1	1 : 1,06	1,23 : 1	1,37 : 1	1,28 : 1

Tabelle 15: Zusammenfassung der Daten aus den *in-vitro*-Versuchen mit den Enantiomeren von O/W3 und O/W13 zur Interaktion mit dem CYP-Enzymsystem [100 µM, n = 6]; alle Angaben in % der Kontrollwerte (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p = 0,05)

3.3.2. Untersuchungen zur Lokalanästhesie und Toxizität der chiralen Fomocainderivate an Ratten

3.3.2.1. Pharmakologie und Toxikologie der Racemate der chiralen Fomocainderivate

Für die Durchführung der pharmakologischen Prüfungen konnte innerhalb der FSU die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fleck gewonnen werden. Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung der Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen vor.

Die pharmakologischen Tests am Ganztier haben den Vorteil, dass die Wirkung einer Substanz auf einen komplexen Organismus studiert werden kann. Pharmakokinetische Einflüsse, die zu Wirkungsverlust durch z.B. schlechte Bioverfügbarkeit oder exzessive Metabolisierung führen können, werden schnell erkannt. Nachteilig ist hierbei aber die durch die

biologische Variabilität bei Versuchen am Ganztier bedingte deutlich vergrößerte Streuung der Meßwerte, so dass eventuell nur geringe Unterschiede zwischen den Testsubstanzen im Rauschen verschwinden können. Zur Ermittlung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften der chiralen Fomocaine (Hydrochloride) wurden etablierte Methoden zur Bestimmung der oberflächenanästhetischen Wirkung an der Cornea [128] gegen die Vergleichssubstanzen Tetracain- und Fomocain-HCl, der Leitungsanästhesie und der Parese am N. ischiadicus gegen Procain- und Fomocain-HCl [129] sowie der LD₅₀ nach intraperitonealer Injektion [130] an weiblichen Wistarratten (Han:WIST) angewandt. Die schlechte Wasserlöslichkeit der Hydrochloride erwies sich bei allen Versuchen als Hindernis bei der Bestimmung der pharmakologischen Parameter, da es nicht möglich war, die Salze in Wasser oder Puffer in den für die Testungen erforderlichen Konzentrationen zu lösen. In der Zwischenzeit gelang es zwar innerhalb der Arbeitsgruppe Oelschläger, für Fomocain eine Formulierung zu entwickeln, die es erlaubte, die Base zu über 4 % (m/V) in Lösung zu halten [99]. Jedoch stand die Erkenntnis über das Prinzip des Einschlusses von Fomocain in β -Hydroxy-propyl-cyclodextrin zu Beginn der Arbeiten noch nicht zur Verfügung. So wurden die Testsubstanzen zur pharmakologischen Testung in Form ihrer Hydrochloride in Tylose (0,5 % m/V in Wasser) kolloidal in Lösung gebracht. Dieses Prinzip musste wegen der Vergleichbarkeit der Daten dann auf alle Testsubstanzen angewendet werden, auch wenn sich eine Propylenglycol-Wassermischung im Verhältnis 1:1 bei späteren Versuchen mit O/W7, O/W13 und O/W15 als tauglich erwies, wenigstens kurzzeitig stabile Lösungen der Substanzen herzustellen. Abb. 37 zeigt eine Zusammenstellung der in Tylose erhobenen Daten für die chiralen Fomocaine. Der Bezugswert der Darstellungen ist dabei die effektive Substanzkonzentration (m/V), die zu einem 20minütigen Effekt im jeweiligen Experiment führte (EC_{20 min}).

In der Oberflächenanästhesie an der Rattencornea führte die unverzweigte Alkylsubstitution am basischen Molekülteil des Fomocain mit wachsender Kettenlänge zu geringeren EC_{20 min}-Werten also zu einer Wirkungssteigerung. O/W7 und O/W13 benötigten sogar nur weniger als die Hälfte der Konzentration des Referenzoberflächenanästhetikums Tetracain zum Aufrechterhalten einer 20minütigen Anästhesie. Die Wirksamkeiten der methyl-, ethyl- und isopropylsubstituierten chiralen Fomocaine liegen in der Größenordnung der Muttersubstanz. Bei der Bewertung der Ergebnisse sind die physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen mit einzubeziehen. Mit steigender Molmasse sinken die pK_s- und Trübungs-pH-Werte, verschlechtern sich die Löslichkeiten der Basen und ihrer Salze in Wasser und wachsen die lgD-Werte der Verbindungen. So liegt es durchaus im Bereich des Möglichen, dass im Verlauf der Versuche die höher substituierten Verbindungen bei Kontakt mit der Tränen-

flüssigkeit des Rattenauges in stärkerem Maße aus der Lösung ausfielen als die Verbindungen mit kürzeren Alkylketten und so am Wirkort ein Wirkstoffdepot durch Ausbildung eines Films auf der Hornhaut und/oder durch die erhöhte Lipidlöslichkeit verlängerte Verweildauer in den Zellmembranen legten. Dieser Depoteffekt trug unter Umständen wenigstens teilweise zu der deutlichen Erhöhung der Wirkstärke bei O/W7 und O/W13 bei.

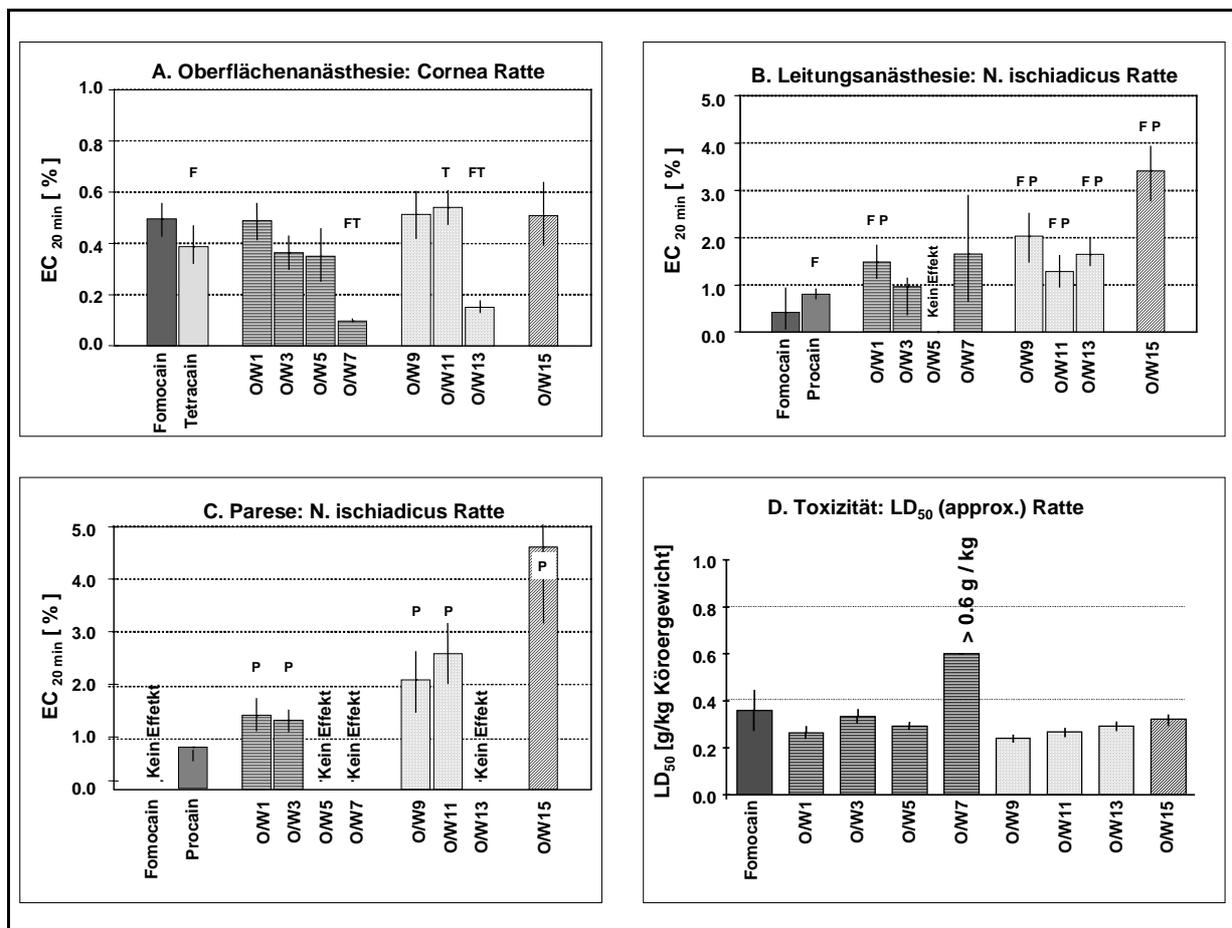


Abb. 37: Zusammenfassung der Ergebnisse der pharmakologischen und toxikologischen Versuche mit den Racematen der chiralen Fomocainderivate an Ratten (Konzentrationsangaben in % m/V oder mg der Hydrochloride); (**P**, **T**, **F** signifikanter Unterschied zur Referenzsubstanz Procain, Tetracain Fomocain)

In der Leitungsanästhesie am N. ischiadicus der Ratte ließen sich innerhalb einer homologen Reihe keinerlei Struktur-Wirkungsbeziehung erkennen. Es fiel jedoch auf, dass die Alkylsubstitution am Morpholin zu einer Verschlechterung der pharmakologischen Eigenschaften des Fomocain führte. Einzig die Verbindung O/W3 lag in ihrer leitungsanästhetischen Potenz etwa in der Größenordnung der Vergleichssubstanz Procain.

Die Muttersubstanz Fomocain löste keine Parese aus, d.h. es konnten keine Lähmungserscheinungen unter Ausbleiben der Leitungsanästhesie am jeweiligen linken Hinterlauf der Ratten, in den die Testlösungen injiziert wurden, beobachtet werden. Abweichend davon lösten die methyl- und ethylsubstituierten chiralen Fomocaine konzentrationsabhängig eine Parese aus, wobei im Vergleich der homologen Reihen die 2-substituierten chiralen Fomocainderivate diese Nebenwirkung schon bei etwa der halben Konzentration der 3-substituierten Verbindungen hervorriefen. Die Konzentrationen, die zu einer 20minütigen Parese führten, lagen in der selben Größenordnung wie sie zum Erreichen einer ebensolange andauernden Leitungsanästhesie nötig waren. Ab einer unverzweigten Propylsubstitution wurde für die chiralen Fomocainderivate keine Parese mehr beobachtet.

Die geringe Toxizität der Muttersubstanz blieb von der Einführung eines Chiralitätszentrums durch Alkylsubstitution des Morpholinrings weitgehend unberührt. Die LD₅₀-Werte sanken leicht von 1,029 mmol/kg KG auf ca. 0,750 (0,660 - 0,886) mmol/kg KG. In der 2-substituierten Serie wurden keine Korrelationen der Toxizität mit der Struktur oder der lokal-anästhetischen Wirksamkeit festgestellt. In der 3-substituierten homologen Reihe sank die Toxizität leicht mit wachsender Größe des Alkylrestes. In die Betrachtungen wurde die molare LD₅₀ [mmol/kg KG] mit einbezogen, da sich die Werte für die massebezogene LD₅₀ [mg/kg KG] innerhalb einer Reihe von Verbindungen mit wachsenden molaren Massen nicht vergleichen lassen (Tabelle 16).

Verbindung	LD ₅₀ [mg/kg KG]	LD ₅₀ [mmol/kg KG]
Fomocain-HCl	358	1,029
O/W1-HCl	264	0,729
O/W3-HCl	333	0,886
O/W5-HCl	293	0,751
O/W7-HCl	> 600*	> 1,500*
O/W9-HCl	239	0,660
O/W11-HCl	266	0,708
O/W13-HCl	293	0,751
O/W15-HCl	322	0,826

Tabelle 16: Werte für die LD₅₀ (Ratte) der Hydrochloride der racemischen chiralen Fomocainderivate in Tylose (* Erläuterung im Text)

Die im Vergleich zu den anderen Verbindungen extrem hohe LD₅₀ für O/W7 muss als Artefakt angesehen werden. Der Versuch zur Bestimmung der LD₅₀ wurde bei einer Dosis von 600 mg/kg KG abgebrochen, da kein Tier auf die Injektion reagierte. Es hatte den Anschein, als ob die i.p. verabreichten Dosen nicht systemisch verfügbar gewesen wären. Die Substanz

wies von allen synthetisierten Verbindungen die ungünstigsten physikochemischen Eigenschaften auf. Bei der Injektion eines kleinen Volumens der hochkonzentrierten Prüflösung in die Bauchhöhle einer Ratte kam die Zubereitung mit einem Milieu von pH 7,4 bei geringem Flüssigkeitsangebot zur Verdünnung in Kontakt. Aufgrund des niedrigen Trübungs-pH-Wertes von O/W7 und seiner geringen Basenlöslichkeit kann davon ausgegangen werden, dass die Substanz - wie es bereits bei der Muttersubstanz Fomocain beobachtet werden konnte [131] - in der Bauchhöhle ausfiel, deshalb nur in geringem Umfang resorbiert wurde und so keine toxische Wirkung auf das Versuchstier ausüben konnte. Der für die Aufrechterhaltung einer langen Oberflächenanästhesie positive Effekt einer Depotbildung machte hier also eine korrekte Bestimmung der Toxizität von O/W7 unter den für alle anderen Verbindungen angewandten Bedingungen unmöglich.

In allen pharmakologischen Versuchen erwies sich die verzweigte Alkylsubstitution am C-3 des Morpholins in O/W15 als nachteilig für die lokalanästhetischen Eigenschaften des chiralen Fomocainderivats. Analog zu den in der Racemattrennung an drei verschiedenen CSP gemachten Beobachtungen ähnelte O/W15 in seinen pharmakologischen Eigenschaften eher dem 3-ethylsubstituierten O/W11 als der isomeren Verbindung O/W13. Dieser Befund konnte nicht auf die physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen zurückgeführt werden, wo sich die strukturelle Verwandtschaft von O/W13 und O/W15 in ähnlichen Werten ausdrückt. Fasst man die Polysaccharide der eingesetzten CSP ebenso wie das Protein des Na⁺-Kanals als chirale Zielstrukturen für die Fomocainderivate auf, kann aus den Ergebnissen der Schluss gezogen werden, dass die Interaktion der Testsubstanzen mit den Zielstrukturen eher von der Kettenlänge des Substituenten als von seiner Raumerfüllung abhängig ist.

Aufgrund der eingangs geschilderten Löslichkeitsprobleme der Testsubstanzen wurden andere Lösungsmittel für die pharmakologischen Prüfungen getestet. Starben beim Einsatz von reinem Propylenglycol als Lösungsmittel noch alle Versuchstiere an einer Glycolvergiftung, erwies sich eine 1:1-Mischung von Propylenglycol und Wasser als verträglich und im Hinblick auf eine lokalanästhetische Wirkung pharmakologisch indifferent. Für die am schlechtesten löslichen Verbindungen O/W7, O/W13 und O/W15 wurden daher die pharmakologischen Daten in diesem Lösungsmittel im Vergleich zu den Tylosezubereitungen erneut erhoben. Während die oberflächenanästhetischen Eigenschaften weitgehend unverändert blieben, hatte der Wechsel des Lösungsmittels dramatische Auswirkungen auf die Leitungsanästhesie der Verbindungen (Tabelle 17).

Da Propylenglycol keine eigene lokalanästhetische Wirksamkeit aufweist, ist die Vervielfachung der Anästhesiedauer bei gleicher Substanzkonzentration auf die höhere Löslichkeit

der Testsubstanzen in der Propylenglycol-Wassermischung zurückzuführen. Bevor das Lösungsmittel nach der Injektion durch Gewebsflüssigkeiten verdünnt wurde, stand eine größere Substanzmenge als im Vergleich zu den Tylosezubereitungen zur Diffusion zum Wirkort zur Verfügung, aus denen die Verbindungen offensichtlich schneller und stärker an der Injektionsstelle ausfielen und so nicht zur Unterdrückung der Reizleitung zur Verfügung standen.

Verbindung	c in % (m/V)	Anästhesiedauer T [min]	Anästhesiedauer P [min]
O/W7-HCl	2	18 ± 5,0	67 ± 3,0
	3	32 ± 6,5	113 ± 1,5
O/W13-HCl	0,75	k. E.	29 ± 3,9
	1	5 ± 0,3	96 ± 4,9
O/W15-HCl	3	17 ± 2,4	45 ± 6,8
	4	28 ± 8,8	113 ± 12,6

Tabelle 17: Vergleich der Effekte in der Leitungsanästhesie durch Lösungen von O/W7, O/W13 und O/W15 gleicher Konzentration in Tylose (0,5 %) (**T**) oder Propylenglycol (50 %) (**P**)

Die Abstufung der Wirkstärken in der Propylenglycol-Wassermischung blieb jedoch erhalten, so dass eine Vergleichbarkeit der Testsubstanzen untereinander auf der Basis der mit den Tyloselösungen gefundenen Daten gewährleistet erschien. Die ermittelten Absolutwerte sind aber wegen der beschriebenen Löslichkeitsprobleme wenig verlässlich, so dass mit einer abschließenden Bewertung der absoluten Wirkstärken der chiralen Fomocainderivate auf das Vorliegen einer geeigneten Formulierung für die pharmakologischen Prüfungen - z.B. Einschlussverbindungen in β -Hydroxypropylcyclodextrin nach [99] - gewartet werden muss. Die Galenik von Fomocain und seinen Derivaten stellt jedoch ein Problem eigener Art dar und konnte damit nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

3.3.2.2. Pharmakologie und Toxikologie der Enantiomere von O/W3 und O/W13

In der zusammenfassenden Auswertung aller biopharmazeutischen und pharmakologisch-toxikologischen Experimente stellten sich O/W3 und O/W13 als die interessantesten Racemate heraus, da mit diesen Verbindungen unter Erhaltung der geringen Toxizität des Fomocain eine verbesserte Oberflächenanästhesie (O/W13), vergleichbare Leitungsanästhesie bei nur geringer (O/W3) bzw. ausbleibender (O/W13) Parese und eine geringere Inter-

aktionsneigung mit verschiedenen CYP-Enzymfamilien erreicht wurde. Die beiden Racemate wurden daher in ihre Enantiomere getrennt und erneut den pharmakologischen Prüfungen unterworfen. Als Lösungsmittel für die Testsubstanzen wurde die Propylenglycol-Wassermischung 1:1 eingesetzt.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Racemat in Tylose lösten die O/W3-Enantiomere keine Parese nach Injektion in die Nähe des N. ischiadicus aus. Abb. 38 zeigt die $EC_{20\text{min}}$ -Werte der Enantiomere im Vergleich zu Fomocain und den Standards Tetracain und Procain in der Oberflächen- und Leitungsanästhesie.

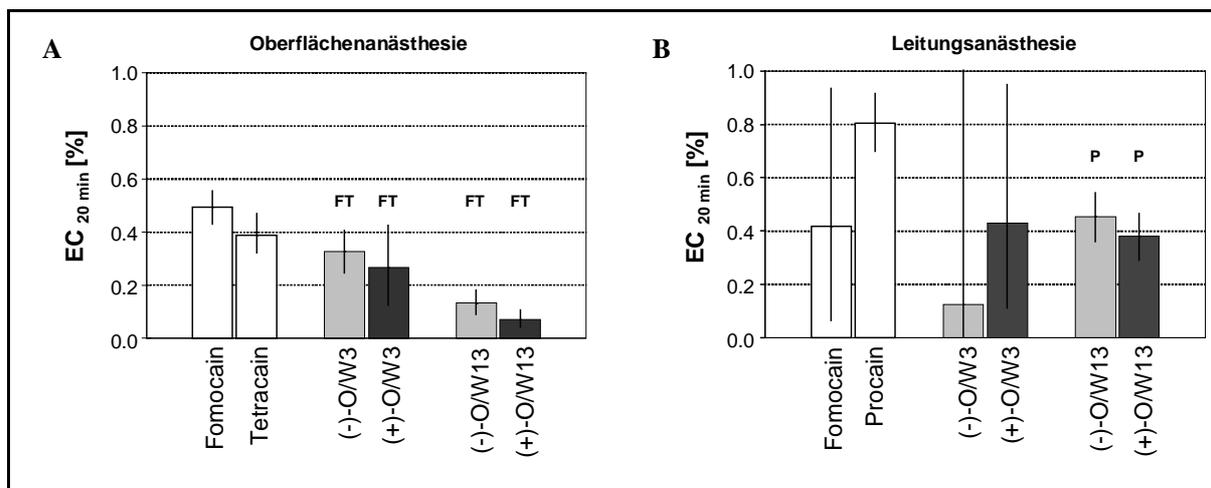


Abb. 38: Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur Oberflächen- und Leitungsanästhesie mit den Enantiomeren von O/W3 und O/W13

In der Oberflächenanästhesie war für beide Enantiomere eine Tendenz zugunsten der rechtsdrehenden Enantiomere der beiden Paare zu erkennen. Alle getesteten Enantiomere waren hier der Muttersubstanz und der Referenz Tetracain signifikant überlegen. Die starke Streuung der Messwerte bei der Bestimmung der Leitungsanästhesie ließ jedoch keine statistisch sichere Aussage über die Überlegenheit eines Enantiomers zu. Jedoch lag die Wirkstärke der O/W13-Enantiomere in der Größenordnung des Fomocain und betrug damit ca. das Doppelte der leitungsanästhetischen Potenz des Procain.

Die Toxizitätsdaten der Enantiomere ließen kein klares Muster erkennen. Das (+)-Enantiomer von O/W3 war mit einer LD_{50} von 0,665 mmol/kg KG (250 ± 26 mg/kg KG) etwas toxischer (Faktor 1,23) als sein Antipode mit 0,819 mmol/kg KG (308 ± 10 mg/kg KG). Umgekehrt verhielt es sich bei den O/W13-Enantiomeren. Hier war (+)-O/W13 mit einer LD_{50} von 0,651 mmol/kg KG (254 ± 9 mg/kg KG) weniger toxisch (Faktor 0,76) als (-)-O/W13 mit 0,495 mmol/kg KG (193 ± 17 mg/kg KG). Die ermittelten LD_{50} -Werte ließen sich weder mit der

lokanästhetischen Potenz der Enantiomere noch mit dem Ausmaß der gefundenen Interaktionen mit dem CYP-System korrelieren. Die Ursachen für die unterschiedlichen Toxizitäten der Enantiomere von O/W3 und O/W13 müssen also in durch die Versuche am Ganztier nicht aufgedeckten Nebeneffekten der Verbindungen liegen.

