

2412. H. J. Roth und R. Brandes

Zur Konstitution des Reverins®*)

5. Mitt.: Acetolyse von Mannichbasen

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Hochschule Braunschweig

(Eingegangen am 17. Juli 1964)

Bei der Acetolyse von Tetracyclin und Reverin® mit Eisessig/NaOAc wird das gleiche Reaktionsprodukt erhalten. Bei der Einwirkung von Triphenylbor/Äthanol auf Reverin® entsteht unter Abspaltung der Pyrrolidinomethylgruppe ein Bor-chelat, das mit der aus Tetracyclin und Triphenylbor/Äthanol erhaltenen Verbindung identisch ist. Beide Reaktionen sind nur möglich, wenn im Reverin® die N-Mannichbase der Konstitution IV vorliegt.

Die Absicht, durch chemische Abwandlung des Tetracyclins Substanzen mit besserer Wasserlöslichkeit bei gleicher Wirksamkeit zu erhalten, wurde 1956 durch die Aminomethylierung verwirklicht¹⁾. Wegen seiner besonders günstigen Eigenschaften wählte man das Pyrrolidinomethyl-tetracyclin aus einer Reihe ähnlicher Mannichbasen aus und brachte es unter der Bezeichnung Reverin® in den Handel.

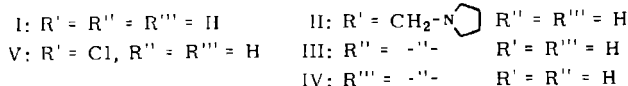
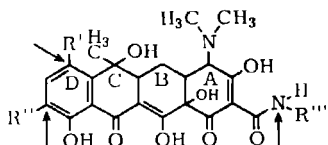
Betrachtet man die Konstitutionsformel des Tetracyclins (I), die sowohl die Partialstruktur eines Phenols als auch die eines Säureamids enthält, so kommen für eine Aminomethylierung (Mannichreaktion) die drei mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen in Frage. Theoretisch wären demnach für das Pyrrolidinomethyltetracyclin die Konstitutionen II, III und IV möglich. Da bei der Aminomethylierung von Phenolen im allgemeinen die o-Stellung zum phenolischen Hydroxyl gegenüber der p-Stellung für den Eintritt der Aminomethylgruppe begünstigt ist und sich das 7-Chlortetracyclin (V) ebenfalls leicht aminomethylieren läßt, schloß man die Konstitution II für das Reverin® aus und formulierte III¹⁾. Später ließ man die Stellung der Pyrrolidinomethylgruppe offen²⁾. Heute neigt man im allgemeinen zur Formulierung der Konstitution IV, d. h., man nimmt an, daß im Reverin® eine N-Mannichbase vorliegt³⁾.

*) Herrn Professor Dr. E. Bamann ergebenst zum 65. Geburtstag gewidmet.

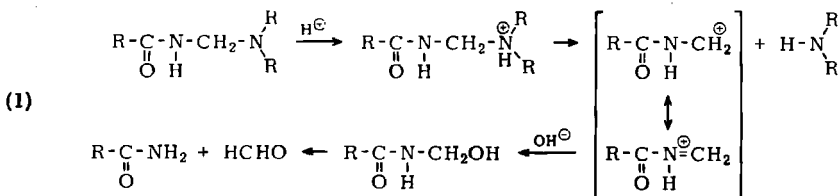
¹⁾ Dtsch. Bundes-Pat. 1 044 806 (1956) u. W. Siedel, A. Söder und F. Lindner, Medizin und Chemie, Band VI, S. 316, Verlag Chemie, Weinheim 1958.

²⁾ S. z. B. B. Reichert, Die Mannich-Reaktion, S. 64, Springer-Verlag 1959 u. Index Merck, 9. Auflg. Verlag Chemie, Weinheim 1961.

³⁾ S. z. B. H. Auerhoff und J. Knabe, Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 2. Auflg. Wiss. Verlagsges. G. m. b. H., Stuttgart 1964.