Analog zu den enantiomerenrein vermarkteten Anilid-LA Ropivacain und Bupivacain ergab sich aus den bisher erhobenen Daten keine klinische Relevanz in den Wirkunterschieden der untersuchten Enantiomere der chiralen Fomocainderivate O/W3 und O/W13. Es wäre daher beim Einsatz als LA dem Enantiomer mit der geringsten Toxizität (+)-O/W13 der Vorzug zu geben.

3.4. Zusammenfassung

Der Einfluss der basischen Komponente auf die physikochemischen Eigenschaften sowie auf die lokalanästhetische Wirksamkeit und Toxizität ist in der Gruppe der Fomocaine, zum Teil auch unter sterischen Aspekten, ausführlich untersucht worden. Ein seit langem offenes Problem war die Frage, ob die Daten von C-alkylierten Morpholinderivaten in die vorliegenden Erkenntnisse systematisch einzureihen waren. Dieses Forschungsproblem war belastet mit der schwierigen Zugänglichkeit der teilweise neuen Morpholinderivate, deren pharmakologischer Einfluss bisher nur flüchtig in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts für sedativ wirksame 3,4,5-Trimethoxyzimtsäureamide [87] studiert worden war. Nach vielfältigen Vorversuchen, die sich über Monate erstreckten, gelang die Synthese zweier homologer Reihen von je vier einfach substituierten C-Alkylmorpholinen über zwei Stufen mit zufrieden stellenden Gesamtausbeuten von 15,0 - 47,9 % d. Th. für die 2-substituierten ($R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, \text{C}_4\text{H}_9$) und 50,9 - 69,9 % d. Th. für die 3-substituierten ($R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_3\text{H}_7$) Morpholine. Aus *rac*-1,2-Epoxyalkanen und 2-Aminoethanol bzw. Ethylenoxid und *rac*-2-Aminoalkan-1-olen waren die Edukte für die Ringschlussreaktionen durch Dehydratation mit konzentrierter H_2SO_4 in der Hitze zu 2- bzw. 3-Alkylmorpholinen einfach zugänglich. Die sterische Hinderung durch größer werdende Substituenten führte zur Verminderung der Ausbeuten bei den Ringschlüssen der *rac*-1-(2-Hydroxyethylamino)alkan-2-ole zu den *rac*-2-Alkylmorpholinen, während die Reaktion der *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)alkan-1-ole zu den *rac*-3-Alkylmorpholinen von der Substituentengröße unbeeinflusst blieb. Durch kontinuierliche Extraktion am Perforator wurde eine verlustarme Aufarbeitung der Morpholinbasen garantiert.

Die Reaktion von 1-(3-Chlorpropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**2**) oder 1-(3-Brom-propyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**3**) mit den dargestellten Morpholinen ergab die acht bisher noch nicht pharmakologisch untersuchten chiralen Fomocainderivate O/W1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15. Dabei erwies sich der Reaktionsweg über (**3**), das durch Halogenaustausch aus (**2**) dargestellt werden konnte, als der günstigere im Hinblick auf die erreichten Ausbeuten und Reinheiten der Fomocainderivate. Die Gesamtausbeuten der Synthesen der chiralen Fomocainderivate über insgesamt 5 Stufen betragen 22,5 - 28,8 % d. Th. für die 2-substituierte homologe Reihe und 15,3 - 21,8 % d. Th. für die 3-substituierten Derivate. Hier wirkte sich die sterische Hinderung durch die Alkylsubstituenten am C-3 des Morpholins negativ auf die Ausbeuten aus. Die *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)alkanole zur Synthese der C-Alkylmorpholine wurden außerdem mit (**3**) zu den chiralen Oe7000-Derivaten O/W2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mit Ausbeuten von 3,5 - 22,3 % d. Th. umgesetzt und analytisch charakterisiert. Hier konnte keine Beeinflussung der Ausbeuten durch die Stellung, wohl aber durch die Raumerfüllung infolge des Alkylsubstituenten beobachtet werden. Die Strukturbeweise für die synthetisierten Verbindungen O/W1 - 16 konnten über massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Methoden sowie durch Elementaranalysen erbracht werden.

Durch die Einführung eines Alkylsubstituenten in den basischen Molekülteil des LA Fomocain wurden die physikochemischen Eigenschaften der resultierenden chiralen Derivate im Hinblick auf ihre lokalanästhetische Wirksamkeit überraschender Weise eher verschlechtert. Die pK_s - und Trübungs-pH-Werte der Verbindungen sanken mit wachsender Substituentengröße und damit auch die Basenlöslichkeiten und ihre Ionisationsgrade bei pH 7,4. Neben den parallel dazu ansteigenden Werten für die Verteilungskoeffizienten bedeutete dies für die chiralen Fomocainderivate eine Verringerung der theoretisch am Wirkort - dem LA-Bindungsareal am spannungsabhängigen Na^+ -Kanal - zur Verfügung stehenden Menge an protonierten LA-Molekülen. Die chiralen Derivate von Oe7000 wiesen bei immer noch geringer Wasserlöslichkeit durchgehend günstigere physikalisch-chemische Eigenschaften auf. Die Löslichkeiten der Basen wurden durch das Vorliegen zweier alkoholischer Funktionen im Molekül etwa um den Faktor 2 bis 2,5 im Vergleich zu den heterocyclischen Analoga erhöht. Die pK_s -Werte lagen in einem günstigeren Bereich, der höhere Ionisationsgrade bei pH 7,4 gewährte. Die Verteilungskoeffizienten wurden für **P** um den Faktor 10 und für **D** (pH 7,4) sogar um den Faktor 100 zugunsten der hydrophilen Phase verschoben.

Alle synthetisierten Fomocain-, Oe7000- und Morpholinderivate wurden in ihrem chromatographischen Verhalten an den drei CSP Chiralcel[®] OD sowie Chiralpak[®] AD und AS um-

fassend untersucht. Ziel der Versuche war es zum Einen, Trennbedingungen für eine präparative Racemattrennung der chiralen Fomocainderivate an der im Arbeitskreis vorhandenen Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm) zu finden und zum Anderen für jede Verbindung eine analytische Methode zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses nach Anwendung alternativer Verfahren zur Racematspaltung zu erhalten. Die C-Alkylmorpholine mussten aufgrund des fehlenden Chromophors vor den HPLC-Untersuchungen in einem Vorsäulenderivatisierungsschritt mit Benzoylchlorid zu den entsprechenden Benzamiden NBM1 - 8 umgesetzt werden. Mit der getroffenen Auswahl an CSP konnte für jedes untersuchte Racemat zumindest eine analytisch verwendbare HPLC-Methode zur Enantiomerentrennung gefunden werden, wobei an der OD-Phase nur für O/W5 Trennbedingungen ermittelt wurden, die an der vorhandenen Anlage eine wirtschaftliche präparative Racemattrennung im Grammmaßstab zugelassen hätten. Die beiden auf Amylose aufbauenden CSP Chiralpak[®] AS und AD waren generell besser zur Trennung sowohl der chiralen Fomocain- als auch der Oe7000-Derivate und 4-Benzoylmorpholine geeignet. Die Trennungen der 2-substituierten Fomocainderivate gelangen an jeder getesteten CSP besser als die der 3-substituierten Analoga. Die Werte für die Selektivität k_{α} und die Peakauflösung R_s der Trennungen sanken innerhalb einer homologen Reihe mit wachsender Substituentengröße, wobei das Trennverhalten der 3-isopropylsubstituierten Verbindungen O/W15 und NBM8 eher dem der ethylsubstituierten homologen Substanzen O/W11 und NBM6 als dem ihrer unverzweigten Isomere O/W13 und NBM7 ähnelte.

In der Erkennung der Enantiomere der Fomocainderivate durch die eingesetzten polysaccharidbasierten CSP spielte die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Morpholin-sauerstoff und dem Carbamoyl-NH der CSP offensichtlich die wichtigste Rolle. Kleinere Substituenten am C-2 des Heterocyclus führten zu einer stärkeren Diskriminierung der Enantiomere durch die CSP als bei den entsprechenden 3-substituierten Analoga. Raumerfüllendere Alkylsubstituenten am basischen Molekülteil schränkten wiederum die Wechselwirkungen beider Enantiomere mit der CSP ein und führten somit zu einer Verschlechterung der chiralen Erkennung.

Als Alternative zur präparativen Racemattrennung der Fomocainderivate durch HPLC an der Chiralcel[®] OD-Phase wurden Verfahren zur Racematspaltung durch getrennte Kristallisation diastereomerer Salze untersucht. Da sich die chiralen Fomocainderivate mit den eingesetzten Salzbildnern nicht trennen ließen, wurden die C-Alkylmorpholine in die Versuche mit einbezogen. Die Anwendung der „Dutch Resolution“ [120] auf die chiralen Morpholinderivate erwies sich in analytischen Vorversuchen als geeignet, in ein bis zwei Kristallisationsschritten ein Enantiomer auf ca. 75 % *ee* anzureichern. Dabei erwies sich der Einsatz einer äquimolaren

Mischung von Dibenzoyl- (**T1**), Ditoluy- (**T2**) und Dianisoylweinsäure (**T3**) als Trennreagenz einer Mischung von **T2** und **T3** (2:1) im Vergleich der erreichbaren Enantiomerenüberschüsse als deutlich überlegen. Die besten Trennerfolge wurden für die ethylsubstituierten Morpholine (**9**) und (**25**) mit 67 bzw. 83 % *ee* nach einmaliger Kristallisation erreicht.

Aus den Ergebnissen der pharmakologischen Prüfungen ergab sich die Notwendigkeit, die Enantiomere der Fomocainderivate O/W3 (**10**) und O/W13 (**30**) in Mengen von etwa 2 g zu gewinnen. Dazu wurden die Erkenntnisse aus den chromatographischen Untersuchungen und den Kristallisationsversuchen zu einer Zweigegestrategie kombiniert. In einem ersten Schritt wurden die Enantiomere von (**9**) und 3-Propylmorpholin (**29**) durch präparative Racematspaltung über ihre diastereomeren Salze unter den Bedingungen der „Dutch Resolution“ zu über 75 % *ee* angereichert und aus den erhaltenen nichtracemischen C-Alkylmorpholinen die entsprechenden nichtracemischen Fomocainderivate (-)-O/W3 (86 % *ee*) (**46**), (+)-O/W3 (75 % *ee*) (**47**); (-)-O/W13 (83 % *ee*) (**48**) und (+)-O/W13 (79,5 % *ee*) (**49**) dargestellt.

Die weitere Aufreinigung der Enantiomere gelang im zweiten Schritt durch präparative HPLC an der Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm). Die Anteile von 9 - 12,5 % des jeweils anderen Stereoisomers in den nichtracemischen Mischungen gestatteten die Durchführung der präparativen HPLC-Trennungen unter wirtschaftlichen Bedingungen, da sie einen im Vergleich zu den Racematen deutlich erhöhten Substanzauftrag auch bei ungünstigeren Werten für die Selektivitäten der Trennungen ermöglichten. Durch gezieltes Schneiden der Fraktionen in insgesamt 28 chromatographischen Läufen gelang es, die Enantiomere von O/W3 und O/W13 in den benötigten Mengen von je ca. 2 g (als HCl) in Reinheitsgraden von 99,9 und 98,4 % *ee* für (-)- und (+)-O/W3 bzw. 87,2 und 87 % *ee* für (-) und (+)-O/W13 für die pharmakologischen Versuche zu erhalten.

Für die rechtsdrehenden Enantiomere von O/W3 und O/W13 wurde in Abbauversuchen mit Rinderleberhomogenaten eine geringe Bevorzugung in der Metabolisierung durch die beteiligten Enzyme gegenüber ihren Antipoden festgestellt. Bei den Versuchen mit O/W3 wuchs im Laufe der Inkubation des Racemates mit den 10000 g Überständen das Enantiomerenverhältnis (-):(+) auf 1,31:1 nach 90 min. Das Enantiomerenverhältnis von O/W13 betrug am Ende der Inkubation 1,23:1. Die hohen PEB der Verbindungen von > 99,5 % machten weiterführende Untersuchungen auf eine eventuell vorhandene stereoselektive Bindung an Plasma- und Gewebeproteine unnötig.

Weiterführende Untersuchungen zum Interaktionspotential der chiralen Fomocainderivate und der Enantiomere von O/W3 und O/W13 mit dem CYP-Enzymsystem erlaubten die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen innerhalb der beiden homologen Reihen und zeigten

außerdem Stereoselektivitäten in der Wechselwirkung der Enantiomere mit einigen CYP-Subfamilien. Mit wachsender Substituentenlänge nahm in den Versuchen mit Rattenleberhomogenaten die Interaktionsneigung der chiralen Fomocainderivate mit den in den Modellreaktionen ECOD, EROD, PROD und EMND erfassten CYP-Isoenzymen der Unterfamilien 1A, 2A, 2B, 2C und 3A im Vergleich zur Leitsubstanz Fomocain ab. Ein relativ gesehen hohes Interaktionspotential der Fomocaine wurde für die CYP-Subfamilie 2B gefunden. Die geringste Interaktionsneigung hatten die Racemate zu CYP3A-Isoenzymen, die an der Metabolisierung einer Vielzahl von Xenobiotika beteiligt sind. In allen Modellreaktionen zeigte das rechtsdrehende Enantiomer von O/W3 mit Selektivitäten von 1:1,10 im EMND- bis 1:1,56 im EROD-Test eine stärkere Interaktionsneigung als sein linksdrehener Antipode. Mit umgekehrter Stereoselektivität reagierten die Enantiomere von O/W13. Hier war (-)-O/W13 mit Faktoren von bis zu 1,25 im EMND-Test der stärkere Inhibitor des Substratumsatzes in den Modellreaktionen.

Die Racemate der chiralen Fomocainderivate und die Enantiomere von O/W3 und O/W13 wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena an Ratten auf die lokal-anästhetischen Eigenschaften und Toxizität ihrer Hydrochloride getestet. Die oberflächenanästhetische Wirksamkeit der chiralen Fomocainderivate an der Cornea der Ratte nahm in beiden homologen Reihen mit wachsender Substituentengröße zu und übertraf dabei die Potenz des Referenzanästhetikums Tetracain im Falle von O/W7 und O/W13 um mehr als das Doppelte. Es gelang jedoch nicht, aus diesem Befund eine höhere Affinität der Verbindungen zum Bindungsareal am Na⁺-Kanal abzuleiten, da die gesteigerte lokalanästhetische Wirksamkeit wenigstens zum Teil durch die veränderten physikochemischen Eigenschaften der O/W-Verbindungen verursacht wurden. Aufgrund der sich mit steigenden Molmassen verschlechternden Löslichkeiten der Substanzen im Testlösungsmittel Tylose (0,5 % m/V) waren die verlängerten Anästhesiedauern auch auf einen Depoteffekt durch Ausfällung und die dadurch verlängerte Verweildauer der Stoffe am Wirkort zurückzuführen. Die leitungsanästhetischen Eigenschaften der Muttersubstanz Fomocain wurden durch die Einführung einer Alkylgruppe in den basischen Molekülteil insgesamt eher verschlechtert. Die Ursache für die nicht klar ableitbaren Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Bestimmung der Leitungsanästhesie am N. ischiadicus der Ratte lag wahrscheinlich ebenso in den die Pharmakokinetik der Verbindungen ungünstig beeinflussenden physikochemischen Parametern begründet. Die großen Streuungen der Messwerte deuteten auf in Ausmaß und Häufigkeit nicht reproduzierbare Ausfällungen der Substanzen an der Injektionsstelle hin. Durch Wechsel des Testlösungsmittels auf eine Propylenglycol-Wassermischung 1:1 (V/V) konnten für die Verbindungen O/W7,

O/W13 und O/W15 deutlich verlängerte Anästhesiedauern im Vergleich zu den Tylosezubereitungen erreicht werden, wobei jedoch die Abstufungen der Wirkstärken der Substanzen untereinander erhalten blieb. In der Beurteilung der Parese fiel auf, dass in beiden homologen Reihen nur die methyl- und ethylsubstituierten Verbindungen in relevanten Konzentrationen eine Parese auslösten. Ab einer unverzweigten Propylsubstitution wurde für die chiralen Fomocainderivate keine Parese mehr beobachtet. Die Alkylsubstitution am Morpholin hatte geringe Auswirkungen auf die Toxizität der Muttersubstanz Fomocain. Für alle Verbindungen sank die LD₅₀ um ca. ¼ auf Werte um 0,75 mmol/kg KG im Vergleich zu 1,03 mmol/kg KG für Fomocain. Die Letale Dosis für O/W7-HCl konnte aufgrund der beschriebenen Löslichkeitsprobleme nicht korrekt bestimmt werden. Die Isopropylsubstitution am C-3 der Morpholinkomponente erwies sich in allen Versuchen als keine Verbesserung der Leitstruktur. Analog zu den Beobachtungen bei den chromatographischen Racemattrennungen konnte festgestellt werden, dass die ausgelösten Effekte an der chiralen Zielstruktur (CSP oder Kanalprotein) eher von der Länge des Substituenten als von seiner Raumerfüllung abhängig waren.

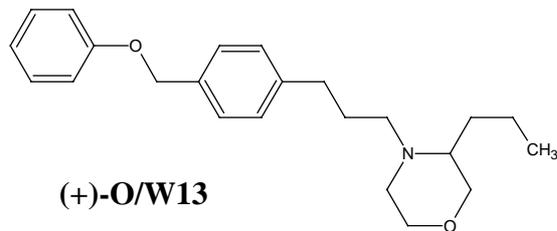
Aus der Beurteilung der Ergebnisse aller *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente mit den Racematen stellten sich O/W3 und O/W13 mit ihren im Vergleich zu Fomocain verbesserten oberflächenanästhetischen und guten leitungsanästhetischen Eigenschaften bei nur geringfügig erhöhter Toxizität und erniedrigtem Interaktionspotential mit dem CYP-Enzymsystem als die interessantesten Derivate heraus und wurden daraufhin in Form ihrer Enantiomere nochmals pharmakologisch getestet. Im Lösungsmittel Propylenglycol/Wasser 1:1 wiesen die Enantiomere von O/W3 in der Oberflächenanästhesie eine etwas verbesserte Wirkstärke als Tetracain bei einer leichten aber nicht signifikanten Überlegenheit des rechtsdrehenden Isomers auf. Die O/W13-Enantiomere zeigten sich bei einer geringfügigen Stereoselektivität zugunsten des (+)-Stereoisomers dem Referenzanästhetikum Tetracain um mehr als das Doppelte überlegen. Keine Diskriminierung zwischen den Enantiomeren von O/W3 und O/W13 konnte aufgrund der starken Messwertstreuungen bei der Bestimmung der leitungsanästhetischen Wirksamkeit gegen Fomocain und Procain festgestellt werden.

Die Toxizität der Enantiomere ließ keine klaren Relationen erkennen. (+)-O/W3 war um den Faktor 1,23 etwas toxischer als sein Antipode. Umgekehrt verhielt es sich bei den O/W13-Enantiomeren. Hier war (+)-O/W13 um den Faktor 0,76 weniger toxisch als (-)-O/W13. Die ermittelten LD₅₀-Werte ließen sich weder mit der lokalanästhetischen Potenz der Enantiomere noch mit dem Ausmaß der gefundenen Interaktionen mit den CYP-System korrelieren. Die Ursachen für die unterschiedlichen Toxizitäten der Enantiomere von O/W3

und O/W13 müssen also in durch die Versuche am Ganztier nicht aufgedeckten stereoselektiven Nebeneffekten der Verbindungen, wie z. B. der eingangs erwähnten Beeinflussung anderer Ionenkanäle als der kardialen Na⁺-Kanäle oder auch Eingriffen in die Zellatmung, liegen.

Analog zu den enantiomerenrein verfügbaren Anilid-LA Ropivacain und Levobupivacain ergab sich aus den bisher erhobenen Daten keine klinische Relevanz in den Wirkunterschieden der untersuchten Enantiomere der chiralen Fomocainderivate O/W3 und O/W13. Es wäre daher beim Einsatz als LA dem Enantiomer mit der geringsten Toxizität der Vorzug zu geben.

Der große Erkenntnisgewinn vorliegender Arbeit liegt auf synthetisch-präparativem Gebiet in der erfolgreichen Kombination zweier Techniken (Racematspaltung durch Bildung diastereomerer Salze und präparative HPLC an einer CSP) zur Gewinnung der benötigten Enantiomere



(+)-O/W13

in größerem Maßstab. Mit (+)-O/W13 wurde hier eine interessante Verbindung gefunden und umfassend untersucht, die in ihren pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften eine deutliche Verbesserung der Muttersubstanz

Fomocain darstellt. Ihre EC_{20min} in der Oberflächenanästhesie beträgt nur 1/5 der von Fomocain. Die Wirkstärke in der Leitungsanästhesie und die geringe Toxizität bleiben erhalten, während der Verbindung ein deutlich geringeres Interaktionspotential mit CYP-Isoenzymen zukommt.

4. Experimenteller Teil**4.1. Synthesen****4.1.1. Synthese von 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen**4.1.1.1. 1-(Chlormethyl)-4-(3-chlorpropyl)benzen (**1**)

150 g (3-Chlorpropyl)benzen (0,96 mol) und 90 g Paraformaldehyd (2,94 mol) werden mit 42 g ZnCl_2 (0,33 mol) bei 50 °C für 30 min gerührt. Unter Temperaturkontrolle (max. 60 °C) werden langsam 168 g Thionylchlorid (1,44 mol) zugetropft und für weitere 2 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wird dc kontrolliert (Petrolether/Dichlormethan 9/1, Detektion UV). Nach dem Abkühlen wird der Ansatz in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird am RV vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand im Vakuum destilliert. Bei 100 °C/ $1,3 \cdot 10^{-3}$ mbar gehen 87 g eines farblosen Öls über, das zu ca. 10 % die regioisomere o-Chlormethylverbindung enthält, von der durch fraktionierte Destillation nicht abgetrennt werden kann. Für die nächste Synthesestufe wird daher dieses Isomerengemisch eingesetzt. Der Brechungsindex des Öls beträgt 1,5466 ($[\text{132}] n_D^{20}$ 1,5468). Die Ausbeute beträgt 55 % d.Th.