N-Mannichbasen sind als aminalartige Verbindungen im allgemeinen weniger stabil als C-Mannichbasen. Werden N-Mannichbasen mit Mineralsäuren behandelt, so entsteht fast immer eine nachweisbare Menge Formaldehyd⁴). Gleichung (1) gibt die bei N-Mannichbasen aus einem Säureamid, Formaldehyd und einem sekundären Amin ablaufende Reaktion wieder:



Reverin® entwickelt nach dem Lösen in verdünnter Salzsäure und Erwärmen Formaldehyd und dürfte demnach eine N-Mannichbase sein⁴).

Gottstein, Minor und Cheney⁵) stellten 1959 verschiedene Aminomethylierungsprodukte des Tetracyclins her und untersuchten die Konstitution des Morpholinderivates*). Sie kamen zu der Überzeugung, daß im Morpholinomethyl-tetracyclin eine N-Mannichbase vorliegt, also die Carbonamidgruppe aminomethyliert wurde. Als Gründe wurden angegeben: IR-spektroskopische Befunde im 3µ- und 6µ-Gebiet, das Entstehen von Tetracyclin und N-Methylmorpholin bei der Hydrogenolyse mit Raney Ni/H₂, sowie die Regenerierung von Tetracyclin bei der Einwirkung von Natriumhydrogensulfid.

Nach den bisher geschilderten Gesichtspunkten war anzunehmen, daß dem Reverin® ebenfalls die Konstitution einer N-Mannichbase, nämlich IV, zukommt. Da man sich heute jedoch nicht mehr allein auf Analogieschlüsse verlassen sollte,

*) Es handelt sich dabei um eine therapeutisch unwirksame Epi-Verbindung.

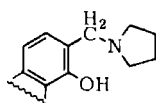
⁴) Für eine Privatmitteilung danken wir Herrn Prof. Dr. H. Böhme, Marburg/Lahn.

⁵) W. J. Gottstein, W. F. Minor und L. C. Cheney, J. Amer. chem. Soc. 81, 1198 (1959).

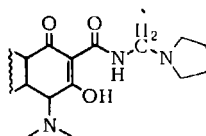
ferner Mannichreaktionen bei relativ geringfügiger Änderung der Versuchsbedingungen oder der Reaktionspartner einen anderen Verlauf nehmen können und außerdem die Aussagemöglichkeiten der IR-Spektren im 3μ - und 6μ -Gebiet durch die zahlreichen funktionellen Gruppen im Tetracyclin und im Reverin® beeinträchtigt werden, versuchten wir, eindeutige chemische Beweise für die Konstitution des Reverins® zu erbringen.

Es sollte zunächst zwischen III und IV unterschieden werden. Bei der nicht zu erwartenden Entscheidung gegen IV wäre dann noch zwischen III und II zu unterscheiden.

In III ist die Partialstruktur IIIa, in IV die Partialstruktur IVa enthalten:

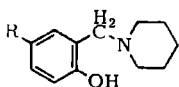


IIIa

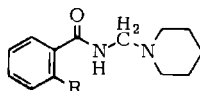


IVa

IIIa ist mit einfachen Phenolmannichbasen wie VIa oder VIb vergleichbar; IVa hat Ähnlichkeit mit N-Mannichbasen des Benzamids oder Salicylamids, wie VIIa oder VIIb:



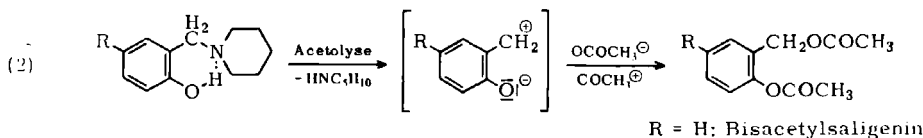
VIa: R = H
VIb: R = CH₃



VIIa: R = H
VIIb: R = OH

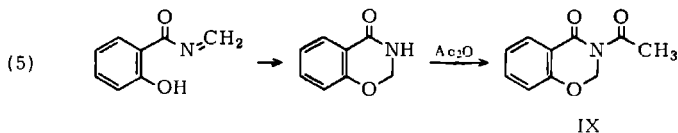
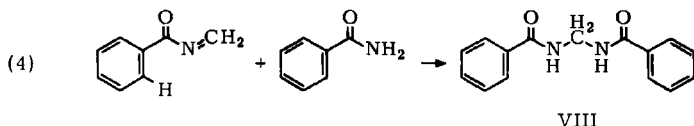
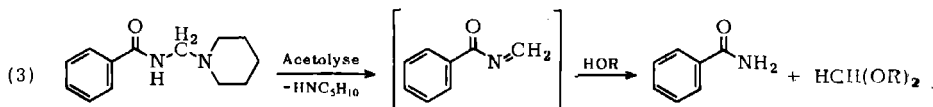
Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Acetolyse von Mannichbasen⁶⁾ studierten wir auch das Verhalten der Verbindungen VIa, VIb, VIIa und VIIb beim Erhitzen mit Acetanhydrid/NaOAc und beim Erhitzen mit Eisessig/NaOAc. VIa, VIb und ähnliche Phenolmannichbasen erleiden bei der Acetolyse mit Acetanhydrid/NaOAc eine Eliminierungs-Additionsreaktion nach Gleichung (2). Aus VIa entsteht dabei Bisacetyl-saligenin. In allen untersuchten Fällen blieb der CH₂-Rest der Aminomethylgruppe am aromatischen Kern haften, während die Aminogruppe gegen eine Acetoxygruppe ausgetauscht wurde. Außerdem trat Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe ein:

⁶⁾ H. J. Roth und Mitarb., Arch. Pharmaz. 296, 243 (1963); 296, 510 (1963); 297, 298 (1964); 297, 773 (1964).



Bei der versuchten Acetolyse mit Eisessig/NaOAc blieben alle untersuchten Phenolmannichbasen unverändert.

N-Mannichbasen wie VIIa oder VIIb erleiden beim Erhitzen mit Acetanhydrid/NaOAc eine β -Eliminierung. Die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Azomethylenverbindungen werden dann teilweise zu den entsprechenden Säureamiden und Formaldehyd (oder Formaldehydderivaten) solvolysiert oder stabilisieren sich durch intermolekulare (VIIa) bzw. intramolekulare Anlagerung (VIIb). Die einzelnen Reaktionsschritte sind in den Gleichungen (3), (4) und (5) wiedergegeben:



Neben wenig Benzamid und N-Acetylbenzamid wird aus VIIa als Hauptprodukt das Methylenbisbenzamid VIII erhalten. VIIb liefert neben wenig Salicylamid in erster Linie das N-acetylierte, heterocyclische Kondensationsprodukt IX. Werden VIIa oder VIIb dagegen mit Eisessig/NaOAc erhitzt, so tritt in beiden Fällen vorwiegend Abbau zum Säureamid ein.

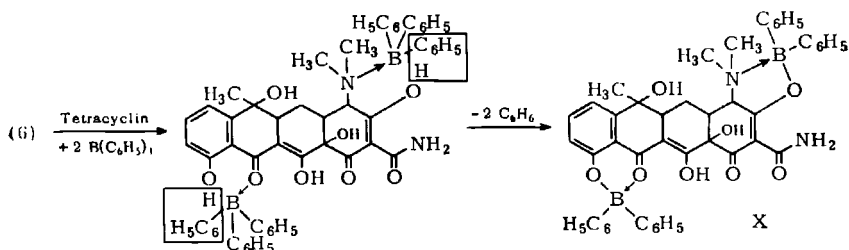
Aus diesen Modellversuchen ergibt sich, daß die Acetolyse des Reverins® eine eindeutige Entscheidung zwischen III und IV herbeiführen kann. Gleichzeitig erkennt man, daß die Verhältnisse bei der Ausführung mit Eisessig/NaOAc einfacher liegen. Wenn die Konstitution III zutrifft, sollte das Reverin® unverändert erhalten bleiben. Liegt dagegen die Konstitution IV vor, so müßte Abbau zum Tetracyclin erfolgen.