4.1.1.2. 1-(3-Chlorpropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**2**)

87 g **1** (0,51 mol) werden mit 54 g Natriumphenolat (0,54 mol) in 500 ml Aceton 8 h am Rückfluß erhitzt. Anschließend wird der Ansatz heiß filtriert und das Lösungsmittel nach Waschen des Filters mit Aceton am RV abgezogen. Der Rückstand wird mit Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase mit 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es werden 84 g farblose bis gelbliche Kristalle vom Schmelzpunkt 48 °C erhalten. Die Substanz ist noch zu ca. 10 % mit dem ortho-Regioisomer und zu ca. 2 % mit 1-(3-Phenoxypropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen („Diether“) verunreinigt. Zur Reinigung wird sc (230 g Kieselgel 60, Säule 600 x 30 mm ID, Beladung 2,5 g, mobile Phase Cyclohexan/Dichlormethan 70/30, Kontrolle DC, Detektion UV und Millons Reagenz) vom „Diether“ abgetrennt und aus Methanol umkristallisiert. Die erhaltenen 74 g fast farblosen bis weißen Plättchen schmelzen bei 54,5 °C ($[\text{131}]$ 52-53°C). Die Ausbeute an **2** beträgt 55,7 % d.Th.

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 18,21 min, Molpeak 260 m/z (Cl-Split, 3 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 167 (100%), 131 (5,9 %), 104 (15,7 %), 91 (11,7 %), 77 (4,9 %)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 2,00 (p, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 2,71 (t, 2 H, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3,45 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 4,95 (s, 2 H, $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,15 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,22 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 32,5 ($\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 34,0 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 44,2 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 69,7 ($-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,8 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,8 (C-4 endo-Ring), 140,5 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

4.1.1.3. 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**3**)

15 g (57,5 mmol) **2** werden mit 9,99 g LiBr (118,1 mmol) und 1,17 g Trioctylmethylammoniumchlorid (2,9 mmol) versetzt und für 2 Tage bei 100 °C gerührt. Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz mit ca. 100 ml Dichlormethan versetzt und über eine Kieselgelschicht (20 g Kieselgel 60) unter Nachwaschen mit 300 ml Dichlormethan filtriert (DC-Kontrolle Dichlormethan/Cyclohexan 50/50, UV-Detektion). Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die organische Phase am RV abgezogen und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es werden 16,37 g weiße Plättchen vom Schmelzpunkt 63 °C erhalten. In der GC-MS zeigt sich das Produkt noch zu 1,2 % mit **2** verunreinigt. Die Ausbeute beträgt 91,8 % d.Th.

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 19,18 min, Molpeak 304 m/z (Br-Split, 2,5 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 211 (100 %), 131 (8,9 %), 104 (38,4 %), 91 (19,2 %), 78 (9,8 %), 65 (11,8 %)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 2,09 (p, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 2,71 (t, 2 H, $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3,18 (t, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 4,95 (s, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,15 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,22 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 33,0 ($\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 33,7 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 34,1 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$), 69,7 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,8 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,9 (C-4 endo-Ring), 140,4 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

4.1.2. Synthese von *rac*-O/W1 und *rac*-O/W2

4.1.2.1. *rac*-1-(2-Hydroxyethylamino)propan-2-ol (**4**)

Zu einer eisgekühlten Mischung von 228,6 g (3,74 mol) 2-Aminoethanol und 153 g Wasser werden unter intensivem Rühren langsam 27,8 g (0,48 mol) 1,2-Epoxypropan zugetropft. Nach Ende der Zugabe wird noch eine Stunde weitergerührt und danach das Wasser am RV abgezogen. Der nicht umgesetzte 2-Aminoethanol wird durch Destillation bei 94 - 96 °C/55 mbar abgetrennt und kann in weiteren Ansätzen wieder verwendet werden. Das Produkt wird durch fraktionierte Kolonnendestillation gereinigt und siedet bei 85 - 88 °C/0,1 mbar (163 - 166 °C/47 mbar Cottle). Aus der gemeinsamen Destillation von drei Ansätzen werden 131,2 g **4** in Form eines farblosen, hochviskosen Öls vom n_D^{20} 1,468 ([82] n_D^{20} 1,467) erhalten. Die Ausbeute - berechnet auf das eingesetzte 1,2-Epoxypropan - beträgt 77,3 % d.Th. ([82] 95 %).

4.1.2.2. *rac*-2-Methylmorpholin (**5**)

Zu 170 g 95 % Schwefelsäure werden unter Eiskühlung des Kolbens und intensivem Rühren 62 g (0,52 mol) **4** zugetropft. Nach Ende der Zugabe wird für 12 h auf 160 - 165 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz mit 60 %iger Natronlauge auf pH 11 alkalisiert. Der

entstandene Teer und das ausgefallene Natriumsulfat werden nach 24 h abgesaugt. Die alkalische Lösung wird im Perforator über 48 h mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Ether am RV abdestilliert. Das Produkt wird durch fraktionierte Kolonnendestillation gereinigt. Bei 137 °C ([82] 135 - 36 °C) gehen 32,3 g **5** mit einem Brechungsindex (18 °C) von 1,447 ([82] n_D^{20} 1,4454) über. Die Ausbeute beträgt 62 % d.Th. ([82] 57 %, Sdp. nach Reinigung). Die Verbindung ist mit > 99,5 % der Peakflächen gc-rein. Das Hydrochlorid schmilzt bei 178 °C (Isopropanol).

EI-MS: Molpeak ($M+H^+$) bei m/z 102 (100 % rel. Int.)

4.1.2.3. *rac*-2-Methyl-4-{3-[4-(phoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W1), (**6**)

2,0 g **2** (7,7 mmol) werden mit 37,90 g **5** (375,2 mmol) versetzt und bei 85 °C für 5 h gerührt (DC-Kontrolle FM Methanol, Detektion UV und Millons Reagenz, Rf **6** 0,54). Das überschüssige 2-Methylmorpholin wird durch Destillation bei vermindertem Druck (76 - 81 °C/150 mbar) zurückgewonnen. Der Rückstand wird in 10 %iger HCl aufgenommen und drei mal mit Diethylether extrahiert. Nach Alkalisieren der wässrigen Phase mit 10 %iger NaOH wird der ausgefallene Niederschlag mit Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wird bis zur neutralen Reaktion mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Ethers am RV werden 2,35 g **6** als gelbliches dc-reines Öl erhalten, das mit Ether/HCl_g zu 2,41 g O/W1-Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 161 °C (Isopropanol/Hexan) ([75] 157 °C) umgesetzt wird. Die Ausbeute beträgt 93,9 % d.Th. Die HPLC-Reinheit der Substanz liegt bei > 99,5 % der Gesamtflächen.

EI-MS: Molpeak ($M+H^+$) bei m/z 326,4 (100 % rel. Int.), Fragment bei m/z 232,3 (3,2 %)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 1,07 (d, 3 H, Methyl), 1,75 (m, 1 H, H-3ax. Morpholin), 1,82 (m, 2 H, -CH₂-**CH**₂-CH₂-N<), 2,09 (dt, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,37 (t, 2 H, -CH₂-**CH**₂-N<), 2,59 (t, 2 H, Ar-**CH**₂-CH₂-), 2,74 (t, 2 H, H-3äq. und H-5äq. Morpholin), 3,67 (m, 1 H, H-2* Morpholin), 3,74 (m, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,80 (m, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, -O-**CH**₂-Ar), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,13

(d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,22 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

^{13}C -NMR: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 18,1 (Methyl), 26,6 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 32,2 (Ar- CH_2-CH_2-), 51,7 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 57,0 (C-3 Morpholin), 58,7 (C-5 Morpholin), 65,2 (C-6 Morpholin), 68,8 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 70,4 (C-2* Morpholin), 113,8 (C2 und 6 exo-Ring), 119,9 (C-4 exo-Ring), 126,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 128,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,6 (C-4 endo-Ring), 140,4 (C-1 endo-Ring), 157,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 69,69 %, H 7,80 %, N 3,87 %, O 8,84%, Cl 9,80 %
gef.: C 68,85 %, H 7,85 %, N 3,55 %

4.1.2.4. *rac*-1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-2-ol (O/W2), (**7**)

200 mg **3** (0,65 mmol) und 117 mg **4** (0,98 mmol) werden in 30 ml trockenem Toluol gelöst und mit einer Spatelspitze K_2CO_3 versetzt. Der Ansatz wird unter Rühren für 190 Stunden am Rückfluß zum Sieden erhitzt und der Verlauf der Reaktion dc kontrolliert (FM MeOH, Detektion UV, Bromcresolgrün). Nach Ende der Reaktion wird die Lösung einrotiert und der Rückstand mit 10 %iger HCl aufgenommen. Die saure Phase wird dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt, mit NaOH auf pH 12 alkalisiert und dreimal mit Diethylether extrahiert. Nach DC-Kontrolle werden die vereinigten etherischen Phasen der zweiten Extraktion über Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. **7** wird als 113 mg wachsartige Base, die mit Ether/ HCl_g zum O/W2-Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 95 °C (Isopropanol/Hexan) umgesetzt wird, erhalten. Die Ausbeute beträgt 50 % d Th.

^1H -NMR: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 1,05 (t, 3 H, Methyl), 1,74 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,29 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$), 2,35 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,41 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,49 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,51 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}$), 2,57 (m, 2 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,63 (m, 1 H, N- CH_2-CHOH), 3,53 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,71 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-$

-*CH-OH), 4,96 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,88 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,13 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,22 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 20,2 (Methyl), 28,8 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 33,2 (Ar-CH₂-CH₂-), 54,7 (-CH₂-CH₂-N<), 56,5 (>N-CH₂-CH₂OH), 60,0 (-CH₂-CH₂-OH), 62,6 (>N-*CH-CH₂-OH), 64,3 (>N-CH₂-*CH), 69,8 (-O-CH₂-Ar), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,6 (C-4 endo-Ring), 141,7 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 66,39 %, H 7,96 %, N 3,69 %, O 12,63 %, Cl 9,33 %
gef.: C 71,50 %, H, 8,47 %, N 3,77 %

4.1.3. Synthese von *rac*-O/W3 und *rac*-O/W4

4.1.3.1. *rac*-1-(2-Hydroxyethylamino)butan-2-ol (**8**)

Die Synthese wird unter Einsatz von 34,6 g 1,2-Epoxybutan (0,48 mol) analog Vorschrift 4.1.2.1. durchgeführt. Das Produkt wird durch Kolonnendestillation gereinigt und siedet bei 97 °C/0,04 mbar (Lit. [83] 137 °C/12 mbar). Die durchschnittliche Ausbeute aus sieben Ansätzen beträgt 84,9 % d.Th. - berechnet auf das eingesetzte 1,2-Epoxybutan ([83] 61 %). Die gewonnene klare, farblose und hochviskose Flüssigkeit hat einen Brechungsindex von 1,469 (18 °C) ([83] n_D^{20} 1,4651)

4.1.3.2. *rac*-2-Ethylmorpholin (**9**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 68,73 g **8** (0,52 mol) unter 16stündigem Erhitzen auf 145 - 150 °C. Bei 80 - 82 °C/75 mbar gehen 16,36 g **9** über ([82] 155 - 57 °C bzw. 38 - 40 °C/10,6 mbar [83] 141°C). Die durchschnittliche Ausbeute aus fünf Ansätzen beträgt 17,7 % d.Th. ([83] 51 %). Das Produkt ist gc-rein und hat einen Brechungs-

index von 1,451 ([82] n_D^{20} 1,4519, [83] n_D^{20} 1,4499). Das **9**-Hydrochlorid schmilzt bei 102 °C (Isopropanol).

EI-MS: Molpeak ($M+H^+$) bei m/z 115,8 (100 % rel. Int.)

4.1.3.3. *rac*-2-Ethyl-4-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W3), (**10**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.3. unter Einsatz von 0,5 g **2** (1,92 mmol) und 11 g **9** (95,9 mmol). Die nach dem Abrotieren des Lösungsmittels erhaltene **10**-Base wird nach sc-Reinigung (130 g Kieselgel 60, Methanol, Säule 400 x 20 mm) komplett zum O/W3-Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 133 - 35 °C (iso-Propanol) umgesetzt. Die durchschnittliche Ausbeute aus sieben Ansätzen beträgt 84,8 % d.Th..

EI-MS: Molpeak ($M+H^{++}$) bei m/z 340,4 (100 % rel. Int.), Fragment bei m/z 246,3 (6,4 %)

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,96 (t, 3 H, Methyl), 1,26 (m, 1 H, $^*\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,55 (m, 1 H, $^*\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,79 (m, 1 H, H-3ax. Morpholin), 1,85 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}<$), 2,12 (td, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,38 (t, 2 H, $(-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}<$), 2,68 (t, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 2,74 (d, 1 H, H-5äq. Morpholin), 2,79 (d, 1 H, H-3äq. Morpholin), 3,42 (m, 1 H, H-2* Morpholin), 3,68 (td, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,89 (dd, 1 H, H-6äq. Morpholin), 5,05 (s, 2 H, $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 6,99 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,22 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,30 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,34 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 8,7 (Methyl), 25,6 ($^*\text{CH-CH}_2\text{-CH}_3$) 26,6 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}<$), 32,2 (Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 52,0 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}<$ und C-3 Morpholin), 57,1 (C-5 Morpholin), 65,2 (C-6 Morpholin), 68,8 ($-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 75,5 ($^*\text{C-2}$ Morpholin), 113,8 (C2 und 6 exo-Ring), 119,9 (C-4 exo-Ring), 126,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,6 (C-2 und 6

endo-Ring), 128,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,6 (C-4 endo-Ring), 140,4 (C-1 endo-Ring), 157,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 70,29 %, H 8,04 %, N 3,73 %, O 8,51 %, Cl 9,43 %
gef.: C 69,73 %, H 8,12 %, N 3,47 %

4.1.3.4. *rac*-1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phoxymethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-2-ol (O/W4), (**11**)

200 mg **3** (0,66 mmol) werden mit 131 mg **8** (0,98 mmol) entsprechend Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. Es werden 114 mg gelbliche ölige Base erhalten, die mit Ether/HCl_g zum O/W4-Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 98 °C (Isopropanol/Hexan) umgesetzt wird. Die Ausbeute beträgt 47,9 % d.Th.

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,90 (t, 3 H, Methyl), 1,36 (m, 2 H, -*CH-CH₂-CH₃), 1,75 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,35 (m, 1 H, >N-CH₂-CH₂OH), 2,41 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,45 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,48 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,51 (m, 1 H, >N-CH₂-CHOH), 2,56 (m, 2 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,59 (m, 1 H, >N-CH₂-*CHOH), 3,63 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-OH), 3,68 (m, 1 H, -CH₂-*CH-OH), 4,96 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,90 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,16 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,24 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,29 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 10,0 (Methyl), 27,7 (-*CH-CH₂-CH₃), 28,8 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 33,2 (Ar-CH₂-CH₂-), 54,6 (-CH₂-CH₂-N<), 56,5 (>N-CH₂-CH₂OH), 60,0 (-CH₂-CH₂-OH), 60,8 (>N-*CH-CH₂-OH), 69,4 (>N-CH₂-*CH), 69,8 (-O-CH₂-Ar), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,6 (C-4 endo-Ring), 141,7 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 67,07 %, H 8,19 %, N 3,56 %, O 12,18 %, Cl 9,00 %
gef.: C 65,84 %, H, 8,13 %, N 3,23 % (HCl-Spuren)

4.1.4. Synthese von *rac*-O/W5 und *rac*-O/W6

4.1.4.1. *rac*-1-(2-Hydroxyethylamino)pentan-2-ol (**12**)

Die Synthese wird unter Einsatz von 41,34 g (0,48 mol) 1,2-Epoxyptenan analog Vorschrift 4.1.2.1. durchgeführt. Das Produkt wird durch fraktionierte Destillation über eine Kolonne gereinigt. Bei 110 - 115 °C/0,03 mbar (Lit. Avetyan 125 °C/2,7 mbar) gehen bei der Destillation von zwei Ansätzen 135,3 g **12** über, was einer Ausbeute von 94,5 % d.Th. entspricht. Das Produkt erstarrt zu einer wachsartigen Masse vom Schmelzpunkt 49 °C ([133] n_D^{20} 1,0115).

4.1.4.2. *rac*-2-Propylmorpholin (**13**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 77,3 g **12** (0,53 mol) unter 14stündigem Erhitzen auf 150 °C. Bei 100 - 102 °C/80 mbar gehen 19,7 g **13** über, was einer Ausbeute von 29 % d.Th. entspricht. Das Produkt hat einen Brechungsindex von 1,450 und bildet kein kristallisierendes Hydrochlorid. [86]

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 5,27 min, nicht identifizierter Nebenpeak (< 1 %) bei 5,38 min; Molpeak bei m/z 129 (15 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 86 (16 %), 70 (9 %), 57 (100 %)

4.1.4.3. *rac*-4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-2-propylmorpholin (O/W5), (**14**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.3. unter Einsatz von 1,0 g **2** (3,84 mmol) und 19,0 g **13** (147,2 mmol). Die erhaltene Base wird so gereinigt (100 g Kieselgel 60, Säule 400 x 20 mm ID, mobile Phase Methanol). Die durchschnittliche Ausbeute an **14** aus drei Ansätzen beträgt 73,4 % d.Th. Das O/W5-Hydrochlorid schmilzt bei 140,5 °C (Isopropanol).

EI-MS: Molpeak (M+H⁺) bei m/z 353 (20 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 260 (8,8 %), 142 (100 %), 131 (25,6 %), 91 (5,2 %)

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,84 (t, 3 H, Methyl), 1,36 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,32 (m, 2 H, $-\text{*CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1,66 (m, 1 H, H-3ax. Morpholin), 1,75 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$), 2,01 (dt, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,28 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$), 2,57 (t, 2 H, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 2,61 (d, 1 H, H-3äq. Morpholin), 2,65 (d, 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,40 (m, 1 H, H-2* Morpholin), 3,58 (dt, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,76 (dd, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, $-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 6,90 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,19 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,22 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,27 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 13,1 (Methyl), 16,5 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 26,2 ($-\text{*CH-CH}_2\text{-CH}_2$) 31,2 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$), 33,8 (Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 51,2 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$), 56,1 (C-3 Morpholin), 56,8 (C-5 Morpholin), 63,7 (C-6 Morpholin), 67,7 ($-\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 73,4 (*C-2 Morpholin), 112,7 (C2 und 6 exo-Ring), 118,7 (C-4 exo-Ring), 125,6 (C-3 und 5 endo-Ring), 126,5 (C-2 und 6 endo-Ring), 127,3 (C-3 und 5 exo-Ring), 132,3 (C-4 endo-Ring), 139,8 (C-1 endo-Ring), 156,7 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 70,84 %, H 8,27 %, N 3,59 %, O 8,21 %, Cl 9,09 %
gef.: C 70,72 %, H 8,23 %, N 3,43 %

4.1.4.4. *rac*-1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-pentan-2-ol (O/W6), (**15**)

200 mg **3** (0,66 mmol) werden mit 150 mg **12** (0,98 mmol) analog Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. **15** fällt mit 120,8 mg als farbloses Öl an, was einer Ausbeute von 49,5 % d.Th. entspricht. Das O/W6-Hydrochlorid schmilzt bei 75 °C (Isopropanol/Hexan).

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,87 (t, 3 H, Methyl), 1,30 (m, 4 H, $-\text{*CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,73 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$), 2,31 (m, 1 H, $>\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$), 2,36 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N<}$),

2,43 (m, 1 H, Ar-**CH₂**-CH₂-), 2,49 (m, 1 H, Ar-**CH₂**-CH₂-), 2,51 (m, 1 H, >N-**CH₂**-CH₂OH), 2,55 (m, 2 H, Ar-**CH₂**-CH₂-), 2,63 (m, 1 H, >N-**CH₂**-*CHOH), 3,57 (m, 2 H, -CH₂-**CH₂**-OH), 3,68 (m, 1 H, -CH₂-***CH**-OH), 4,95 (s, 2 H, -O-**CH₂**-Ar), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,13 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,23 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 14,0 (Methyl), 18,9 (-CH₂-**CH₂**-CH₃), 28,8 (-CH₂-**CH₂**-CH₂-), 33,2 (-CH₂-**CH₂**-CH₂-N<), 37,0 (Ar-**CH₂**-CH₂-), 54,6 (-CH₂-**CH₂**-N<), 56,5 (>N-**CH₂**-CH₂OH), 60,0 (-CH₂-**CH₂**-OH), 61,2 (>N-***CH**-**CH₂**-OH), 67,8 (-CH₂-***CH**-OH), 69,8 (-O-**CH₂**-Ar), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,6 (C-4 endo-Ring), 141,7 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 67,71 %, H 8,40 %, N 3,43 %, O 11,77 %, Cl 8,69 %
gef.: C 67,46 %, H 8,49 %, N 3,24 %

4.1.5. Synthese von *rac*-O/W7 und *rac*-O/W8

4.1.5.1. *rac*-1-(2-Hydroxyethylamino)hexan-2-ol (**16**)

Die Synthese wird unter Einsatz von 48,0 g (0,48 mol) 1,2-Epoxyhexan analog Vorschrift 4.1.2.1. durchgeführt. Das Produkt wird durch fraktionierte Kolonnendestillation im Vakuum gereinigt. Bei 121 - 123 °C/0,07 mbar ([133] 129 - 30 °C/1,3 mbar) gehen bei der gemeinsamen Destillation zweier Ansätze 110,2 g **16** über, was einer Ausbeute von 82,7 % d.Th. entspricht. Die Substanz erstarrt wachsartig und hat einen Schmelzpunkt von 32 °C ([133] n_D^{20} 0,9980).