Bei der Acetolyse des Reverins® mit Eisessig/NaOAc wird tatsächlich der Pyrrolidinomethylrest abgespalten. Neben Zersetzungsprodukten wird als Hauptprodukt Tetracyclinacetat erhalten. Das gleiche Reaktionsgemisch erhält man bei einem zur Kontrolle ausgeführten Blindversuch mit Tetracyclin. Die nach dem Umkristallisieren erhaltenen Hauptprodukte aus Haupt- und Blindversuch sind in allen chemischen und physikalischen Eigenschaften identisch, was nur zutreffen kann, wenn die Konstitution IV vorliegt. Damit ist schon sicher, daß im Reverin® eine N-Mannichbase (IV) und keine C-Mannichbase der Konstitution III oder II vorliegt.

Wie man am Auftreten einiger Zersetzungsprodukte erkennen kann, ist die Acetolyse keine ideale Untersuchungsmethode für die empfindliche, polyfunktionelle Verbindung IV.

Wir wandten daher eine zweite, unter äußerst milden Bedingungen durchführbare Reaktion, die Einwirkung von Triphenylbor in äthanolischer Lösung, an. Wie in einer vorangehenden Arbeit⁷⁾ bereits gezeigt werden konnte, gehen Phenolmannichbasen vom Typ VI beim Behandeln mit Triphenylbor in Äthanol unter Einbau einer $B(C_6H_5)_2$ -Gruppe pro Mol Mannichbase in Phenoläther über. N-Mannichbasen vom Typ VII erleiden unter den gleichen Bedingungen eine β -Eliminierung der Aminogruppe als Aminoboran und Äthanolyse der entstandenen Azomethylenverbindungen zu Diäthylformal und dem zugehörigen Säureamid.

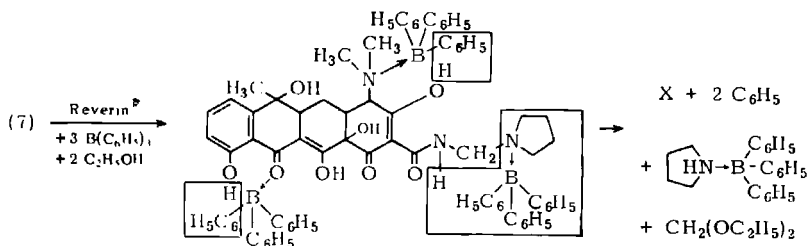
Die Verbindung III sollte danach bei der Umsetzung mit Triphenylbor in Äthanol unter Einbau einer $B(C_6H_5)_2$ -Gruppe pro Mol III in einen entsprechenden Phenoläther übergehen. Die Verbindung IV müßte bei gleicher Behandlung Tetracyclin liefern. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß Tetracyclin selbst bei der Umsetzung mit Triphenylbor in Äthanol 2 $B(C_6H_5)_2$ -Gruppen addiert, wobei 2 Mol Benzol eliminiert werden. Die Umsetzung dürfte nach Gleichung (6) verlaufen:



Unter Berücksichtigung beider Forderungen müßte aus III ein von X verschiedener, aus IV ein mit X identischer Borkomplex entstehen.

⁷⁾ H. J. Roth, R. Brandes und Ch. Schwenke, Arch. Pharmaz. 297, 766 (1964).

Das Experiment spricht eindeutig für IV. Tetracyclin und Reverin® liefern mit Bortriphenyl in äthanolischer Lösung identische Borkomplexe der wahrscheinlichen Konstitution X. Die Umsetzung von Reverin® dürfte nach Gleichung (7) verlaufen:



Für die Konstitution des aus Tetracyclin und aus Reverin® erhaltenen Borkomplexes bestehen prinzipiell zwei weitere Möglichkeiten, wenn man die funktionellen Gruppen an C-12 und C-13 in Betracht zieht. Von den drei denkbaren Konstitutionen halten wir X für die wahrscheinlichste, und zwar aus folgenden Gründen: 1. X gibt keine Phenolreaktion mit FeCl_3 . 2. C-12 und C-13 liegen nicht in einer Ebene, so daß ein 6gliedriger, borhaltiger Heterocyclus, in welchen C-12 und C-13 eingebaut wären, eine sehr starke Spannung aufweisen würde. 3. Kristallisiert man X aus Eisessig um, dem ein Tropfen H_2SO_4 zugesetzt ist, so entsteht ein neuer, wahrscheinlich um eine $\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ -Gruppe ärmerer Borkomplex. Dieses Verhalten spricht für die Lösung einer $\text{N} \rightarrow \text{B}$ -Bindung, während 6gliedrige, N-freie, sauerstoffhaltige Borheterocyclusen unter den angewandten Bedingungen stabil sind.

Abb. 1 zeigt die zu erwartende bathochrome Verschiebung der Maxima im Absorptionsspektrum von X im Vergleich mit den Spektren von Tetracyclin und Reverin®.

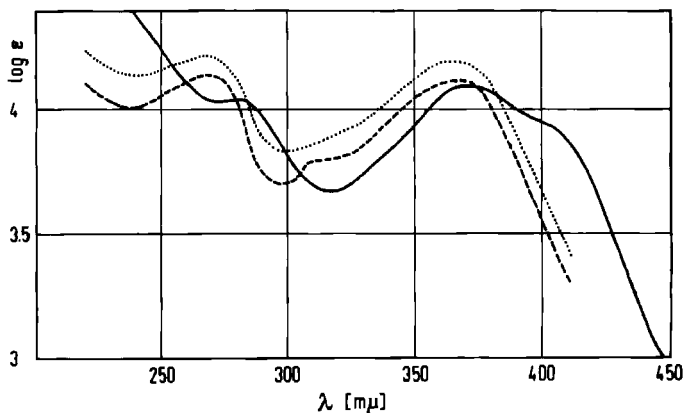


Abb. 1. Absorptionsspektren von Tetracyclin - - - -, Reverin® und X —, gemessen in äthanolischer Lösung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemischen Industrie — danken wir für die Förderung der vorliegenden Arbeit durch Sachbeihilfen. Den Farbwerken *Hoechst A. G.* sind wir für die Überlassung von Tetracyclin und Reverin® zu Dank verpflichtet. Fräulein *K. Jäger*, Braunschweig, sei an dieser Stelle für die sorgfältige Ermittlung der UV- und IR-Spektren gedankt.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte sind im Linströmblock ermittelt und uncorr. angegeben.

UV-Spektren sind mit dem Beckman-Spektralphotometer DU in äthanolischen Lösungen gemessen.

IR-Spektren sind in KBr mit dem Beckman IR 5 ermittelt.

Formaldehydnachweis bei der Zersetzung von Reverin® mit Mineralsäure

0,3 g Reverin® werden in einer CO₂-Nachweisapparatur in 5 ml 15proz. H₂SO₄ gelöst und einige Min. auf 90—100° erhitzt. Die entstehenden Dämpfe werden in 3 ml Wasser eingeleitet, das anschließend zu einer Lösung von 0,05 g Chromotropsäure in 5 ml 80proz. H₂SO₄ gegeben wird. Eine kräftige Violettfärbung zeigt die Anwesenheit von Formaldehyd an.

Acetolyse von VIa und VIb

A) Mit Acetanhydrid: 0,02 Mol Phenolmannichbase · HCl werden in 30 ml Acetanhydrid gelöst, mit 5 g wasserfreiem NaOAc versetzt und 45 Min. zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf etwa 40° wird das überschüssige Acetanhydrid durch vorsichtige Zugabe von insgesamt 100 ml Wasser verseift und die erhaltene wäßrige Lösung mit Chloroform erschöpfend extrahiert. Die gewaschene und über Na₂SO₄ getrocknete Chloroformlösung wird i. Vak. eingengt und das verbliebene Öl fraktioniert.

VIa: 1. Fraktion: Sdp.₅ 85—87°, 2. Fraktion: Sdp.₅ 110°.

VIb: 1. Fraktion: Sdp.₅ 85—87°, 2. Fraktion: Sdp.₄ 128°.

Die 1. Fraktion aus VIa und die 1. Fraktion aus VIb sind untereinander und mit einer unabhängig hergestellten Probe von N-Acetylpiperidin identisch.

VIa, 2. Fraktion ist Bisacetyl-saligenin.

C ₁₁ H ₁₂ O ₄ (208,2)	Ber.: C 63,45	H 5,81
	Gef.: C 63,51	H 5,68

VIb, 2. Fraktion ist 2-Acetoxy-5-methyl-benzylacetat.