4.1.5.2. *rac*-2-Butylmorpholin (**17**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 89,88 g (0,52 mol) **16** unter 15stündigem Erhitzen auf 145 °C. Bei 95 °C/25 mbar gehen 21,32 g **17** über, was einer Ausbeute von 26,7 % d.Th. entspricht. Die klare, stechend riechende Flüssigkeit hat einen Brechungsindex von 1,455 ([84] n_D^{20} 1,4373). Das **17**-Hydrochlorid schmilzt bei 70-72°C (Isopropanol).

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 7,54 min, Nebenpeak bei 7,69min (< 1 %), Molpeak bei m/z 143 (10 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 98 (6 %), 86 (19 %), 70(6 %), 57 (100 %)

4.1.5.3. *rac*-2-Butyl-4-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W7), (**18**)

1,17 g **3** (3,84 mmol) und 824 mg **17** (5,75 mmol) werden in 40 ml trockenem Toluol gelöst und mit 0,5 g K₂CO₃ versetzt. Der Ansatz wird unter Rühren für 24 h am Rückfluß zum Sieden erhitzt und der Verlauf der Reaktion dc kontrolliert (FM MeOH; Detektion UV/Bromcresolgrün). Nach Ende der Reaktion wird die Lösung einrotiert und der Rückstand mit 10 %iger HCl aufgenommen. Die Aufarbeitung erfolgt nach Vorschrift 4.1.2.3. Es werden 1,15 g **18** als dc-reines Öl erhalten, das mit Ether/HCl_g zum O/W7-Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 140,5 °C (iso-Propanol) umgesetzt wird. Die durchschnittliche Ausbeute aus drei Ansätzen beträgt 83,7 % d.Th.

EI-MS: Molpeak bei m/z 367 (24 % rel.Int.), Fragmente bei m/z 274 (11,2 %), 156 (100 %), 131 (20 %), 91 (4 %)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,82 (t, 3 H, Methyl), 1,14 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₃), 1,28 (m, 4 H, -*CH-CH₂-CH₂-CH₃), 1,71 (m, 1 H, H-3ax. Morpholin), 1,76 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,01 (dt, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,25 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,58 (t, 2 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,61 (d, 1 H, H-3äq. Morpholin), 2,65 (d, 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,40 (m, 1 H, H-2* Morpholin), 3,57 (dt, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,76 (dd, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6

exo-Ring), 7,13 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,21 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,27 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

^{13}C -NMR: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 13,0 (Methyl), 21,7 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 26,6 ($^*\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 27,3 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 32,4 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 32,5 (Ar- CH_2-CH_2-), 52,3 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 57,2 (C-3 Morpholin), 57,9 (C-5 Morpholin), 65,8 (C-6 Morpholin), 68,8 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 74,8 ($^*\text{C}-2$ Morpholin), 113,8 (C2 und 6 exo-Ring), 119,9 (C-4 exo-Ring), 126,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 128,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,3 (C-4 endo-Ring), 141,1 (C-1 endo-Ring), 157,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 71,35 %, H 8,48 %, N 3,47 %, O 7,92 %, Cl 8,78 %
gef.: C 69,62 %, H 8,09 %, N 3,36 %

4.1.5.4. *rac*-1-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-hexan-2-ol (O/W8), (**17**)

216 mg **3** (0,65 mmol) und 176 mg **16** (0,98 mmol) werden analog Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. Es werden 129 mg **17** als farbloses Öl erhalten, was einer Ausbeute von 47,2 % d.Th. entspricht. Das O/W8-Hydrochlorid schmilzt bei 72 - 74 °C (Isopropanol/Hexan).

^1H -NMR: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,84 (t, 3 H, Methyl), 1,27 (m, 6 H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,75 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,32 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$), 2,39 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,45 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,49 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,52 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}$), 2,57 (m, 2 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,64 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CHOH}$), 3,51 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,60 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$), 4,96 (s, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 6,88 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,13 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,24 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,29 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

^{13}C -NMR: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 12,7 (Methyl), 21,5 (- CH_2 -**CH**₂- CH_3), 26,5 (- CH_2 -**CH**₂- CH_2 -), 27,4 (-***CH**-**CH**₂- CH_2 -), 31,9 (- CH_2 -**CH**₂- CH_2 -N<), 33,2 (Ar-**CH**₂- CH_2 -), 53,3 (- CH_2 -**CH**₂>N-), 55,1 (>N-**CH**₂- CH_2 OH), 58,7 (- CH_2 -**CH**₂-OH), 59,9 (- CH_2 -**CH**₂-OH), 66,8 (>N- CH_2 -***CH**-), 68,4 (-O-**CH**₂-Ar), 113,5 (C2 und 6 exo-Ring), 119,6 (C-4 exo-Ring), 126,4 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,2 (C-2 und 6 endo-Ring), 128,1 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,3 (C-4 endo-Ring), 140,4 (C-1 endo-Ring), 157,5 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 68,31 %, H 8,60 %, N 3,32 %, O 11,37 %, Cl 8,40 %
gef.: C 67,82 %, H 8,61 %, N 3,07 %

4.1.6. Synthese von *rac*-O/W9 und *rac*-O/W10

4.1.6.1. *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)propan-1-ol (**20**)

30,91 g (411,5 mmol) 2-Aminopropan-1-ol werden mit 20,6 g Wasser in einem tarierten Rundkolben gemischt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Ethylenoxid wird bis zur Absorption von ca. 6 g (136,2 mmol) direkt eingebracht. Dazu wird das Ethylenoxid unter Ethanol-/CO₂-Kühlung aus der Druckgaspackung in eine Waschflasche geleitet und bis zu einem Volumen von ca. 10 ml kondensiert. Das Kondensat wird unter intensivem Rühren direkt in den eisgekühlten Ansatz gegeben. Die genaue Zugabemenge des Epoxids wird durch Auswaage des Reaktionsgefäßes bestimmt. Bis zur Erwärmung auf ca. 10 °C wird weiter gerührt und dann kurzzeitig auf ca. 50 °C erwärmt, um nicht umgesetztes Ethylenoxid auszutreiben. Nach Abtrennung des Lösungsmittels (40 °C/70 mbar) und der Rückgewinnung des überschüssigen 2-Aminopropan-1-ol (87 °C/35 mbar) für weitere Ansätze wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

Das leicht gelbliche viskose Produkt vom Brechungsindex 1,470 ([83] n_D^{16} 1,4707) siedet bei 134 °C/5 mbar ([82] 151-152 °C/20 mbar). Die Ausbeute - berechnet auf das eingesetzte Ethylenoxid - beträgt 95 % d.Th. ([75] 68,3 %).

4.1.6.2. *rac*-3-Methylmorpholin (**21**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 19,4 g (163 mmol) **20** unter 10stündigem Erhitzen auf 145 °C. **21** siedet bei 93-95 °C/250 mbar ([83] 133 - 134 °C) und wird mit einer Ausbeute von 53,6 % d.Th. (8,86 g) erhalten. Der Brechungsindex der stechend riechenden Flüssigkeit beträgt 1,447 ([83] n_D^{16} 1,4517).

GC: Retentionszeit Hauptpeak 5,597 min, Nebenpeak bei 5,01 min (<2,5 %)

EI-MS: Molpeak (M+H⁺) bei m/z 101,8 (100 % rel. Int.)

4.1.6.3. *rac*-3-Methyl-4-{3-[4-(phoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W9), (**22**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.3. unter Einsatz von 0,5 g **2** (1,92 mmol) und 5,82 g **21** (57,54 mmol). **22** wird als farbloses bis gelbliches Öl erhalten, das mit Ether/HCl_g zum O/W9-HCl umgesetzt wird. Die durchschnittliche Ausbeute aus fünf Ansätzen beträgt 56,4 % d.Th. Das O/W9-HCl schmilzt bei 152 °C (iso-Propanol/Hexan).

EI-MS: Molpeak (M+H⁺) bei m/z 326,4 (100 % rel. Int.)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,86 (d, 3 H, Methyl), 1,72 (m, 2 H, -CH₂-**CH**₂-CH₂-N<), 2,19 (m, 1 H, H-3* Morpholin), 2,23 (m, 1 H, -CH₂-**CH**₂-N<), 2,26 (m, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,56 (m, 2 H, Ar-**CH**₂-CH₂-), 2,64 (m, 1 H, -CH₂-**CH**₂-N<), 2,71 (m 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,18 (t, 1 H, H-2ax. Morpholin), 3,56 (m, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,61 (m, 1 H, H-2äq. Morpholin), 3,70 (td, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, -O-**CH**₂-Ar), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,16 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,21 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 13,0 (Methyl), 26,5 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 32,4 (Ar- CH_2-CH_2-), 50,0 (C-5 Morpholin), 52,1 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 54,1 ($^*\text{C}$ -3 Morpholin), 64,8 (C-6 Morpholin), 66,5 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 68,8 (C-2 Morpholin), 113,8 (C2 und 6 exo-Ring), 119,9 (C-4 exo-Ring), 126,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 128,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,5 (C-4 endo-Ring), 140,9 (C-1 endo-Ring), 157,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 69,69 %, H 7,80 %, N 3,87 %, O 8,84 %, Cl 9,80 %
gef.: C 69,29 %, H 7,83 %, N 3,65 %

4.1.6.4. *rac*-2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-propan-1-ol (O/W10), (**23**)

207 mg **3** (0,68 mmol) und 134 mg **20** (1,12 mmol) werden analog Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. Die mit einer Ausbeute von 79,2 % d.Th. erhaltene **23**-Base wird mit Ether/ HCl_g zum O/W10-HCl vom Schmelzpunkt 103 °C (Isopropanol/Hexan) umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,81 (t, 3 H, Methyl), 1,75 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,34 (m, 1 H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$), 2,41 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,46 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,58 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,63 (m, 1 H, $>\text{N}-^*\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$), 2,66 (m, 1 H, Ar- CH_2-CH_2-), 3,05 (m, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,28 (m, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$), 3,49 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 4,95 (s, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,14 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,23 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

$^{13}\text{C-NMR}$: 60 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 9,6 (Methyl), 30,6 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 33,2 (Ar- CH_2-CH_2-), 49,7 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 50,8 ($>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$), 56,6 ($>\text{N}-^*\text{CH}-\text{CH}_2$), 60,3 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$), 63,4 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), 69,8 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-

Ring), 127,8 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,5 (C-4 endo-Ring), 141,8 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 66,39 %, H 7,96 %, N 3,69 %, O 12,63 %, Cl 9,33 %
gef.: C 65,62 %, H 8,01 %, N 3,41 %

4.1.7. Synthese von *rac*-O/W11 und *rac*-O/W12

4.1.7.1. *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)butan-1-ol (**24**)

82,2 g (0,92 mol) 2-Aminobutan-1-ol werden mit 10,0 g Ethylenoxid (227 mmol) analog Vorschrift 4.1.6.1. umgesetzt. Das farblose viskose Produkt vom Brechungsindex 1,468 ([82] n_D^{20} 1,4677) siedet bei 98 °C/6,7 mbar (Lit. [82] 138 - 40 °C/16 mbar). Die Ausbeute beträgt 86,3 % d.Th. berechnet auf das eingesetzte Ethylenoxid.

4.1.7.2. *rac*-3-Ethylmorpholin (**25**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 34,34 g **24** (0,26 mol). **25** siedet bei 83 °C/75 mbar ([82] 156,5 – 157,5 °C). Die Ausbeute beträgt 69 % d.Th. ([82] 72 %, [75] 68,3 %). Die stechend riechende, farblose Flüssigkeit hat eine Brechungsindex von 1,4450 ([82] n_D^{20} 1,4519). Das **25**-HCl schmilzt bei 179 °C (Isopropanol).

GC: Retentionszeit Hauptpeak 6,68 min (99 %), Nebenpeaks bei 5,16, 7,40 min

EI-MS; Molpeak (M+H+) bei m/z 115,8 (100 % rel. Int.)

4.1.7.3. *rac*-3-Ethyl-4-{3-[4-(phoxymethyl)phenyl]propyl}-morpholin (O/W11), (**26**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.3. unter Einsatz von 1,0 g **2** (3,84 mmol) und 22,1 g **25** (191,8 mmol) unter 6stündigem Erhitzen auf 110 - 120 °C. **26** wird als gelbes bis braunes Öl erhalten, das nach sc-Reinigung (80 g Kieselgel 60, Säule 400 x 20 mm, mobile Phase Methanol) mit Ether/HClgg zum O/W11-HCl umgesetzt wird. Die durchschnittliche

Ausbeute aus 9 Ansätzen beträgt 49,7 % d.Th. Das O/W11-HCl schmilzt bei 110 °C (Iso-Propanol/Hexan).

EI-MS: Molpeak (M+H+) bei m/z 340,4 (100 % rel. Int.), Fragment bei m/z 158,2 (11,4 %)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,78 (t, 3 H, Methyl), 1,31 (m 1 H, -*CH-CH₂-CH₃), 1,47 (m, 1 H, -*CH-CH₂-CH₃), 1,71 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,17 (m, 1 H, H-3* Morpholin), 2,24 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,28 (m, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,56 (m, 2 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,66 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,70 (m 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,31 (m, 1 H, H-2ax. Morpholin), 3,56 (m, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,66 (m, 1 H, H-2äq. Morpholin), 3,70 (m, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,88 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,15 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,23 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,29 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 9,1 (Methyl), 18,9 (-*CH-CH₂-CH₃), 26,7 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 32,4 (Ar-CH₂-CH₂-), 49,9 (C-5 Morpholin), 52,0 (-CH₂-CH₂-N<), 59,7 (*C-3 Morpholin), 66,2 (C-6 Morpholin), 68,8 (-O-CH₂-Ar), 69,3 (C-2 Morpholin), 113,8 (C2 und 6 exo-Ring), 119,9 (C-4 exo-Ring), 126,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 127,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 128,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 133,5 (C-4 endo-Ring), 141,0 (C-1 endo-Ring), 157,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 69,53 %, H 8,04 %, N 3,73 %, O 8,51 %, Cl 9,43 %
gef.: C 69,53 %, H 7,93 %, N 3,50 %

4.1.7.4. *rac*-2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-butan-1-ol (O/W12), (**27**)

0,5 g **2** (1,92 mmol) werden mit 13,15 g **24** (57,6 mmol) versetzt und bei 120 °C für 6 h gerührt (DC-Kontrolle, Methanol, Detektion UV). Das überschüssige Edukt wird bei vermindertem Druck abdestilliert (136 °C/5 mbar). Der Rückstand wird in 10 %iger HCl aufgenommen und dreimal mit Diethylether extrahiert. Nach Alkalisieren der wäßrigen Phase mit 10 %iger NaOH wird der ausgefallene Niederschlag mit Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wird bis zur neutralen Reaktion mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. **27** wird als schwach gelbes Öl mit einer Ausbeute von 95,5 % d.Th. erhalten. Das O/W12-Hydrochlorid schmilzt bei 102 °C (Isopropanol/Hexan).

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,93 (t, 3 H, Methyl), 1,24 (m, 1 H, -*CH-CH₂-CH₃), 1,57 (m, 1 H, -*CH-CH₂-CH₃), 1,84 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,59 (m, 1 H, >N-CH₂-CH₂OH), 2,61 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,68 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,71 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,75 (m, 1 H, >N-*CH-CH₂OH), 2,82 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 3,35 (t, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,58 (m, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,62 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-OH), 5,05 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,97 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,22 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,30 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,37 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 100 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 11,8 (Methyl), 19,1 (-*CH-CH₂-CH₃), 30,8 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 33,1 (Ar-CH₂-CH₂-), 50,1 (-CH₂-CH₂-N<), 51,9 (>N-CH₂-CH₂OH), 60,4 (-CH₂-CH₂-OH), 61,4 (-*CH-CH₂-OH), 63,9 (>N-*CH-CH₂), 69,8 (-O-CH₂-Ar), 114,9 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,6 (C-4 endo-Ring), 141,7 (C-1 endo-Ring), 158,9 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 67,07 %, H 8,19 %, N 3,56 %, O 12,18 %, Cl 9,00 %
gef.: C 66,68 %, H 8,20 %, N 3,37 %

4.1.8. Synthese von *rac*-O/W13 und *rac*-O/W144.1.8.1. *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)pentan-1-ol (**28**)

20 g (135,8 mmol) 2-Aminopentan-1-ol und 3,2 g (80 mmol) Ethylenoxid werden nach Vorschrift 4.1.6.1. umgesetzt. Das schwach gelbe, viskose Produkt vom Brechungsindex 1,479 siedet bei 103 °C/0,04 mbar ([87] 122 °C/1,1 mbar). Die Ausbeute beträgt 63,0 % d.Th. berechnet auf das eingesetzte Ethylenoxid.

4.1.8.2. *rac*-3-Propylmorpholin (**29**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 17,0 g (115,48 mmol) **28** und 15stündigem Erhitzen auf 140 °C. **29** siedet bei 78 °C/25 mbar ([87] 158 °C). Die Ausbeute beträgt 80,5 % d.Th. Die stechend riechende, farblose Flüssigkeit hat einen Brechungsindex von 1,453. Das **29**-HCl schmilzt bei 180 °C (Isopropanol) ([87] 179 °C).

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 5,31 min (99%), Nebenpeak bei 5,75 min, Molpeak bei m/z 129 (13 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 99 (3 %), 86 (100 %), 70 (41 %), 56 (26 %)

4.1.8.3. *rac*-4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-3-propylmorpholin (O/W13), (**30**)

1,17 g **3** (3,84 mmol) und 743 mg **29** (5,75 mmol) werden nach Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 120 Stunden. Die erhaltene Base wird mit Ether/HCl_g zum Hydrochlorid umgesetzt. Die durchschnittliche Ausbeute an **30**, das als schwach gelbes Öl anfällt, aus drei Ansätzen beträgt 77,6 % d.Th. Das O/W13-Hydrochlorid schmilzt bei 144 °C (Isopropanol/Hexan).

EI-MS: Molpeak bei m/z 353 (11 % rel. Int), Fragmente bei m/z 310 (100 %), 280 (3 %), 216 (2 %), 142 (20 %), 131 (21 %), 109 (13 %), 100 (19 %)

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,91 (t, 3 H, Methyl), 1,25 (m 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,28 (m, 1 H, $-\text{*CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,35 (m 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,46 (m, 1 H, $-\text{*CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,81 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,28 (m, 1 H, H-3* Morpholin), 2,34 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,36 (m, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,66 (m, 2 H, Ar- CH_2-CH_2-), 2,75 (m, 1 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 2,77 (m 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,40 (dd, 1 H, H-2ax. Morpholin), 3,66 (m, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,74 (m, 1 H, H-2äq. Morpholin), 3,75 (m, 1 H, H-6äq. Morpholin), 5,05 (s, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 6,98 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,23 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,30 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,35 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

^{13}C -NMR: 100 MHz, CDCl_3

δ (ppm): 4,5 (Methyl), 19,3 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 27,7 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 29,4 ($-\text{*CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 33,4 (Ar- CH_2-CH_2-), 50,9 (C-5 Morpholin), 53,0 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 59,4 ($\text{*C}-3$ Morpholin), 67,2 (C-6 Morpholin), 69,8 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 70,7 (C-2 Morpholin), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,5 (C-4 endo-Ring), 142,0 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 70,84 %, H 8,27 %, N 3,59 %, O 8,21 %, Cl 9,09
gef.: C 69,45 %, H 8,32 %, N 3,50 %

4.1.8.4. *rac*-2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)pentan-1-ol (O/W14), (**31**)

200 mg **3** (0,66 mmol) und 145 mg **28** (0,98 mmol) werden analog Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. Die erhaltene Base wird mit Ether/ HCl_g zum Hydrochlorid umgesetzt. Die Ausbeute an **31** beträgt 42,2 % d.Th. Die Substanz ist noch zu ca. 10 % mit **28** verunreinigt. Das Hydrochlorid schmilzt bei 71 °C (roh).

^1H -NMR: 250 MHz, CDCl_3 , Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,86 (t, 3 H, Methyl), 1,25 (m, 4 H, -*CH-CH₂-CH₂-CH₃), 1,84 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,57 (m, 1 H, >N-CH₂-CH₂OH), 2,60 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,64 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,69 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,70 (m, 1 H, >N-*CH-CH₂OH), 2,71 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 3,26 (m, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,39 (m, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,50 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-OH), 4,95 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,89 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,13 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,23 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,27 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 14,4 (Methyl), 20,5 (-CH₂-CH₂-CH₃), 29,0 (-*CH-CH₂-CH₂-), 30,2 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 31,2 (Ar-CH₂-CH₂-), 49,2 (-CH₂-CH₂>N-), 52,3 (>N-CH₂-CH₂OH), 60,4 (-CH₂-CH₂-OH), 61,9 (-*CH-CH₂-OH), 62,0 (>N-*CH-CH₂), 70,4 (-O-CH₂-Ar), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,8 (C-4 exo-Ring), 127,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,7 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,5 (C-4 endo-Ring), 141,5 (C-1 endo-Ring), 158,9 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 67,71 %, H 8,40 %, N 3,43 %, O 11,77 %, Cl 8,69 %
gef.: C 65,79 %, H 8,50 %, N 2,80 %

4.1.9. Synthese von *rac*-O/W15 und *rac*-O/W16

4.1.9.1. *rac*-2-(2-Hydroxyethylamino)-3-methylbutan-1-ol (**32**)

21,0 g (142,6 mmol) 2-Amino-3-methylbutan-1-ol und 5,0 g Ethylenoxid (113,5 mmol) werden nach der Vorschrift 4.1.6.1. umgesetzt. Das schwach gelbe, viskose Produkt vom Brechungsindex 1,472 siedet bei 100 °C/0,06 mbar. Die Ausbeute beträgt 86,9 % d.Th. berechnet auf das eingesetzte Ethylenoxid.

4.1.9.2. *rac*-3-*i*-Propylmorpholin (**33**)

Die Synthese erfolgt analog Vorschrift 4.1.2.2. unter Einsatz von 20,2 g (149,5 mmol) **32** und 14stündigem Erhitzen auf 145 °C. **33** siedet bei 88 °C/50 mbar ([85] 158 °C). Die Ausbeute

beträgt 80,5 % d.Th. Die stechend riechende farblose Flüssigkeit hat einen Brechungsindex von 1,450 (20 °C). Das **33**-HCl schmilzt bei 210 °C (Isopropanol).