C ₁₂ H ₁₄ O ₄ (222,2)	Ber.: C 64,85	H 6,35
	Gef.: C 64,64	H 6,29

B) Mit Eisessig: 0,02 Mol Phenolmannichbase · HCl werden, wie unter A) beschrieben behandelt, wobei an Stelle von Acetanhydrid Eisessig verwendet wird. Nach dem Verdünnen mit Wasser wird die saure Lösung mit NaOH neutralisiert und vorsichtig mit so viel NaHCO₃-Lösung versetzt, bis eine starke Trübung entsteht. Anschließend wird mit Äther quantitativ ausgeschüttelt, die ätherische Lösung gewaschen, getrocknet, i. Vak. eingengt und der Rückstand fraktioniert. Dabei erhält man VIa bzw. VIb fast quantitativ als Basen zurück. Die Identifizierung geschieht durch Überführung in die Hydrochloride und Mischschmp. mit den Ausgangsstoffen.

Acetolyse von VIIa

A) Mit Acetanhydrid: 10,9 g Piperidinomethylbenzamid (0,05 Mol) werden mit 60 ml Acetanhydrid und 10 g wasserfreiem NaOAc 45 Min. zum Rückfluß erhitzt. Aufarbeitung wie unter VIa.

1. Fraktion: Sdp.₈₋₉ 93—95°. 2. Fraktion: Sublimat (7 Torr) 120—140°. 3. Fraktion: Der Rückstand wird bei 5 Torr und 180—200° Luftbadtemp. im Kugelrohr destilliert. Das erhaltene Destillat erstarrt nach kurzer Zeit.

1. Fraktion: N-Acetylpiperidin. 2. Fraktion: N-Acetylbenzamid, Schmp. 117°, Ausbeute um 20%.

$C_9H_9NO_2$ (163,2)	Ber.: C 66,25	H 5,56	N 8,58
	Gef.: C 66,23	H 5,64	N 8,77

3. Fraktion: Methylenbisbenzamid, Schmp. 219°, Ausbeute um 60%.

$C_{15}H_{14}N_2O_2$ (254,3)	Ber.: C 70,96	H 5,56	N 11,04
	Gef.: C 71,05	H 5,71	N 11,12

B) Mit Eisessig: Bei analoger Behandlung mit Eisessig/NaOAc wird Benzamid und daneben Methylenbisbenzamid erhalten.

Acetolyse von VIIb

A) Mit Acetanhydrid: Ausführung analog VIIa.

1. Fraktion: Sdp.₈₋₉ 93—95° (N-Acetylpiperidin). 2. Fraktion: Sdp.₅ 125—145° (IX). 3. Fraktion: Phenolformaldehydharze.

Die 2. Fraktion erstarrt nach kurzem Stehen. Weiße Kristalle, löslich in Chloroform, Äther, Äthanol, Aceton, unlöslich in Wasser. Schmp. 109°, Ausbeute etwa 30%.

$C_{16}H_9NO_3$ (191,2)	Ber.: C 62,82	H 4,74	N 7,33
	Gef.: C 62,96	H 4,57	N 7,41

IR-Spektrum: Abb. 2.

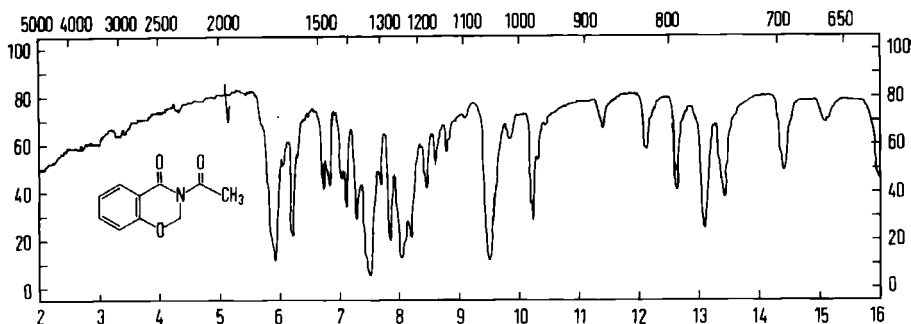


Abb. 2. IR-Spektrum von IX (Dihydro-3-acetyl-1,3-benzoxazin-[4])

B) Mit Eisessig: Bei analoger Behandlung mit Eisessig/NaOAc wird als Hauptprodukt Salicylamid neben einer beträchtlichen Menge an Phenolformaldehydharzen erhalten.

Acetolyse von Reverin®

2 g Reverin® werden mit 30 ml Eisessig und 5 g wasserfreiem NaOAc 30 Min. zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird vom ungelösten NaOAc dekantiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der bräunliche Rückstand wird aus Äthanol mit

Kohle umkristallisiert. Gelbes, mikrokristallines Pulver (nach mehrmaligem Umkristallisieren), löslich in Äthanol, Eisessig, Wasser und in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, leicht löslich in verd. Alkalilaugen und verd. Mineralsäuren, Zers. 205–211°

$C_{22}H_{25}N_2O_8 \cdot C_2H_2O_2$ (504,5)	Ber.: C 57,14	H 5,59	N 5,55
	Gef.: C 57,31	H 5,69	N 5,54

Blindversuch mit Tetracyclin

2 g Tetracyclin werden wie oben behandelt. Das erhaltene Reaktionsprodukt ist in allen chemischen und physikalischen Eigenschaften (Zersp., UV- und IR-Spektrum) mit dem voranstehend beschriebenen identisch.

Umsetzung von Tetracyclin mit Triphenylbor (X)

Aus 0,89 g Tetracyclin (Base) (0,002 Mol) wird eine kalt gesättigte, äthanol. Lösung bereitet. Diese versetzt man mit einer Lösung von 1 g frisch vorbereitetem Triphenylbor⁷⁾ in 5 ml Äthanol und erwärmt 10 Min. auf dem Wasserbad, wobei ein gelber Kristallbrei entsteht. Nach dem Abzentrifugieren wird aus Äthanol umkristallisiert. Gelbe, filzige Kristalle, löslich in Äthanol, Aceton, Eisessig, schwer löslich in Äther, unlöslich in Wasser. Schmp. ab 220° (unter Zers. und Braunfärbung). Ausbeute: 1,08 g (77,2%).

$C_{46}H_{42}B_2N_2O_8$ (772,5)	Ber.: C 71,52	H 5,48	N 3,62
	Gef.: C 71,66	H 6,01	N 3,58

IR-Spektrum: Abb. 3. UV-Spektrum: s. Abb. 1.

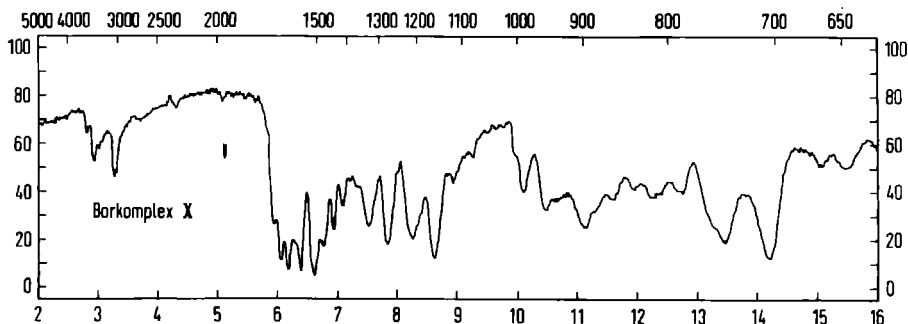


Abb. 3. IR-Spektrum von X

Umsetzung von Reverin® mit Triphenylbor

1,05 g Reverin® (0,002 Mol) werden, wie bei Tetracyclin beschrieben, mit einer Lösung von 1,5 g frisch vorbereitetem Triphenylbor in 10 ml Äthanol behandelt. Gelbe, filzige Kristalle, Löslichkeit wie bei X; Ausbeute: 1,04 g (69%). Mischschmp. mit X: Zers. ab 220°. UV- und IR-Spektrum identisch mit X.

$C_{46}H_{42}B_2N_2O_8$ (772,5)	Ber.: C 71,52	H 5,48	N 3,62
	Gef.: C 71,72	H 5,39	N 3,60