GC-MS: Retentionszeit Hauptpeak 5,03 min (100 %), Molpeak bei m/z 129 (4 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 99 (3 %), 86 (100 %), 70 (20 %), 56 (52 %)

4.1.9.3. *rac*-4-{3-[4-(Phenoxymethyl)phenyl]propyl}-3-isopropylmorpholin (O/W15), (**34**)

1,17 g **3** (3,84 mmol) und 991 mg **33** (7,67 mmol) werden nach Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 168 Stunden. Die erhaltene Base wird mit Ether/HCl_g zum Hydrochlorid umgesetzt. Die durchschnittliche Ausbeute an **33**, das als gelbbraunes Öl anfällt, aus 5 Ansätzen beträgt 54,4 % d.Th. Das O/W15-Hydrochlorid schmilzt bei 119 °C (iso-Propanol/Hexan).

EI-MS: Molpeak bei m/z 352 (1 % rel. Int.), Fragmente bei m/z 310 (100 %), 216 (4 %), 131 (14,4 %), 108 (16,8 %), 100 (16 %), 91 (4 %)

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,82 (t, 6 H, -CH-(CH₃)₂), 1,71 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,08 (m, 1 H, -*CH-CH-(CH₃)₂), 2,20 (m, 1 H, H-3* Morpholin), 2,25 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,28 (m, 1 H, H-5ax. Morpholin), 2,54 (m, 2 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,71 (m, 1 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,76 (m, 1 H, H-5äq. Morpholin), 3,27, (t, 1 H, H-2ax. Morpholin), 3,48 (dt, 1 H, H-6ax. Morpholin), 3,67 (m, 1 H, H-2äq. Morpholin), 3,71 (m, 1 H, H-6äq. Morpholin), 4,95 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,88 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,16 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,23 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,28 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 15,0 (Methyl), 18,6 (Methyl), 24,7 (-*CH-CH-(CH₃)₂), 26,1 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 32,5 (Ar-CH₂-CH₂-), 50,8 (C-5 Morpholin), 51,3 (-CH₂-CH₂>N-), 63,2 (*C-3 Morpholin), 64,5 (C-6 Morpholin), 64,9 (-O-CH₂-Ar), 67,9 (C-2 Morpholin),

112,9 (C2 und 6 exo-Ring), 118,9 (C-4 exo-Ring), 125,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 126,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 127,5 (C-3 und 5 exo-Ring), 132,5 (C-4 endo-Ring), 140,1 (C-1 endo-Ring), 156,9 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 70,84 %, H 8,27 %, N 3,59 %, O 8,21 %, Cl 9,09 %
gef.: C 70,53 %, H 8,25 %, N 3,37 %

4.1.9.4. *rac*-2-((2-Hydroxyethyl)-{3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl}amino)-3-methylbutan-1-ol (O/W16), (**35**)

300 mg **3** (0,98 mmol) und 300 mg **32** (2,04 mmol) werden analog Vorschrift 4.1.2.4. umgesetzt. Die erhaltene Base wird mit Ether/HCl_g zum Hydrochlorid umgesetzt. Die Ausbeute des Rohproduktes von **35**, das als hellbraunes Öl anfällt und noch zu ca. 25 % mit **32** verunreinigt ist, beträgt 12,6 % d.Th. Das Hydrochlorid (roh) fällt ebenfalls ölig an.

¹H-NMR: 250 MHz, CDCl₃, Kalibrierung auf das Lösungsmittel

δ (ppm): 0,91 (m, 6 H, -CH-(CH₃)₂), 1,78 (m, 3 H, -*CH-CH-(CH₃)₂ und -CH₂-CH₂-CH₂-N<), 2,35 (m, 1 H, >N-CH₂-CH₂OH), 2,42 (m, 2 H, -CH₂-CH₂-N<), 2,65 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,68 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,71 (m, 1 H, >N-*CH-CH₂OH), 2,81 (m, 1 H, Ar-CH₂-CH₂-), 3,23 (m, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,32 (m, 1 H, -*CH-CH₂-OH), 3,62 (m, 2 H, >N-CH₂-CH₂-OH), 5,01 (s, 2 H, -O-CH₂-Ar), 6,93 (m, 3 H, arom. H an C-2, 4, 6 exo-Ring), 7,20 (d, 2 H, arom. H an C-2 und 6 endo-Ring), 7,24 (m, 2 H, arom. H an C-3 und 5 exo-Ring), 7,32 (d, 2 H, arom. H an C-3 und 5 endo-Ring)

¹³C-NMR: 60 MHz, CDCl₃

δ (ppm): 18,4 und 19,6 (-CH-(CH₃)₂), 21,8 (-CH-(CH₃)₂), 29,0 (-CH₂-CH₂-CH₂-N<), 32,3 (Ar-CH₂-CH₂-), 51,2 (-CH₂-CH₂-N<), 53,8 (N-CH₂-CH₂OH), 60,8 (-CH₂-CH₂-OH), 61,3 (-*CH-CH₂-OH), 64,3 (>N-*CH-CH-), 69,8 (-O-CH₂-Ar), 114,8 (C2 und 6 exo-Ring), 120,9 (C-4 exo-Ring), 127,7 (C-3 und 5 endo-Ring), 128,6 (C-2 und 6 endo-Ring), 129,4 (C-3 und 5 exo-Ring), 134,5 (C-4 endo-Ring), 141,8 (C-1 endo-Ring), 158,8 (C-1 exo-Ring)

Elementaranalyse (HCl): ber.: C 67,71 %, H 8,40 %, N 3,43 %, O 11,77 %, Cl 8,69 %
gef.: C 55,42 %, H 7,35 %, N 3,18 %

4.1.10. Synthese von 2S,3S- und 2R,3R-Dianisoylweinsäure (T3)

4.1.10.1. 2S,3S-2,3-Dianisoylweinsäure (2S,3S-T3), (**36**)

27,28 g (181,7 mmol) bei 105 °C getrocknete D-Weinsäure (2S, 3S) werden mit 62,0 g (363,4 mmol) Anisoylchlorid bis zum Aufhören der HCl-Entwicklung auf 120 °C erhitzt. Das hellbraune Reaktionsprodukt wird nach dem Abkühlen gepulvert, zweimal mit 100 ml Wasser ausgekocht und dann im Vakuum über P₂O₅ getrocknet. Zur Reinigung wird in 150 ml heißem Aceton gelöst, filtriert und auf ca. 100 ml eingeeengt. Über Nacht kristallisiert der größte Teil der mit gebildeten Anissäure aus. Das erhaltene Filtrat wird eingedampft und unter Rühren erstarren gelassen. Der Rückstand wird an der Luft getrocknet, fein zerrieben und noch einige Zeit auf 80°C erhitzt. Zur Feinreinigung wird das Produkt so oft mit Toluol ausgekocht, bis in der DC-Kontrolle (Lösung 10 mg **36**/5 ml Aceton, 20 µl, EtOH/Toluol (1+1), + 2,5 % HOAc, Detektion UV) keine Anissäure mehr detektierbar ist. Nach dem Trocknen bei 115 °C beträgt die Ausbeute an **36** 34,5 % d.Th. Die weißen Kristalle schmelzen bei 192 °C. Die spezifische Drehung α_D^{20} beträgt +144,2° (Ethanol, 1,1 mg/ml)

4.1.10.2. 2R,3R-2,3-Dianisoylweinsäure (2R,3R-T3), (**37**)

27,28 g (181,7 mmol) bei 105 °C getrocknete L-Weinsäure (2R, 3R) werden mit 62,0 g (363,4 mmol) Anisoylchlorid nach Vorschrift 4.1.10.1. umgesetzt und aufgearbeitet. Nach dem Trocknen bei 115 °C beträgt die Ausbeute an **37** 60,7 % d.Th. Die weißen Kristalle schmelzen bei 190 °C ([134] 186 °C). Die spezifische Drehung α_D^{20} beträgt -169,4° (Ethanol, 1,8 mg/ml) ([134] α_D^{20} = -162,8°).

4.1.11. *rac*-4-Benzoylmorpholine zur HPLC-Analytik4.1.11.1. Vorsäulenderivatisierung der *rac*-C-Alkylmorpholine, allgemeines Verfahren

Etwa 1 mmol (102 – 143 mg) des entsprechenden Morpholinderivates werden in 30 ml frisch destilliertem Diethylether gelöst und mit einer Spatelspitze K_2CO_3 versetzt. Unter Rühren werden 70,3 mg (0,5 mmol) Benzoylchlorid zugetropft und zwei Stunden weitergerührt. Danach wird die organische Phase fünfmal mit 10 ml 5 % Na_2CO_3 -Lösung und dreimal mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird der Ether abdestilliert. Der verbleibende Rückstand dient zur Herstellung der HPLC-Untersuchungslösung in einer Konzentration von 150 - 200 $\mu g/ml$ n-Hexan/Ethanol 90/10.

4.1.11.2. Benzamide der *rac*-C-Alkylmorpholine zur HPLC-Analytik

lfd. Nr.	Name	interne Bezeichnung
<u>38</u>	4-Benzoyl-2-methylmorpholin	NBM1
<u>39</u>	4-Benzoyl-2-ethylmorpholin	NBM2
<u>40</u>	4-Benzoyl-2-propylmorpholin	NBM3
<u>41</u>	4-Benzoyl-2-butylmorpholin	NBM4
<u>42</u>	4-Benzoyl-3-methylmorpholin	NBM5
<u>43</u>	4-Benzoyl-3-ethylmorpholin	NBM6
<u>44</u>	4-Benzoyl-3-propylmorpholin	NBM7
<u>45</u>	4-Benzoyl-3-isopropylmorpholin	NBM8

Tabelle 18: Interne Bezeichnungen der Benzamide der C-Alkylmorpholine

4.1.12. Synthese von *nrac*-(-)-O/W3 und *nrac*-(+)-O/W34.1.12.1. *nrac*-(-)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin, (-)-O/W3 (86% *ee*), (46)

1,76 g 3 (5,75 mmol) und 994 mg (-)-2-Ethylmorpholin (86 % *ee*, s. Abschn. 4.2.2.1.) (8,63 mmol) werden nach Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 72 Stunden. Die erhaltene Base wird hplc auf ihr Enantiomerenverhältnis geprüft und zum Hydrochlorid umgesetzt. 46 wird mit einer Ausbeute von 94,3 % d.Th. erhalten. Das Hydrochlorid schmilzt bei 136 - 37 °C (iso-Propanol/Hexan). Die spezifische Drehung α_D^{20} der Substanz beträgt -7,4° (Methanol, 4 mg/ml).

4.1.12.2. *nrac*-(+)-2-Ethyl-4-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholin. (+)-O/W3
(75% *ee*), (**47**)

1,76 g **3** (5,75 mmol) und 994 mg (+)-2-Ethylmorpholin (75 % *ee*, s. Abschn. 4.2.2.1.) (8,63 mmol) werden nach Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 72 Stunden. **47** wird mit einer Ausbeute von 88,1 % d.Th. erhalten. Die erhaltene Base wird hplc auf ihr Enantiomerenverhältnis geprüft und mit Ether/HClg zum Hydrochlorid umgesetzt. Das Hydrochlorid schmilzt bei 136 - 37 °C (iso-Propanol/Hexan). Die spezifische Drehung α_D^{20} der Substanz beträgt +5,0° (Methanol, 4 mg/ml).

4.1.13. Synthese von *nrac*-(-)-O/W13 und *nrac*-(+)-O/W13

4.1.13.1. *nrac*-(-)-4-[3-(4-Phenoxyethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin (-)-O/W13
(83% *ee*), (**48**)

1,76 g **3** (5,75 mmol) und 1,11 g (+)-3-Propylmorpholin (83 % *ee*, s. Abschn. 4.2.2.2.) (8,63 mmol) werden nach der Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 144 Stunden. **48** wird mit einer Ausbeute von 72 % d.Th. erhalten. Die erhaltene Base wird hplc auf ihr Enantiomerenverhältnis geprüft und mit Ether/HClg zum Hydrochlorid umgesetzt. Das Hydrochlorid schmilzt bei 130 - 33 °C (Isopropanol/Hexan). Die spezifische Drehung α_D^{20} der Substanz beträgt -9,8° (Methanol, 1 mg/ml).

4.1.13.2. *nrac*-(+)-4-[3-(4-Phenoxyethyl)phenyl]propyl-3-propylmorpholin (+)-O/W13
(79,5% *ee*), (**49**)

1,76 g **3** (5,75 mmol) und 1,11 g (-)-3-Propylmorpholin (85,3 % *ee*, s. Abschn. 4.2.2.2.) (8,63 mmol) werden nach der Vorschrift 4.1.5.3. umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 144 Stunden. **49** wird mit einer Ausbeute von 62,4 % d.Th. erhalten. Die erhaltene Base wird hplc auf ihr Enantiomerenverhältnis geprüft und mit Ether/HClg zum Hydrochlorid umgesetzt. Das Hydrochlorid schmilzt bei 127 °C (Isopropanol/Hexan). Die spezifische Drehung α_D^{20} der Substanz beträgt +9,3° (Methanol, 1,1 mg/ml).

4.2. Racemattrennungen durch Bildung diastereomerer Salze

4.2.1. Kristallisationen im analytischen Maßstab

Aus enantiomerenreiner 2R,3R-2,3-Dibenzoylweinsäure (**2R,3R-T1**, Fluka), 2R,3R-2,3-Ditoluylweinsäure (**2R,3R-T2**, VWR) und 2R,3R-2,3-Dianisoylweinsäure (**2R,3R-T3**) werden zwei Stammverreibungen im molaren Verhältnis 0:2:1 (**T_a R**) und 1:1:1 (**T_b R**) hergestellt.

1 mmol des jeweiligen Morpholinderivates werden mit einem Äquivalent **T_a** oder **T_b** und so viel Ethanol versetzt, dass in der Siedehitze eine klare Lösung resultiert. Die nach dem Abkühlen erhaltenen Kristalle werden abzentrifugiert, getrocknet und aus Ethanol umkristallisiert. Zur Spaltung wird das Salz in wenig Wasser gelöst, mit 10 %iger NaOH auf pH 11 gebracht und kurz erwärmt. Die Morpholinbasen werden fünfmal mit je 10 ml frisch destilliertem Ether ausgeschüttelt. Die über Na₂SO₄ getrocknete etherische Lösung wird wie unter 1.20.1. beschrieben aufgearbeitet und das Enantiomerenverhältnis des erhaltenen 4-Benzoylmorpholins hplc (Tabelle 19) bestimmt.

NBM	HPLC-System (Säule, mobile Phase)
1 (38)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
2 (39)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
3 (40)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
4 (41)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
5 (42)	AS, n-Hexan / Ethanol 97,5 / 2,5
6 (43)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
7 (44)	OD, n-Hexan/TBME 70/30
8 (45)	OD, n-Hexan/TBME 70/30

Tabelle 19: HPLC-Systeme zur Analytik der NBM-Verbindungen

4.2.2. Kristallisationen im präparativen Maßstab

4.2.2.1. Präparative Racemattrennung von *rac*-2-Ethylmorpholin

14,41 g **9** (125,1 mmol) und 49,28 g des Weinsäuremixes **T_b S** (15,68 g **2S,3S-T1**, 16,13 g **2S,3S-T2**, 17,47 g **2S,3S-T3**) werden in 150 ml heißem Ethanol gelöst und die erhaltene klare Lösung eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen und erfolgter Kristallisation (ca. 24 h im Kühlschrank) wird der Niederschlag abgesaugt und aus 200 ml Ethanol umkristallisiert. Nach Absaugen und Trocknen werden 17,82 g der diastereomeren Salz-

mischung erhalten. Die Kristalle werden in der Wärme mit 1M-NaOH (ca. 350 ml) bis zum Entstehen einer klaren Lösung versetzt. Die Morpholinbase wird aus dieser Lösung mit Diethylether am Perforator über 48 h extrahiert und nach Trocknen über Na₂SO₄, Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses und Abrotieren des Ethers fraktioniert destilliert. Die Reinheitsprüfung erfolgt durch Umsetzung von 10 ml Extraktlösung mit Benzoylchlorid zum Amid nach 4.1.11.1. und nachfolgender HPLC-Analyse. Aus der Destillation werden 3,086 g (+)-**9** vom Siedepunkt 77 °C/75 mbar in einem Enantiomerenverhältnis (als NBM2) von 86:14 erhalten. Das 4-Benzoylderivat hat eine spezifische Drehung α_D^{20} von +21,7° (Diethylether, 3,2 mg/ml). Die freie Base in Methanol (2,1 mg/ml) ist ebenfalls rechtsdrehend (α_D^{20} +14,1°).

Die ethanolischen Mutterlaugen dieser Kristallisation werden einrotiert, das erhaltene Salz wie oben gespalten und die Base extrahiert, auf ihr Enantiomerenverhältnis geprüft und destilliert. Die dabei erhaltenen 8,678 g *rac*-**9** im Enantiomerenverhältnis 34,75:65,25 (als NBM2) werden nach dem selben Verfahren mit der äquimolaren Menge von 31,68 g (75,345 mmol) des Mixes **T_b R** (9,81 g **2R,3R-T1**, 10,52 g **2R,3R-T2**, 11,35 g **2R,3R-T3**) umgesetzt. Aus diesem Ansatz werden 2,6795 g (-)-**9** vom Siedepunkt 78 °C/65 mbar mit einem Enantiomerenverhältnis von 7,6:92,4 (als NBM2) erhalten. Die spezifische Drehung des 4-Benzoylderivates (Diethylether, 1,5 mg/ml) beträgt -25,8°, die der Base in Methanol (2,2 mg/ml) -13,6°.

4.2.2.2. Präparative Racemattrennung von *rac*-3-Propylmorpholin

39,6 g des Weinsäuremixes **T_a R** (25,67 g **2R,3R-T2**, 13,93 g **2R,3R-T3**) werden in der Wärme mit 170 ml Ethanol bis zur vollständigen Lösung versetzt und unter Rühren mit 12,93 g **29** (100 mmol) versetzt. Die Mischung wird für zwei Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen und erfolgter Kristallisation (24 h im Kühlschrank) wird der Niederschlag abgesaugt und aus 120 ml Ethanol umkristallisiert. Nach Absaugen und Trocknen werden 21,25 g der diastereomeren Salzmischung erhalten. Die Kristalle werden in der Wärme mit 1M-NaOH (ca. 300 ml) bis zum Entstehen einer klaren Lösung versetzt. Die Morpholinbase wird aus dieser Lösung mit Diethylether am Perforator über 48 h extrahiert und nach Trocknen über Na₂SO₄ und Abrotieren des Ethers fraktioniert destilliert. Aus der Destillation werden 4,467 g *rac*-**29** vom Siedepunkt 81 °C/30 mbar erhalten, die nochmals mit der äquimolaren Menge von 13,83 g **T_a R** (8,91 g **2R,3R-T2**, 4,92 g **2R,3R-T3**) aus 50 ml Ethan-

ol kristallisiert werden. Nach Umkristallisieren und Trocknen werden 11,89 g Salzmischung erhalten, die nach Spaltung, Extraktion, Trocknen, Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses und Destillation 2,04 g (-)-**29** vom Siedepunkt 72 °C/20 mbar liefern. Das Enantiomerenverhältnis beträgt 92,7:7,3 (als NBM7). Die spezifische Drehung α_D^{20} des 4-Benzoylderivates beträgt +56,1° (Diethylether, 5,6 mg/ml). Die Base in Methanol (5,6 mg/ml) ist mit α_D^{20} von -7,2° linksdrehend.

Die ethanolischen Mutterlaugen der beiden Kristallisationen werden einrotiert, das erhaltene Salz wie oben gespalten und die Base extrahiert und destilliert. Bei 79 °C/35 mbar gehen 5,37 g *rac*-**29** über, die nach dem selben Verfahren mit der äquimolaren Menge von 16,49 g (41,55 mmol) des Mixes **T_a S** (10,70 g **2S,3S-T2**, 5,79 g **2S,3S-T3**) kristallisiert werden. Aus diesem Ansatz werden 2,33 g (+)-**29** vom Siedepunkt 79 °C/35 mbar mit einem Enantiomerenverhältnis von 8,8:91,2 (als NBM7) erhalten. Die spezifische Drehung α_D^{20} des 4-Benzoylderivates beträgt -52,0° (Diethylether, 8,1 mg/ml), während die Base in Methanol (2,1 mg/ml) mit α_D^{20} von +9,4° rechtsdrehend ist.

4.3. HPLC-Untersuchungen

4.3.1. Analytische HPLC an drei verschiedenen CSP

Alle Versuche zur analytischen Racemattrennung der O/W-Substanzen und der 4-Benzoylmorpholine wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

HPLC-System: Systemcontroller SCL10-Avp, Autoinjektor SIL-10A, UV-Detektor SPD-10A, 2 Pumpen LC-10A, PC-gestützte Steuerung und Auswertung mit der Software CLASS-VP 5.03 (alle Shimadzu, Duisburg), Säulenofen Jetstream plus (Jasco, Groß-Umstadt)

stationäre Phasen: Chiralcel[®] OD [Cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbammat)] auf Kieselgel (10 µm), 250 x 4,6 mm mit Vorsäule 50 x 4,6 mm (Daicel Chemical Industries, Tokio)

Chiralpak[®] AS (Amylose-tris-[(S)- α -methylbenzylcarbammat]) auf Kieselgel (10 µm), 250 x 4,6 mm mit Vorsäule 50 x 4,6 mm (Daicel Chemical Industries, Tokio)

Chiralpak[®] AD [Amylose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamat)] auf Kieselgel, (10 μm), 250 x 4,6 mm ohne Vorsäule (von Prof. B. Chankvetadze, Münster zu Testzwecken überlassen

Zur Herstellung der Prüflösungen wurden 1,5-2 mg des jeweiligen O/W-Hydrochlorids in 1 ml Wasser gelöst, mit verd. NaOH alkalisiert und zwei mal mit 5,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde so eine Lösung der freien Base in einer ungefähren Konzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhalten. Von den 4-Benzoylmorpholinen wurden jeweils 1,5 mg in 1,0 ml Ethanol gelöst und mit n-Hexan ad 10,0 ml ergänzt.

Chromatographie: Flußrate 0,8 - 1,0 ml/min, Detektion UV 220 nm, Injektion 20 μl der Prüflösung, Säulentemperatur 25 $^\circ\text{C}$, mobile Phase variabel

Das Screening auf geeignete Chromatographieparameter erfolgte unter den oben angegebenen Standardbedingungen und orientierte sich an den Empfehlungen von Kirkland [Lit.] zur Optimierung von Racemattrennungen an polysaccharidbasierten CSP. Die eingesetzten Lösungsmittel hatten - wenn erhältlich - *gradient grade* Qualität (LiChrosolv[®], VWR, Darmstadt). Ansonsten wurde der jeweils höchste verfügbare Reinheitsgrad verwendet. Das Ziel der chromatographischen Untersuchungen war immer, für die Selektivität k_α der Trennung der Enantiomere einen Wert größer 1,4 bei einer Analysenlaufzeit von weniger als 40 min zu erreichen, da aufgrund eigener und in der Arbeitsgruppe gemachter Erfahrungen erst ab diesen Grenzwerten eine präparative Trennung im größeren Maßstab ökonomisch sinnvoll durchführbar erscheint. Ausgehend von einer mobilen Phase der Zusammensetzung n-Hexan/iso-Propanol 90/10 (v/v) wurde zunächst der Alkoholanteil in Abhängigkeit vom Analyseergebnis nach oben oder unten variiert. Im dabei gefundenen Optimum wurde auf einen anderen Alkohol im gleichen Mischungsverhältnis gewechselt und das Ergebnis anhand der chromatographischen Parameter bewertet. Auf diese Weise wurden chromatographische Daten für alle drei Säulen mit Ethanol, Propanol, Butanol, 2-Butanol, tert-Butanol, Pentanol, 2- und 3-Pentanol sowie TBME als polaren Zusätzen zu der auf n-Hexan basierenden mobilen Phase erhoben. Im Hinblick auf eine spätere präparative Enantiomerentrennung wurden für die zuvor ausgewählten Verbindungen O/W3 und O/W13 die weiteren Chromatographiebedingungen wie Säulentemperatur und Flußrate innerhalb der vom Hersteller für die Säule

definierten Grenzen (T_{\max} . 40 °C, max. 1,5 ml/min) in Ausrichtung auf die oben angeführte Zielstellung optimiert.

4.3.2. Präparative HPLC an der Chiralcel[®] OD-Phase

Sämtliche Trennungen wurden an einer präparativen HPLC-Anlage mit einer Chiralcel[®] OD-Säule (50 x 5 cm) durchgeführt.

HPLC-System: HPLC-Pumpe Labomatic-HD-200 (Labomatic, Alschwil, CH), UV/VIS-Filterphotometer (Knauer, Berlin) mit 220 nm Filter, Thermostat julabo F12 (julabo, Ort), Schreiber Cromatopac C-6A (Shimadzu, Duisburg), 10 ml Probenaufgabeschleife, 6-Kanalschaltventil (manuell) zur Fraktionensammlung

stationäre Phase: Chiralcel[®] OD-Säule (50 x 5 cm) mit Kühlmantel (Daicel Chemical Industries, Tokio)

mobile Phase: n-Hexan (Lichrosolv[®] *gradient grade*, VWR, Darmstadt)/tert-Butanol (p.a., VWR, Darmstadt) 98/2

Flussrate: variabel von 224 bis 285 ml/min

Vor Beginn der Arbeiten an der präparativen Säule mußten durch Experimente im analytischen Maßstab die Startbedingungen für die präparative Racemattrennung festgelegt werden.

Dazu wurde unter den gefundenen optimierten Bedingungen die Substanzbeladung der analytischen Säule schrittweise so weit erhöht, bis im Chromatogramm gerade noch Basislinientrennung der Enantiomerenpeaks erreicht wurde. Diese Substanzmenge wurde mit dem Packungsmaterialfaktor 250 multipliziert und ergab damit den Substanzauftrag für eine erste präparative Trennung. Aufgrund der Erfahrungen aus früheren Trennungen [108 - 111] ergab sich für das Scaling up der Flußrate vom analytischen auf den präparativen Maßstab ein Faktor von 150. Die gefundene Säulentemperatur blieb unverändert. Unter den so festgelegten Bedingungen ließ sich die analytischen Trennung auf der präparativen Säule ohne große

Mischfraktion reproduzieren. Eine endgültige Optimierung der Racemattrennung in puncto Säulenbeladung und Laufzeit konnte jedoch erst im präparativen Maßstab erfolgen.

Die Reinheitsprüfung der aufgefangenen Fraktionen erfolgte an der analytischen Shimadzu-Anlage an einer analytischen OD- bzw. AD-Säule unter den für das jeweilige Fließmittel gefundenen optimierten Bedingungen.

4.3.2.1. Gewinnung von (-)-O/W3

Aus den aus der Synthese erhaltenen 2,55 g (-)-O/W3-HCl (84 % *ee*, **46**) wurde in wässriger Lösung mit 0,5-M NaOH die Base in Freiheit gesetzt und viermal mit je 75 ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einrotieren des Lösungsmittels wurden 2,32 g O/W3-Base erhalten. Die Substanz wurde im Fließmittel (23,2 ml) zu einer Stammlösung mit ca. 100 mg/ml gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung eines Volumenteils mit der mobilen Phase zu 10,0 ml die Lösungen für den gewünschten Substanzauftrag auf die präparative Säule erhalten.

Startbedingungen waren die durch Errechnung über die empirischen Faktoren aus den analytischen Daten erhaltenen Parameter.

	<u>analytisch</u>	<u>Faktor</u>	<u>präparativ</u>
Substanzauftrag:	400 µg	250	100 mg
Flussrate:	1,5 ml/min	150	224 ml/min
Säulentemperatur:	25 °C	1	25 °C
Detektion:	220 nm	-	220 nm

Unter diesen Bedingungen wurde eine erste Trennung durchgeführt und die Methode in den folgenden Läufen im Hinblick auf maximale Beladung bei minimaler Laufzeit und kleiner Übergangsfraction angepasst. Die gesammelten Fraktionen wurden an der analytischen OD-Säule unter den optimierten Bedingungen kontrolliert. Die mobile Phase aus den Trennungen konnte durch Redestillation am RV 1:1 wiedergewonnen werden. Eine Temperaturerhöhung auf 30 °C in den weiteren präparativen Läufen verbesserte die Peakschärfe und verringerte damit die Fraktionsgröße erheblich, was die etwas verringerte Selektivität der Trennung mehr als aufwog.

Auftrag	T [°C]	Fluß	t _R E1	t _R E2	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
100 mg	25	224	22,9	n.d.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
250 mg	25	230	26,3	n.d.	100 : 0	100 : 0	75 : 25	7 : 93	16 : 84
250 mg	30	221	17,0	29,0	100 : 0	100 : 0	39 : 61	0 : 100	0 : 100
250 mg	30	221	15,9	27	100 : 0	100 : 0	45 : 55	0,8 : 99,2	0 : 100
500 mg	30	230	13,4	23,3	100 : 0	99,5 : 0,5	31 : 69	3,8 : 96,2	0 : 100
500 mg	30	230	14,9	27,0	100 : 0	100 : 0	40 : 60	1,4 : 98,6	1,4 : 98,6
550 mg	30	236	13,9	26,0	100 : 0	99,4 : 0,6	29,71	2 : 98	0 : 100

Tabelle 20: Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (-)-O/W3 an der Chiralcel® OD-Säule (5 x 50 cm)

Die Fraktionen 1 und 2 wurden als (-)-O/W3, die Fraktionen 4 und 5 als *nrac*-(+)-O/W3 bei 360 mbar/40 °C an getrennten Rotationsverdampfern einrotiert. Die Übergangsfraction 3 wurde gesondert abdestilliert und die erhaltene nicht racemische Mischung für eine spätere Aufarbeitung zurückgestellt.

Die Gesamtausbeute aus den sieben Läufen betrug 1,717 g (-)-O/W3 der Reinheit 99,9 % *ee*, die mit Ether/HCl_g zu 1,876 g (-)-O/W3-HCl vom Schmelzpunkt 144 °C (Isopropanol/Hexan) umgesetzt wurden. Die spezifische Drehung α_D^{20} des Hydrochlorids in Methanol (3,9 mg/ml) wurde mit -7,6° bestimmt. Aus den Fraktionen 4 und 5 wurden 134 mg (+)-O/W3 (90,7 % *ee*) erhalten, die zum Rohprodukt zur Reinigung von (+)-O/W3 (74 % *ee*, **47**) gegeben wurden.

4.3.2.2. Gewinnung von (+)-O/W3

Aus den aus der Synthese erhaltenen 2,55 g (+)-O/W3-HCl (74 % *ee*) wurden nach 4.3.2.1. 2,32 g O/W3-Base in Freiheit gesetzt. Aus der Substanz wurde zusammen mit den aus der Trennung von (-)-O/W3 erhaltenen 134 mg (+)-O/W3-Base (90,7 % *ee*) nach Methode 4.3.2.1. die Stammlösung für die präparativen Trennungen hergestellt.

Startbedingungen für die erste präparative Trennung waren die durch Errechnung über die empirischen Faktoren aus den analytischen Daten erhaltenen Parameter, in die die Daten aus der Trennung von (-) O/W3 mit einfließen.

	<u>(-)-O/W3</u>	<u>Faktor</u>	<u>(+)-O/W3</u>
Substanzauftrag:	500 mg	0,5	250 mg
Flussrate:	230 ml/min	-	240 ml/min
Säulentemperatur:	30 °C	1	30 °C
Detektion:	220 nm	-	220 nm

Unter diesen Bedingungen wurde eine erste Trennung durchgeführt und die Methode in den folgenden Läufen im Hinblick auf maximale Beladung bei minimaler Laufzeit und kleiner Übergangsfraction angepasst. Die Kontrolle der aufgefängenen Fraktionen erfolgte analog 4.3.2.1.

Auftrag	T [°C]	Fluß	t _R E1	t _R E2	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
250 mg	30	241	15,6	18,3	99,3:0,7	13:87	0,6:99,4	0,3:99,7	2:98
250 mg	30	251	16,9	20,1	99,5:0,5	17:83	1,2:98,8	0,3:99,7	0,6:99,4
250 mg	30	266	18,2	21,5	100:0	15:85	0,3:99,7	0:100	0:100
400 mg	30	270	16,1	18,8	98,6:1,4	14,9:85,1	0,6:99,4	0,5:99,5	0:100
400 mg	30	270	15,9	18,5	99,6:0,4	17:83	0,4:99,6	0:100	0:100
400 mg	30	270	15,4	17,9	99,5:0,5	23,1:76,9	0,7:99,3	0,1:99,9	0:100
400 mg	30	270	16,2	19,0	99:1	21,5:78,5	0,6:99,4	0,2:99,8	0:100
300 mg	30	270	15,3	17,7	100:0	35:65	1:99	0,1:99,9	0:100

Tabelle 21: Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (+)-O/W3 an der Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm)

Die Aufarbeitung der Fraktion 1 als (-)-O/W3, der Fraktionen 3 bis 5 als (+)-O/W3 sowie der Übergangsfraction 2 erfolgte analog 4.3.2.1.

Die Gesamtausbeute aus den acht Läufen betrug 253 mg (-)-O/W3 der Reinheit 99,8 % *ee* und 1,834 g (+)-O/W3 der Reinheit 98,4 % *ee*, die mit Ether/HClg zu 257 mg bzw. 1,996 g (Schmelzpunkt 146 °C) der entsprechenden Hydrochloride umgesetzt wurden. Die spezifische Drehung α_D^{20} des (+)-O/W3-HCl in Methanol (4 mg/ml) betrug +7,5°.

4.3.2.3. Gewinnung von (-)-O/W13

Aus den aus der Synthese erhaltenen 2,37 g (-)-O/W13-HCl (83 % *ee*) wurden nach Aufarbeitung analog zur im Abschnitt 4.3.2.1. beschriebenen Methode 2,30 g Base erhalten, die in der mobilen Phase zu einer Stammlösung mit ca. 100 mg/ml gelöst wurden.

Startbedingungen waren die durch Errechnung über die empirischen Faktoren aus den analytischen Daten erhaltenen Parameter, die durch die Erfahrungen aus der Trennung von O/W3 erweitert wurden, wie es anhand der Gegenüberstellung der Endbedingungen der Trennungen von (-)-O/W3 und der Startbedingungen für die präparative Trennung von (-)-O/W13 ersichtlich ist.

	<u>analytisch</u>	<u>präparativ (-)-O/W3</u>	<u>präparativ (-)-O/W13</u>
Substanzauftrag:	300 µg	500 mg	100 mg
Flussrate:	1,5 ml/min	236 ml/min	250 ml/min
Säulentemperatur:	25 °C	30 °C	25 °C
Detektion:	220 nm	220 nm	220 nm

Unter diesen Bedingungen wurde eine erste Trennung durchgeführt und die Methode in den folgenden Läufen im Hinblick auf maximale Beladung bei minimaler Laufzeit und kleiner Übergangsfraction angepasst. Die Analytik der Fraktionen musste mit der analytischen AD-Säule durchgeführt werden, da die vorhandene analytische OD-Säule am Ende ihrer Lebenszeit keine befriedigenden Trennergebnisse mehr liefern konnte. Hierbei war die Elutionsumkehr der Enantiomere beim Säulenwechsel zu beachten. Die Angaben der Enantiomeren-verhältnisse der Fraktionen beziehen sich jeweils auf die Elutionsreihenfolge an der OD-Phase.

Auftrag	T [°C]	Fluß	t _R E1	t _R E2	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
100 mg	25	251	20,9	---	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100 mg	30	251	20,8	---	98,8:1,2	72,8:27,2	22,8:44,2	21:79	---
150 mg	35	260	19,7	---	97,6:2,4	89:11	57:43	39:61	23:77
150 mg	30	266	19,0	---	98,8:1,2	79:21	42:58	35:65	46:54
500 mg	30	270	15,2	---	96,5:3,5	80:20	54:46	53:47	43:57
500 mg	30	270	16,2	---	96:4	80:20	54:46	20:80	16:84
500 mg	30	270	15,4	---	95,5:4,5	79:21	49:51	24:76	---
500 mg	31	270	14,5	---	96,5:3,5	78:22	56:44	---	---

Tabelle 22: Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (-)-O/W13 an der Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm)

Die Fraktionen 1 und 2 wurden als (-)-O/W13 bei 360 mbar/40 °C einrotiert. Die Fraktionen 3 bis 5 (Übergang) wurden getrennt abdestilliert und die erhaltene nicht racemische Mischung für eine spätere Aufarbeitung zurückgestellt.

Die Gesamtausbeute aus den acht Läufen ergab 1,565 g (-)-O/W13 der Reinheit 87,2 % *ee*, die mit Ether/HClg zu 1,687 g Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 112 °C umgesetzt wurden. Die spezifische Drehung des Hydrochlorids in Methanol (1,1 mg/ml) betrug -33,4°.

4.3.2.4. Gewinnung von (+)-O/W13

Aus den aus der Synthese erhaltenen 2,124 g (+)-O/W13-HCl (79,5 % *ee*) wurden nach Aufarbeitung analog zur im Abschnitt 4.3.2.1. beschriebenen Methode 2,034 g Base erhalten, die in der mobilen Phase zu einer Stammlösung mit ca. 100 mg/ml gelöst wurden.

Da schon in den Läufen zur Trennung von (-)-O/W13 keine zwei aufgelösten Peaks detektiert werden konnten, wurde (+)-O/W13 durch gezieltes Schneiden des Hauptpeaks unter den gefundenen Trennbedingungen für (-)-O/W13 (4.3.2.3.) und Fraktionskontrolle an der AD-Phase aufgereinigt.

Auftrag	T [°C]	Fluß	t _R E1	t _R E2	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5
500 mg	30	270	---	16,4	45/55	15/85	5,4/94,6	1,75/98,25	7/93
500 mg	30	285	---	15,5	70,5/29,5	7,7/92,3	3/97	3,5/96,5	8/92
500 mg	35	285	---	15,4	26,5/73,5	7/93	5/95	9/91	10/90
500 mg	30	285	---	15,4	30/70	8/92	4,5/95,5	0,5/99,5	0,5/99,5

Tabelle 23: Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (+)-O/W13 an der Chiralcel[®] OD-Säule (5 x 50 cm)

Die Fraktionen 2 bis 5 wurden als (+)-O/W13 bei 360 mbar/40 °C einrotiert. Die Übergangsfraction 1 wurde getrennt abdestilliert und die erhaltene nicht racemische Mischung für eine spätere Aufarbeitung zurückgestellt.

In der Gesamtausbeute aus den vier Läufen wurden 1,556 g (+)-O/W13 der Reinheit 87 % *ee* erhalten, die mit Ether/HClg zu 1,679 g Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 111 °C umgesetzt wurden. Die spezifische Drehung des Hydrochlorids in Methanol (1,1 mg/ml) beträgt +33,3°.

4.4. Bestimmung der physikochemischen Parameter der O/W-Substanzen

4.4.1. Bestimmung der pK_s-Werte

Die Bestimmung der pK_s-Werte der synthetisierten Verbindungen erfolgte in Ahnlehnung an die Methode nach Albert und Serjeant [135] durch Titration der O/W-Hydrochloride mit 0,01-M NaOH unter Einsatz einer PC-gesteuerten Titrino[®]-Station (716 DMS Titrino und pH-Einstabmesskette pH 0 - 14, Metrohm AG, Herisau, CH; Software Metrodata TiNet 2.5). Dazu wurden $5 \cdot 10^{-4}$ molare Lösungen der Salze in CO₂-freiem Wasser hergestellt. Jeweils 30,0 ml Lösung wurden auf 25,0 °C temperiert und in 0,1 ml-Schritten mit der Maßlösung titriert. Der pH-Wert der Lösung wurde nach jeder Volumenzugabe gemessen (Wartezeit 20 s). Aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung wurde für jeden Meßpunkt zwischen Titrationsgrad 0,1 und 0,5 der pK_s-Wert der Verbindung berechnet. Die errechneten Werte wurden gemittelt. Für jede Verbindung wurden drei Titrationsdurchführungen durchgeführt. Zur Überprüfung der Methode wurde Fomocain-HCl als Standard unter den selben Bedingungen titriert. Der erhaltene pK_s-Wert stimmt mit den in der Literatur veröffentlichten Werten überein. [38, 99]

4.4.2. Bestimmung der Trübungs-pH-Werte

Die Trübungs-pH-Werte wurden unter standardisierten Bedingungen bestimmt [75, 95]. Dazu wurden $5 \cdot 10^{-4}$ molare Lösungen der Hydrochloride in 0,1-M KCl-Lösung hergestellt. Jeweils 25,0 ml Lösung wurden auf 25,0 °C temperiert und bis zur bleibenden Trübung mit 0,01-M NaOH titriert und anschließend mit 0,01-M HCl bis zum Aufklaren der Lösung zurücktitriert. Der Mittelwert aus den am Trübungs- und am Klarpunkt gemessene pH-Werten (Digital pH-Meter pH 525, WTW, Weilheim mit einer InLab[®] 410 Einstabmesskette, Mettler Toledo GmbH, Greifensee, CH) entspricht dem Trübungs-pH. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Ablesung wurde vor einem dunklen Hintergrund bei diffusem Licht gearbeitet. Da der Trübungs-pH-Wert einer Verbindung unter anderem auch von der eingesetzten Konzentration und der Ionenstärke der Lösung abhängt, wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit der Meßwerte zu gewährleisten, Fomocain-HCl unter den selben Bedingungen als Referenzsubstanz mitgeführt. Für jede Verbindung wurden drei Bestimmungen durchgeführt.

4.4.3. Berechnung der Wasserlöslichkeit der Basen

Sind von einer Verbindung der pK_s -Wert und der Trübungs-pH-Wert bekannt, kann die molare Wasserlöslichkeit der freien Base [B] nach Gleichung (2) näherungsweise berechnet werden [136].

$$[B] = \frac{S}{1 + 10^{pK_s - pH}} \quad (2)$$

S = Substratkonzentration

pH = Trübungs-pH-Wert bei der eingesetzten Konzentration [S]

4.4.4. Bestimmung von lgP und lgD

Der Partition Coefficient (P) als Ausdruck des Konzentrationsverhältnisses einer gelösten ungeladenen Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen (z.B. n-Octanol/Wasser) dient zur Abschätzung der Verteilung von Substanzen zwischen lipophilen und hydrophilen Kompartimenten im Körper. Im Falle von ionisierbaren Substanzen wie den basischen Fomocainderivaten bestimmen der pH-Wert der hydrophilen Phase und der pK_s -Wert der Verbindung den Ionisationsgrad und damit die Konzentration der freien zur Verteilung befähigten Base. Der daraus resultierende Distribution Coefficient (D) steht über Gleichung (3) mit P in folgendem Zusammenhang:

$$\lg D = \lg P - \lg(1 + 10^{pH - pK_s}) \quad (3)$$

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten erfolgte mit einer etablierten HPLC-Methode [97, 98] anhand der Vorgaben der OECD Guideline for testing of chemicals [96].

HPLC-System: Systemcontroller SCL10-Avp, Autoinjektor SIL-10A, UV-Detektor SPD-10A, 2 Pumpen LC-10A, PC-gestützte Steuerung und Auswertung mit der Software CLASS-VP 5.03 (alle Shimadzu, Duisburg)

stationäre Phase: LiChrospher[®] 100-RP18 (250-4, 5 μ m), mit Vorsäulenkartusche

Chromatographie: Flußrate 1,6 ml/min, Injektion 10 µl, Detektion UV 218 nm, mobile Phase Methanol/Puffer pH 7,4 (0,2745 g KH₂PO₄, 1,8 g Na₂HPO₄, 0,1 ml Diethylamin ad 1000 ml) 75/25

Kalibriert wurde das System mit Lokalanästhetika, deren lgP-Werte aus der Literatur [75, 99, 100] bekannt waren (Tabelle 24). Zur Totzeitbestimmung diente Thioharnstoff. Die Referenzsubstanzen sowie O/W1-16-HCl wurden in der mobilen Phase, die Thioharnstoff in der Konzentration von 100 µg/ml enthielt, zu 50-100 µg/ml gelöst und in die HPLC injiziert. Die aus der Auftragung der dekadischen Logarithmen der aus den Chromatogrammen der Referenzsubstanzen ermittelten Kapazitätsfaktoren k' gegen die lgP-Werte erhaltene Kalibriergerade der Funktion $\lg P = f(\lg k')$ zeigt eine gute Linearität (Abb. 39). Für jede Substanz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Verbindung	lgP
Procain-HCl	1,87
Prilocain-HCl	2,06
Articain-HCl	1,90
Lidocain-HCl	2,51
Tetracain-HCl	3,47
Fomocain-HCl	3,85

Tabelle 24: lgP-Werte der Verbindungen zur Kalibrierung

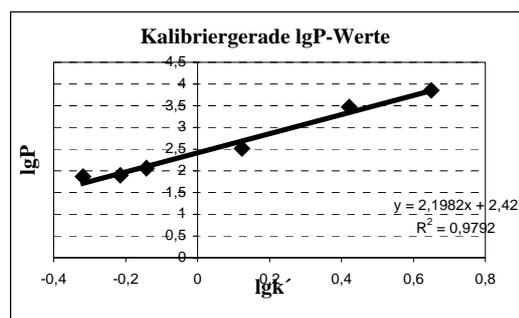


Abb. 39: Kalibriergerade zur lgP-Bestimmung der O/W-Verbindungen

4.5. Weitere Analytische Methoden

Massenspektrometrie

Die ES-Massenspektren der Verbindungen wurden mit einem Tripel-Quadrupol Massenspektrometer VGQuadro (Fisons Instruments, Mainz) am Hans-Knöll-Institut, Jena aufgenommen. Die Messungen im EI-Modus wurden im Institut für Anorganische und Analytische Chemie der FSU Jena an einem Finnigan™ SSQ 710 (Thermo Electron Corporation, USA) durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte im Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der FSU Jena an einem Avance™ 250- bzw. Avance™ 400-Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten).

DC und SC

Für alle DC-Analysen wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete DC-Alufolien (VWR, Darmstadt) verwendet. In der Säulenchromatographie kam ausschließlich Kieselgel 60 (0,06 - 0,2 mm, VWR, Darmstadt) zum Einsatz. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch frisch destilliert.

UV-Spektroskopie

Die Absorptionskoeffizienten der O/W-Verbindungen ergaben sich aus der Analyse ihrer UV-Spektren, die an einem Zweistrahl-photometer V-570 (Jasco, Groß-Umstadt) mit PC-Steuerung (Spectra Manager 1.53) aufgenommen wurden.

Polarimetrie

Die Bestimmung der optischen Aktivität der nichtracemischen Mischungen und der Enantiomere erfolgte an einem elektronischen 4-Filter Polarimeter Polartronic E (Schmidt + Haensch, Berlin).

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der Hydrochloride wurden mit einem Gerät der Typs Meltemp II (Laboratory Devices, USA) mit angeschlossenen Digitalthermometer Fluke 51KJ (Fluke, Moorestown, USA) bestimmt. Alle Schmelzpunktangaben sind unkorrigiert.

Refraktometrie

Die Brechungsindices der synthetisierten Flüssigkeiten wurden mit einem Abbé-Refraktrometer (Carl Zeiss, Jena) bestimmt.

GC und GC-MS

Die Durchführung der GC-Analysen erfolgte mit einem GC-Automaten GC-14A (Shimadzu, Duisburg) mit FI-Detektion an einer Kapillarsäule DB-5 (Länge 30 m, 0,25 mm ID, Film 0,25 μm) der Firma J & W Scientific (Folsom, USA). Die Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte unter isokratischen Bedingungen (Injektor 300°C, Säulentemperatur 100°C, FID 300°C, Trägergas Stickstoff, 0,5 bar) PC-gestützt über die Software CLASS LC5 (Shimadzu, Duisburg).

Für die GC-MS Messungen wurde ein G 1800C, GCD Plus System (Hewlett Packard, USA) mit EI-Detektion verwendet. Die Chromatographie (Trägergas Helium 0,9 bar) der Morpholinderivate an einer HP-5ms Kapillarsäule (Länge 30 m, 0,25 mm ID, Film 0,25 μm , J & W Scientific) wurde unter den oben angegebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Analyse von **2** und **3** wurden folgende Bedingungen angewendet: Injektor 250 °C, Detektor 280 °C, Temperaturprogramm mit 100 °C für 3 min, danach heizen auf 280 °C mit 10 °C/min, Endtemperatur halten für 19 min, Gesamtlaufzeit 40 min.

4.6. Biopharmazeutische und pharmakologische Untersuchungen

4.6.1. Bestimmung der Plasmaeiweißbindung von O/W3 und O/W13

Fomocain-HCl, O/W3- und O/W13-HCl wurden in Phosphatpuffer pH 7,4 (0,2745 g KH_2PO_4 , 1,8 g Na_2HPO_4 , 0,1 ml Diethylamin ad 1000 ml) in einer Konzentration gelöst, die der halben errechneten Basenlöslichkeit entsprach. 1,0 ml Stammlösung wurden zu 1,5 ml Humanplasma (DRK, Blutspendedienst Jena) in ein Centrisart[®]-I-Röhrchen (Sartorius, Göttingen) gegeben und zur Gleichgewichtseinstellung 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Filtereinheit (Schwimmer) aufgesetzt und zur vollständigen Benetzung der Membran weitere fünf Minuten stehengelassen. Danach wurde zunächst für 2 min bei 2300 U/min (1600 x g) und anschließend für 45 min bei 3600 U/min (2500 x g) in der zentrifugiert (Zentrifuge EBA 30, Hettich, Tuttlingen). Nach der Zentrifugation wurde das

Filtrat aus dem Schwimmer abpipettiert, wobei die Einheit noch zwei mal mit je 0,5 ml Puffer gespült wurde. Das Filtrat wurde mit verdünnter NaOH auf pH 10-11 alkalisiert und drei mal mit 2,0 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurden 5,0 ml Lösung abgenommen und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 250 µl n-Hexan aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 100 µl in die HPLC (Chiralpak[®] AD, 1,25 % Ethanol, Fluß 0,8 ml/min, 220 nm, 30 °C) injiziert. Der ungebundene Substanzanteil wurde über Kalibrierreihen der Verbindungen, das Enantiomerenverhältnis über das Verhältnis der Peakflächen in den Chromatogrammen bestimmt. Jede Bestimmung wurde doppelt durchgeführt und zu jeder Substanz zwei 100%-Werte mit Puffer anstatt Plasma mitgeführt.

4.6.2. Abbau von O/W3 und O/W13 durch Rinderleberhomogenate

100 g schlachtfrische Rinderleber vom Schlachthof Jena wurden kleingeschnitten, mit eiskaltem Tris/KCl-Puffer pH 7,4 gewaschen, im Verhältnis 1:2 (m/V) in Tris/KCl-Puffer suspendiert und für ca. eine Minute in einem Waring Blender (Waring Products Division, Connecticut, USA) bei 22000 U/min vorhomogenisiert. Nach Feinzerkleinerung der Gewebebruchstücke mittels eines UltraTurrax[®] T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) bei 14000 U/min für 30 Sekunden wurde das Homogenat 20 min bei 4 °C und 10000 g in einer Beckman Ultrazentrifuge (Optima[®]-LE mit Festwinkelrotor 70 Ti, Beckman Instruments, USA) zentrifugiert. Eine Hälfte des resultierenden 10000 g Überstandes wurde für die Untersuchungen zurückgestellt und bei -80 °C gelagert. Die andere Hälfte wurde dann bei 4 °C und 140000 g für 80 min zentrifugiert. Das dabei erhaltene Sediment wurde als Mikrosomenfraktion ausgewogen, im doppelten Volumen Tris/KCl-Puffer suspendiert und bei -80 °C gelagert. Auf einen Waschschrift zur Aufreinigung der Mikrosomen wurde verzichtet, da die verlängerte Zentrifugationszeit erfahrungsgemäß zu z.T. erheblichen Aktivitätsverlusten der Präparate führt.

Vor Beginn der Inkubationen wurden der 10000 g-Überstand und die Mikrosomenfraktion einer Proteingehaltsbestimmung nach Folin-Ciocalteu-Lowry [137] sowie einer photometrischen Enzymaktivitätsbestimmung unterworfen [138].

Für O/W3 und O/W13 wurde je eine Versuchsreihe mit dem 10000 g-Überstand und der Mikrosomensuspension durchgeführt. Dafür wurden Stammlösungen der Hydrochloride in einer Konzentration von 22,15 (O/W3) bzw. 22,06 mg/50 ml (O/W13) hergestellt. Je 0,5 ml dieser Lösung wurden in 10 Ansätzen mit jeweils 2,0 ml Cofaktorlösung [99] und 1,0 ml

Leberhomogenat versetzt und bei 38 °C im Schüttelwasserbad (Haake SWB 20, Haake Industrie, Berlin) unter Luftzutritt inkubiert. Zu den festgelegten Zeiten $t=10, 20, 30, 45, 60$ und 90 min wurde die Inkubation durch Zugabe von einer Spatelspitze festen Natriumcarbonats und Überführen der Probe unter Nachspülen mit 0,5 ml Phosphatpuffer auf eine mit 4,5 g Extrelut[®] NT gepackte Extraktionssäule gestoppt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min auf die Säule wurde mit 40 ml frisch destilliertem Ether eluiert. In gleicher Weise wurden zwei Blindwerte mit Puffer- statt Substratlösung und zwei t_0 -Werte mit durch Hitze- einwirkung inaktiviertem Leberpräparat hergestellt, um zum einen Störpeaks aus der organischen Matrix identifizieren zu können und zum anderen, um einen Startwert für eine semiquantitative Auswertung der Versuche zu erhalten. Die Eluate wurden auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1,0 ml n-Hexan aufgenommen. Die erhaltenen Lösungen wurden über HPLC (Chiralpak[®] AD, 1 % Ethanol, Fluß 0,8 ml/min, 220 nm, 25 °C, Injektion 20 µl) untersucht.

Aufgrund starker Schwankungen in der extrahierten Substanzmenge durch die ausgepögte Proteinbindung der Substanzen sowie Unregelmäßigkeiten in der Säulenpackung (Wiederfindungsraten zwischen 20 und 105 %) eignete sich die gewählte Methode nicht zur quantitativen Bestimmung der zum Zeitpunkt X noch vorhandenen Substratmenge und erlaubte somit keine Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit. Jedoch ließ sich über die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses erkennen, welches Enantiomer ggf. bevorzugt von den im Leberhomogenat enthaltenen Enzymen umgesetzt wurde.

4.6.3. Interaktionen mit CYP-Isoenzymen *in vitro*

Die Untersuchungen über Interaktionen der Verbindungen O/W1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 mit dem Cytochrom-P450-Enzymsystem wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU durchgeführt [126].

Zur Gewinnung der 9000 g Überstände und Mikrosomen wurden die Lebern männlicher, zwei Monate alter Ratten (Han:WIST, eigene Zucht) im Verhältnis 1:3 (m/V) in 0,1-M Phosphatpuffer pH 7,4 homogenisiert (Potter-Elvehjem-Homogenisator, B. Braun, Melsungen). Durch Zentrifugation des Homogenates bei 9000 x g für 20 min bei 4 °C in einer Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg) wurden die 9000 g Überstände gewonnen. Präzipitation mit Magnesiumchlorid nach Silman et al. [139] lieferte die Lebermikrosomen. Die Organpräparate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten so über einige Wochen

bei -80 °C gelagert werden. Vor Beginn der Experimente wurde der Proteingehalt der Präparate mit der nach Klinger und Müller [140] modifizierten Biuret-Methode bestimmt.

Vor Beginn der Modellversuche zu den Cytochrom-P450 vermittelten Monooxygenasereaktionen wurden Substratbindungsspektren der Substanzen in den Mikrosomensuspensionen nach der von Schenkman et al. [141] beschriebenen Methode aufgenommen. Der EROD-Test wurde mit den 9000 g Überständen nach Pohl und Fouts [142] mit Modifizierungen, der PROD-Test nach Lubet et al. [143] mit fluorimetrischer Bestimmung des Metaboliten Resorufin durchgeführt. Beim ECOD-Test wurde der Hauptmetabolit 7-Hydroxycumarin nach Aitio [144] fluorimetrisch bestimmt. Im EMND-Test wurde die Bildung des Reaktionsprodukts Formaldehyd nach der von Nash [145] beschriebenen Methode mit Modifikationen nach [146] photometrisch gemessen. Alle in den Modellreaktionen ermittelten Enzymaktivitäten wurden auf den zuvor ermittelten Proteingehalt der 9000 g Überstände bezogen.

4.6.4. Tierversuche

Die pharmakologischen Untersuchungen am Ganztier wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU durchgeführt. Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung der Tierenschutzkommission des Freistaates Thüringen vor.

Sämtliche Untersuchungen zur lokalanästhetischen Wirkung der Substanzen O/W 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 sowie ihrer Toxizität wurden an 2 Monate alten weiblichen Wistar-Ratten (Han:WIST, eigene Zucht) mit einem Gewicht zwischen 155 und 230 g durchgeführt. Jede Konzentration der Substanzen wurde an je 6 Versuchstieren gegen Fomocain als Standard getestet. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Fomocainderivate mussten die Substanzen in Tylose (0,5 % in Wasser m/V) oder Propylenglycol/Wasser (1:1) in den erforderlichen Konzentrationen gelöst werden. In Blindversuchen wurde gezeigt, dass die verwendeten Lösungsmittel in den eingesetzten Mengen keine lokalanästhetische Eigenwirkung haben und untoxisch sind. Zu den Untersuchungen der Wirkung der Enantiomere von O/W3 und 13 wurde das jeweilige Lösungsmittel des entsprechenden Racemates verwendet.

Auf die Dauer der Oberflächenanästhesie gibt das Ausbleiben des Lidschlußreflexes nach Reizung der Cornea am anästhesierten Auge Aufschluss [128]. Dazu wurden die Tiere in eine flache Ethernarkose versetzt und am linken Auge 0,05 ml der Prüflösung appliziert. Nach einminütigem Einwirken wurde das Auge mit 1,0 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit einer Parodontalsonde alle zwei Minuten der Lidschlußreflex geprüft. Als Ende der

Anästhesie galt ein mindestens dreimaliges Auslösen des Reflexes bei zehnmaliger Reizung innerhalb von vier Sekunden.

Am Nervus ischiadicus wurden die Leitungsanästhesie und Paresedauer bestimmt. Die Ermittlung beider Parameter ist notwendig, da es auch ohne anästhesierende Wirkung am Nerven zu längeren Lähmungserscheinungen kommen kann. Dazu wurden 0,05 ml Prüflösung/100 g KG exakt an den Nervus ischiadicus am linken Hinterbein des Versuchstieres appliziert. Als Dauer der Leitungsanästhesie galt der Zeitraum bis zum Wiederauftreten des Wegziehreflexes bei Reizung der Pfote mit einer stumpfen Nadel alle 2 min. Die Parese drückte sich durch hinkenden Gang der Tiere sowie durch enge Zehenstellung der Pfote und mangelnden Halt an den Gitterstäben beim Drehen des Käfigs aus. Fand die Pfote wieder Halt an den Gitterstäben, galt die Parese als beendet [129].

Die approximative LD_{50} wurde nach Miller und Tainter [130] bestimmt. Nach orientierenden Vorversuchen an jeweils einem Tier wurden drei bis fünf Dosierungen ($n = 6$) intraperitoneal appliziert, die zu Letalitätsraten zwischen 20 und 80 % führten. Die Zeiten des Wirkungseintritts und des Todes wurden festgestellt, sowie Verhaltensänderungen der Tiere protokolliert. Die LD_{50} wurde aus den Überlebensraten über eine Regressionsgerade ermittelt.

5. Anhang**5.1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
äq.	äquatorial
Ar.	Aryl
AV	atrioventrikulär
ax.	Axial
BTX	Batrachotoxin
COSY	Correlated Spectroscopy
CSP	chirale stationäre Phase
CYP	Cytochrom P450
d	Dublett
DC, dc	Dünnschichtchromatographie, dünnschichtchromatographisch
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
E1	Enantiomer 1
E2	Enantiomer 2
EC	effektive Konzentration
ECOD	Ethoxycumarin-O-Deethylierung
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstossionisation
EMND	Ethylmorphin-N-Demethylierung
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
ESI	Elektrosprayionisation
FI	Flammenionisation
GC, gc	Gaschromatographie, gaschromatographisch
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HOAc	Essigsäure
HPLC, hplc	Hochleistungsflüssigchromatographie, mittels HPLC
HSQCDEPT	Heteronuclear Single Quantum Coherence-DEPT
ID	innerer Durchmesser
i. p.	intraperitoneal
k. A.	keine Angabe(n)
k. E.	kein Effekt
KG	Körpergewicht

LA	Lokalanästhetikum, -a
LD₅₀	Letale Dosis 50
LPO	Lipidperoxidation
m	Multipllett
MeOH	Methanol
M_r	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PEB	Plasmaeiweißbindung
PROD	Pentoxyresorufin-O-Depentylierung
rac, nrac	racemisch, nicht racemisch
rel. Int.	relative Intensität
RP	Umkehrphase
RV	Rotationsverdampfer
s	Singulett
SC, sc	Säulenchromatographie, säulenchromatographisch
t	Triplet
TBME	tert-Butylmethylether
TCA	Tricyclische Antidepressiva
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
TOMACl	Trioctylmethylammoniumchlorid
t_r	Retentionszeit
TTX	Tetrodotoxin
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentralnervensystem

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Auswahl von Ester-, Amid- und Etherlokanästhetika, die dem Löff-grenschemata entsprechen	3
Abb. 2	Schematische Topologie der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Na ⁺ -Kanals mit den 4 homologen Domänen D1 bis D4 und den als Zylindern dargestellten transmembranären Segmenten S1 bis S6	4

Abb. 3	Schematische Darstellung der Zustände eines Na ⁺ -Kanals	6
Abb. 4	Marktneueinführungen von chiralen Arzneistoffen der Jahre 1993 bis 2005 in Deutschland	8
Abb. 5	Potentielle Wechselwirkungen chiraler Arzneistoffe mit körpereigenen Strukturen, die sowohl zu Unterschieden in der Wirkungsqualität als auch der Wirkstärke der Enantiomere führen können	9
Abb. 6	Die grundlegenden Ansätze zur Gewinnung reiner Enantiomere.....	13
Abb. 7	Syntheschema zur Darstellung von Fomocain und seinen chiralen Derivaten	15
Abb. 8	Syntheschema zur Darstellung von 2-Alkylmorpholin	16
Abb. 9	Syntheschema zur Darstellung von 3-Alkylmorpholin	17
Abb. 10	EI-Massenspektrum von O/W7 (M _r 367,5)	21
Abb. 11	EI-Massenspektrum von O/W13 (M _r 353,5)	22
Abb. 12	Zählweise der Atome in O/W3 zur NMR-Auswertung	23
Abb. 13	NMR-Spektren von O/W 3 I	24
Abb. 14	NMR-Spektren von O/W3 II	26
Abb. 15	Zählweise der Atome in O/W13 zur NMR-Auswertung	26
Abb. 16	NMR-Spektren von O/W13 I	27
Abb. 17	NMR-Spektren von O/W13 II	29
Abb. 18	Zählweise der Atome in O/W12 zur NMR-Auswertung	29
Abb. 19	NMR-Spektren von O/W12 I	30
Abb. 20	NMR-Spektren von O/W12 II	31
Abb. 21	Strukturen einiger ausgewählter CSP	37
Abb. 22	Interaktionsmöglichkeiten eines chiralen Fomocainderivates mit einer Cellulose-tris(phenylcarbamit)-Einheit am Beispiel von O/W1 und eines Alkohols als Bestandteil der mobilen Phase	38
Abb. 23	Strukturen der Polymere zur Herstellung der CSP Chiralcel [®] OD sowie Chiralpak [®] AD und AS	39
Abb. 24	Strategie zur Optimierung der Chromatographieparameter zur Racemat-trennung der O/W- und der NBM-Verbindungen an den CSP Chiralcel [®] OD sowie Chiralpak [®] AD und AS	41
Abb. 25	Trennleistung für die 2-substituierten chiralen Fomocainderivate an der Chiralpak [®] AS-Phase in Abhängigkeit von der Substituentengröße	44
Abb. 26	Trennleistung für die 2-substituierten chiralen Fomocainderivate an der Chiralpak [®] AD-Phase in Abhängigkeit von der Substituentengröße	46
Abb. 27	Phasendiagramme zur Beschreibung des Löslichkeitsverhaltens diastereomerer Salze in einer ternären Mischung	49
Abb. 28	Löslichkeitsisothermen diastereomerer Salze in einem Vierkomponen-tensystem	50

Abb. 29	Originalchromatogramme zu den einzelnen Kristallisationsschritten bei der präparativen Racematspaltung von 9 und den sich anschließenden Synthesen der <i>nrac</i> -O/W3-Chargen	53
Abb. 30	Originalchromatogramme zu den einzelnen Kristallisationsschritten bei der präparativen Racematspaltung von 29 und den sich anschließenden Synthesen der <i>nrac</i> -O/W13-Chargen	54
Abb. 31	Originalchromatogramme aus der analytischen Überprüfung der Fraktionen eines Laufes zur chromatographischen Reinigung von 500 mg (-)-O/W3 (84 % <i>ee</i>); chromatographische Reinheiten der Endprodukte aus insgesamt 7 Läufen mit (-)-O/W3 (84 % <i>ee</i>) und 8 Läufen mit (+)-O/W3 (74 % <i>ee</i>)	56
Abb. 32	Enantiomerenverhältnisse (ausgedrückt als Verhältnisse der Peakflächen (+) : (-)) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit beim Abbau von <i>rac</i> -O/W3 und <i>rac</i> -O/W13 durch 10000 g Überstände	59
Abb. 33	Ergebnisse des EROD- und des ECOD-Tests für die racemischen chiralen Fomocainderivate	61
Abb. 34	Ergebnisse des H ₂ O ₂ - und des LPO-Tests für die racemischen chiralen Fomocainderivate	62
Abb. 35	Ergebnisse des ECOD-, PROD-, LPO- und H ₂ O ₂ -Tests für die Enantiomere von O/W3 im Vergleich zum Racemat	64
Abb. 36	Ergebnisse des ECOD-, PROD-, LPO- und H ₂ O ₂ -Tests für die Enantiomere von O/W13 im Vergleich zum Racemat	65
Abb. 37	Zusammenfassung der Ergebnisse der pharmakologischen und toxikologischen Versuche mit den Racematen der chiralen Fomocainderivate an Ratten	68
Abb. 38	Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur Oberflächen- und Leitungsanästhesie mit den Enantiomeren von O/W3 und O/W13	72
Abb. 39	Kalibriergerade zur IgP-Bestimmung der O/W-Verbindungen	119

5.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Aufstellung über bereits in der Literatur beschriebene einfach am Kohlenstoff alkylsubstituierte Morpholine	16
Tabelle 2	Ausbeuten aus der Synthese der dargestellten <i>rac</i> -C-Alkylmorpholine ...	18
Tabelle 3	Strukturen, Ausbeuten (letzte Synthesestufe) und Gesamtausbeuten (berechnet auf das eingesetzte (3-Chlorpropyl)benzen)) der chiralen Fomocainderivate	19
Tabelle 4	Strukturen, Ausbeuten (letzte Synthesestufe) und Gesamtausbeuten (berechnet auf das eingesetzte (3-Chlorpropyl)-benzen)) der chiralen Oe7000-Derivate	20
Tabelle 5	spez. Absorptionen $A_{1cm}^{1\%}$ und molare Absorptionskoeffizienten ϵ der O/W-Verbindungen	32

Tabelle 6	Physikochemische Parameter der O/W-Verbindungen	35
Tabelle 7	Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralcel [®] OD-Phase	43
Tabelle 8	Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralpak [®] AS-Phase	45
Tabelle 9	Optimierte Chromatographieparameter für die O/W- und NBM-Verbindungen an der Chiralpak [®] AD-Phase	47
Tabelle 10	In den Vorversuchen zur Racematspaltung durch Bildung diastereomerer Salze eingesetzte Trennreagenzien	51
Tabelle 11	Zusammenfassung der Trennerfolge bei der Racematspaltung der C-Alkylmorpholine nach der „Dutch Resolution“	52
Tabelle 12	Zusammenfassung der Ausbeuten aus der chromatographischen Reinigung der Enantiomere von O/W3 und O/W13	57
Tabelle 13	Modellreaktionen zur Bestimmung des Interaktionspotentials der chiralen Fomocainderivate mit dem CYP-Enzymsystem	60
Tabelle 14	Zusammenfassung der Daten aus den <i>in-vitro</i> Versuchen mit den chiralen Fomocainderivaten zur Interaktion mit dem CYP-Enzymsystem	63
Tabelle 15	Zusammenfassung der Daten aus den <i>in-vitro</i> Versuchen mit den Enantiomeren von O/W3 und O/W13 zur Interaktion mit dem CYP-Enzymsystem	66
Tabelle 16	Werte für die LD ₅₀ (Ratte) der Hydrochloride der racemischen chiralen Fomocainderivate in Tylose	69
Tabelle 17	Vergleich der Effekte in der Leitungsanästhesie durch Lösungen von O/W7, O/W13 und O/W15 gleicher Konzentration in Tylose (0,5 %) (T) oder Propylenglycol (50 %) (P)	71
Tabelle 18	Interne Bezeichnungen der Benzoylamide der C-Alkylmorpholine	105
Tabelle 19	HPLC-Systeme zur Analytik der NBM-Verbindungen	107
Tabelle 20	Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (-)-O/W3 an der Chiralcel [®] OD-Säule	113
Tabelle 21	Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (+)-O/W3 an der Chiralcel [®] OD-Säule	114
Tabelle 22	Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (-)-O/W13 an der Chiralcel [®] OD-Säule	115
Tabelle 23	Zusammenfassung der Läufe zur präparativen Aufreinigung von (+)-O/W13 an der Chiralcel [®] OD-Säule	116
Tabelle 24	IgP-Werte der Verbindungen zur Kalibrierung	119

5.4. Literaturverzeichnis

- [1] Biscopig, J.; Bachmann-Menenga, M. B.; AINS; **35**; 285 - 92 (2000)
- [2] Loza-Balsa, G. in: Sociedad Geografica de la Paz (Hrsg.); Monografía sobre la coca; S. IX-X, XIV, XV, 3; La Paz (1992)
- [3] Van Dyke, C.; Byck, R.; Sci. Am.; **246**; 128 - 41 (1982)
- [4] Bühler, A.; Ciba Z.; **8**; 3338 - 51 (1944)
- [5] Calatayud, J.; Gonzalez, A.; Anesthesiology; **98**; 1503 - 8 (2003)
- [6] Niemann, A.; Arch. Pharm.; **153**; 129 - 55 (1860)
- [7] Lossen, W.; Ann. Chem. Pharm.; **133**; 351 - 71 (1865)
- [8] Willstätter, R.; Ber. Dtsch. Chem. Ges.; **31**; 1534 - 53 (1898)
- [9] Willstätter, R.; J. Liebigs Ann. Chem.; **434**; 111 - 39 (1923)
- [10] Moreno y Maïs, T. in: Louis Leclerc (Hrsg.); Recherchers chimiques et physiologiques sur lérythroxyllum coca du Perou at la cocaïne; S. 76 - 79 (Paris)
- [11] Anrep, W.; Arch. Ges. Physiol.; **21**; 38 - 77 (1880)
- [12] Koller, K.; Wien. Med. Wochenschr.; **34**; 1276 - 78 und 1309 - 11 (1884)
- [13] Hall, R. J.; N. Y. Med. J.; **40**; 643 - 44 (1884)
- [14] McAuley, J. E.; Br. Dent. J.; **121**; 139 - 42 (1966)
- [15] Pernice, L.; Dtsch. Med. Wochenschr.; **16**; 287 - 89 (1890)
- [16] Anonymus; Br. Med. J.; **1**; 971 - 72 (1979)
- [17] Schleich, C. L.; Verh. Dtsch. Ges. Chir.; **21**; 121 - 27 (1892)
- [18] Reclus, P. in: Masson, G. (Hrsg.); La cocaïne en chirurgie; S. 69 - 91 und 172 - 75; Gaultier Villars et Fils; Paris (1895)
- [19] Fink, B. R.; Anesthesiology; **63**; 77 - 83 (1985)
- [20] Olch, P. D.; William, S.; Anesthesiology; **42**; 479 - 86 (1975)
- [21] Matas, R.; Am. J. Surg.; **25**; 362 - 79 (1934)
- [22] Bieter, R. N.; Am. J. Surg.; **34**; 500 - 10 (1936)
- [23] Farbwerke vorm. Meister Lucius und Brüning in Höchst a. M.; Patentschrift Nr. 179627 (Klasse 12q, Gruppe 6); 27.11.1904
- [24] Braun, H.; Dtsch. Med. Wochenschr.; **31**; 1667 - 71 (1905)
- [25] Guptill, A. E.; Dent. Cosmos; **62**; 1460 - 61 (1920)
- [26] Klauder, J. V.; Dent. Cosmos; **64**; 305 - 9 (1922)
- [27] Löfgren, N.; Lundquist, B.; Svensk. Kem. Tidskr.; **58**; 206 - 17 (1946)
- [28] Oelschläger, H.; Habilitationsschrift; Universität Hamburg (1957)
- [29] Oei, H. T.; Dissertation; Universität Frankfurt/M. (1969)
- [30] Büchi, J.; Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel; Birkhäuser; Basel (1963)

-
-
- [31] Scholz, A.; *Brit. J. Anaesth.*; **89** (1); 52 - 61 (2002)
- [32] Catterall, W. A.; Golding, A. L.; Waxman, S. G.; *Pharmacol. Rev.*; **55**; 575 - 78 (2003)
- [33] Yu, F. H. et al.; *J. Neurosci.*; **23**; 7577 - 85 (2003)
- [34] Nau, C.; Wang, G. K.; *J. Membrane Biol.*; **201**; 1 - 8 (2004)
- [35] Hille, B.: *Ionic Channels of Excitable Membranes*; Sinauer Ass. Inc.; Sunderland, MA (2001)
- [36] Bennet, P. B. et al.; *Circ. Res.*; **77**; 584 - 92 (1995)
- [37] Son, S. L.; Wong, K.; Strichartz, G.; *Cell. Mol. Neurobiol.*; **24** (2); 565 - 77 (2004)
- [38] Thoma, K.; Kasper, F. R.; *Acta Pharm. Helv.*; **63** (6); 155 - 59 (1988)
- [39] Komai, H.; McDowell, T. S.; *Anesthesiology*; **94**; 1089 - 95 (2001)
- [40] Olschewski, A. et al.; *Anesthesiology*; **88**; 172 - 79 (1998)
- [41] Zamponi, G. W. et al.; *J. Neurosci.*; **16** (8); 2430 - 32 (1996)
- [42] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M.: *Arzneimittelwirkungen*, 8. Aufl.; WVG; Stuttgart (2001)
- [43] Chen, Y. W. et al.; *Pain*; **112**; 106 - 12 (2004)
- [44] Carter, M. D.; Stephenson, V. C.; Weaver, D. F.; *J. Mol. Struct. (Theochem)*; **638**; 57 - 62 (2003)
- [45] Patočka, J.; Dvořák, A.; *J. Appl. Biomed.*; **2**; 95 - 100 (2004)
- [46] Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J.; *Nature Rev. Drug Disc.*; **1**; 753 - 68 (2002)
- [47] Stinson, S. C.; *CENEAR*; **79** (40); 79 - 97 (2001)
- [48] Roth, H. J.; *DAZ*; **144** (20); 57 - 64 (2004)
- [49] Ariens, E. J.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*; **26**; 663 - 68 (1984)
- [50] Nau, C.; Strichartz, G.; *Anesthesiology*; **97**; 497 - 502 (2002)
- [51] Hindmarch, I.; *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*; **16**; 101 - 4 (2001)
- [52] Mehvar, R.; Brocks, D. R.; Vakily, M.; *Clin. Pharmacokinet.*; **41** (8); 533 - 58 (2002)
- [53] Hirota, K. et al.; *Anesthesiology*; **90**; 174 - 82 (1999)
- [54] Leffingwell, J. C.; <http://preprint.chemweb.com/medichem/0305001>
- [55] Eriksson, T.; Brörkman, S.; Höglund, P.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*; **57**; 365 - 76 (2001)
- [56] Siluveru, M.; Stewart, J. T.; *Anal. Lett.*; **30**; 1167 - 78 (1997)
- [57] Wunsch, B.; *Pharm. Ztg.*; **150** (30); 16 - 23 (2005)
- [58] Albright, G. A.; *Anesthesiology*; **51**; 285 - 87 (1979)
- [59] Lee-Son, S. et al.; *Anesthesiology*; **77** (2); 324 - 35 (1992)
- [60] Vladimirov, M. et al.; *Anesthesiology*; **93** (3); 744 - 53 (2000)
- [61] Graf, B. M.; Martin, E. et al.; *Anesthesiology*; **86** (2); 410 - 19 (1997)
- [62] Graf, B. M.; Abraham, I. et al.; *Anesthesiology*; **96**; 1427 - 34 (2002)
- [63] Joseph, A. et al.; *Anesthesiology*; **102**; 977 - 84 (2005)

- [64] Bräu, M. E. et al.; *Anesth. Analg.*; **91**; 1499 - 1505 (2000)
- [65] Burmester, M. D. et al.; *Anesth. Analg.*; **100**; 707 - 12 (2005)
- [66] Cox, C. R.; Faccenda, K. A.; *Br. J. Anaesth.*; **80**; 289 - 93 (1998)
- [67] Huang, Y. F.; Pryor, M. E.; Veering, B. T.; *Anesth. Analg.*; **86**; 797 - 804 (1998)
- [68] Zink, W.; Graf, B. M.; *Drug Safety*; **27** (14); 1093 - 1114 (2004)
- [69] Van Eikeren, P. in: Ahuja, S. (Hrsg.): *Chiral Separations, Applications and Technology*; Am. Chem. Soc. (1997), S. 18
- [70] Francotte, E. R. in: Ahuja, S. (Hrsg.): *Chiral Separations, Applications and Technology*; Am. Chem. Soc. (1997), S. 271 - 301
- [71] Subramanian, G. (Hrsg.): *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*; VCH, Weinheim, New York (1994)
- [72] Brice, L. J.; Pirkle, W. H. in: Ahuja, S. (Hrsg.): *Chiral Separations, Applications and Technology*; Am. Chem. Soc. (1997), S. 309 - 34
- [73] Okamoto, Y.; Yashima, E.; *Angew. Chem.*; **110**; 1073 - 95 (1998)
- [74] Oelschläger, H.; *Pharm. unserer Zeit*; **29**; 358 (2000)
- [75] Glassl, P.; *Dissertation*; Universität Frankfurt/M. (1995)
- [76] Oelschläger, H. et al.; *Pharmazie*; **56** (8); 620 - 25 (2001)
- [77] Hädrich, I.; *Dissertation*; Universität Frankfurt/M. (1991)
- [78] Kobayashi, Y. et al.; *J. Org. Chem.*; **63**; 7505 - 15 (1998)
- [79] Knorr; *Ann. Chem.*; **301**; 1 (1889)
- [80] Médard; *Bull. Soc. Chim.*; **3** (5); 1338 (1936)
- [81] Krasuskii; *J. Gen. Chem. (USSR)*; **6**; 460 (1936)
- [82] Cottle, D. L. et al.; *J. Org. Chem.*; **11**; 288 - 91 (1946)
- [83] Sytschewa, T. P.; Berlin; A. Y.; *Zh. Obshch. Khim. (engl. Translation)*; **20**; 677 - 84 (1950)
- [84] Gurbanow; P. A. et al.; *Doklad. Nauk Az. SSR*; **42** (4); 24 - 28 (1986)
- [85] Bettoni, G. et al.; *Tetrahedron*; **36**; 409 - 15 (1980)
- [86] Vargha et al. *Biochem. Pharmacol.*; **11**; 639 (1962)
- [87] Cerbai, G. et al.; *Boll. Chim. Farm.*; **106**; 837 - 54 (1967)
- [88] Fleck, C. et al.; *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*; **53** (3); 221 (2003)
- [89] Booth, H.; Gidley, G. C.; *Tetrahedron*; **21**; 3429 (1965)
- [90] Booth, H.; Little, J. H.; *Tetrahedron*; **23**; 291 (1967)
- [91] Friebolin, H.: *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 2. Aufl.; VCH; Weinheim, New York; (1992)
- [92] Danneels, D.; Antemis, M.; *Tetrahedron Lett.*; **9**; 687 (1975)
- [93] Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, T.; Simon, W.: *Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York (1975)

-
- [94] Wehr, H.; Koelzer, P.; *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*; **8**; 90 (1958)
- [95] Büchi, J.; Perlia, X.; Studach, S. P.; *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*; **17**; 1012 (1967)
- [96] EOCED; Guideline for testing of chemicals; **117** (30.03.1989)
- [97] Mirrlees, M. S. et al.; *J. Med. Chem.*; **19**; 615 (1976)
- [98] McCall, J. M.; *J. Med. Chem.*; **18**; 59 (1975)
- [99] Wennek-Klose, J.; Dissertation; FSU Jena (2005)
- [100] Burgot, G.; Burgot, J.-L.; *Chem. Pharm. Bull.*; **42** (8); 1553 - 55 (1994)
- [101] Wulff, G.; *Angew. Chem.*; **107**; 1985 - 79 (1995)
- [102] Kriz, D.; Ramström, O.; Mosbach, K.; *Anal. Chem.*; **69**; 345A - 49A (1997)
- [103] <http://www.chiral.fr/database/download.html>
- [104] Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.; *J. Chromatogr.*; **363**; 173 - 86 (1986)
- [105] Vogt, U.; Zugenmaier, P.; *Makromol. Chem. Rapid Commun.*; **4**; 759 - 65 (1983)
- [106] Yashima, E. et al.; *Enantiomer*; **2**; 225 - 40 (1997)
- [107] Yashima, E.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*; **118**; 4036 - 48 (1996)
- [108] Oelschläger, H.; Wange, J.; Letsch, J.; Seeling, A.; *Pharmazie*; **58** (2); 95 - 98 (2002)
- [109] Oelschläger, H.; Rothley, P.; Klinger, W. et al.; *Exp. Toxic. Pathol.*; **50**; 323 (1998)
- [110] Wange, J.; Oelschläger, H.; *Arch. Pharm. Med. Chem.*; **334** (Suppl. 2); 51 (2001)
- [111] Seeling, A.; Habilitationsschrift; FSU Jena (2005)
- [112] <http://www.daicel.co.jp/chiral/e/product/instruction/od.html>
- [113] Kirkland, K. M.; *J. Chromatogr. A*; **718**; 9 - 26 (1995)
- [114] Pasteur, L.; *Ann. Chim. Phys.*; **24**; 442 - 59 (1848)
- [115] Van der Haest, A. D.; Wynberg, H.; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*; **111**; 111 - 18 (1992)
- [116] Gould, R. O.; Walkingshaw, M. D.; *J. Am. Chem. Soc.*; **106**; 7840 - 42 (1984)
- [117] Kinbara, K.; *Synlett*; **5**; 732 - 43 (2005)
- [118] Fogassi, E. et al.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*; **2**; 1385 - 92 (1988)
- [119] Collet, A.; *Angew. Chem.*; **110** (23); 3429 - 31 (1998)
- [120] Vries, T. et al.; *Angew. Chem.*; **110** (17); 2491 - 96 (1998)
- [121] Broxterman, Q. et al.; *Chimica Oggi*; **16**; 34 - 37 (1998)
- [122] Nieuwenhuijzen, J. W. et al.; *Angew. Chem.*; **114** (22); 4457 - 62 (2002)
- [123] Dalmolen, J. et al.; *Chem. Eur. J.*; **11**; 5619 - 24 (2005)
- [124] Ladu, B. N.; Mandel, H. G.; Way E. L.: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*; Williams and Wilkins; Baltimore (1971)
- [125] http://www.merckeurolab.de/app/catalog/Catalog?parent_class_id=4&parent_class_cd=64980
- [126] Lupp, A. et al.; *Arneim.-Forsch./Drug Res.*; im Druck (01/2006)

-
-
- [127] Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Roth, H. J.: Medizinische Chemie, DAV; Stuttgart (2005)
- [128] Sollman, T.; J. Pharmacol. Exp. Therap.; **11**; 17 (1918)
- [129] Herr, F.; Nyin, M.; Pataky, G.; Arch. Exp. Path. Pharmacol.; **217**; 207 (1953)
- [130] Miller, L. C.; Tainter, M. L.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; **57**; 261 (1944)
- [131] Loy, S.; Dissertation; FSU Jena (2003)
- [132] Oelschläger, H.; Arzneim.-Forsch.; **9**; 313 (1959)
- [133] Avetyan, M. G. et al.; Akad. Nauk Arm. SSR; **27**; 31 - 34 (1974)
- [134] Rabe, J. Liebigs Ann. Chem.; **492**; 265 - 66 (1932)
- [135] Albert, A.; Sergeant, E. P.: The Determination of Ionisation Constants, 3rd Ed.; Chapman and Hall; London, New York (1984)
- [136] Solvia, M.; Arznm.-Forsch.; **13**; 517 (1963)
- [137] Lowry, O.H., et al.; J. Biol. Chem.; **193**; 265-275 (1951)
- [138] Omura, T.; Sato, R.; J. Biol. Chem.; **239**; 2379-2385 (1964)
- [139] Blanda, M. et al.; Acad. Emerg. Med.; **8**; 337 (2001)
- [140] Silman, N.; Artman, M.; Engelberg, H.; Biophys. Acta; **103**; 231 (1965)
- [141] Klinger, W.; Müller, D.; Z. Versuchstierk.; **16**; 146 (1974)
- [142] Schenkman, J. B. et al.; Drug Metab. Dispos.; **1**; 111 (1973)
- [143] Pohl, R. J.; Fouts, J. R.; Anal. Biochem.; **107**; 50 (1980)
- [144] Lubet, R. A.; Arch. Biochem. Biophys.; **238**; 43 (1985)
- [145] Aito, A.; Anal. Biochem.; **85**; 488 (1978)
- [146] Nash. T.; Biochem. J.; **55**; 416 (1953)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johannes Wange
geboren am: 03.01. 1975 in Jena
Familienstand: ledig

Schul- und Ausbildungsdaten

- Schule:
- September 1981 bis Juli 1983 POS „Erich Weinert“, Jena
 - September 1983 bis Juni 1993 POS „Adolf Reichwein“ (später 1. Staatliches Gymnasium), Jena; Schulabschluss Abitur
- Zivildienst:
- September 1993 bis Oktober 1994 Evangelische Akademie Arnoldshain, Schmitten (Taunus)
- Studium:
- Oktober 1994 bis September 1996 Grundstudium Pharmazie Humboldt-Universität, Berlin; Abschluss 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsprüfung
 - September 1996 bis November 1998 Hauptstudium Pharmazie FSU Jena; Abschluss 2. Abschnitt der Pharmazeutische Staatsprüfung
- Praktikum:
- Dezember 1998 bis Mai 1999 Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der FSU Jena
 - Juni 1999 bis Dezember 1999 Stadtapotheke Rudolstadt
 - Approbation als Apotheker am 11. Januar 2000 nach bestandenem 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Staatsprüfung

Berufliche Tätigkeit

- seit Januar 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der FSU Jena

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena bekannt ist,
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben habe,
- ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe noch Dritten unmittelbare oder mittelbare geldwerte Leistungen für Arbeiten erbracht habe, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen,
- ich die vorliegende Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich die vorliegende Dissertation oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung oder eine andere Arbeit nicht als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht habe,
- mir außer den im folgenden genannten Personen niemand sonst Unterstützung bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts Unterstützung gewährt hat: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. Oelschläger, PD Dr. med. A. Lupp, Dr. phil. nat. A. Seeling, Dr. rer. nat. W. Günther, Apotheker T. Dahse und Dipl.-Biol. J. Birkenbeil.

Jena, den

Johannes Wange