

Gottfried Blaschke, Rolf Jörgens und Gisbert Claassen

Bindung ringsubstituierter Benzylamine an Lecithin

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn und dem Pharmazeutischen Institut der Universität Kiel.

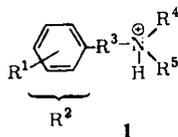
(Eingegangen am 28. April 1975)

Die Komplexierung von Phospholipiden durch katamphiphile Pharmaka, Ursache einer neuen Arzneimittelnebenwirkung, wurde durch NMR-spektroskopische Bindungsmessungen von 18 ringsubstituierten Benzylaminderivaten als Modellsubstanzen an Lecithin untersucht. Dazu bestimmte man als Maß der Bindungsfestigkeit die nach Zugabe von Lecithin zu Lösungen von 2–19 auftretende Bandenverbreiterung der NMR-Signale von Aromaten- und Methylenprotonen. Die ausgezeichnete Korrelation aller Meßwerte mit den Substituentenkonstanten π der Modellverbindungen beweist, daß die Komplexierung des Lecithins linear mit der Lipophilie des Ringsubstituenten zunimmt.

Interaction of Ring Substituted Benzylamines with Lecithin

The interaction of phospholipids with catamphiphilic drugs, molecular basis of undesired side effects, was investigated by NMR binding studies with 18 ring substituted benzylamines and lecithin. In order to determine this interaction quantitatively, the NMR line broadening of aromatic and methylene protons of 2–19 in solution was measured in the presence of lecithin. The excellent correlation between binding values and the substituent constants π of the model compounds demonstrates a linear increase of lecithin complexation with the lipophilic properties of the ring substituents.

Kürzlich wurde durch Lüllmann et al.¹⁾ eine neue Arzneimittelnebenwirkung bekannt. Chronische Gabe von Pharmaka aus verschiedenen Arzneimittelgruppen führt zur Störung des Phospholipidstoffwechsels, wodurch Phospholipide wie Lecithin in verschiedenen Organen abgelagert werden. Unter diesen Arzneimitteln befinden sich Verbindungen wie die Appetitzügler Chlorphentermin und Fenfluramin sowie das Chemotherapeuticum bzw. Antirheumaticum Chloroquin. Gemeinsame Strukturmerkmale dieser und zahlreicher weiterer Pharmaka sind ein oder mehrere, meist halogensubstituierte Ringe (1 , R^2 wie Phenylrest mit Substituenten R^1) und eine Seitenkette R^3 mit protonisierbarem Stickstoffatom, welches wiederum substituiert sein kann (R^4 , R^5).



1 H. Lüllmann, R. Lüllmann-Rauch und O. Wassermann, Dtsch.med. Wschr. 98, 1616 (1973).

Es sind somit katamphiphile Verbindungen¹⁾ mit kationischem und hydrophobem Teil, die an Phospholipide wie Lecithin durch elektrostatische und hydrophobe Anziehung gebunden werden können. Diese Wechselwirkung verändert die Substrateigenschaften der Phospholipide, die dem normalen Stoffwechsel entzogen und in Organen angereichert werden¹⁾. Die Bildung solcher Phospholipid-Pharmakon-Komplexe ist bereits von Seydel und Wassermann²⁾ NMR-spektroskopisch nachgewiesen worden. So verbreitern sich die NMR-Signale des Chlorphentermins nach Lecithinzusatz. Das NMR-Spektrum des Phentermins, welches keine Störung des Phospholipidstoffwechsels auslöst, wird dagegen durch Zusatz von Lecithin kaum verändert. Es scheint somit das Chloratom des Chlorphentermins für die Affinität zu Phospholipiden verantwortlich zu sein.

Weitere Daten sind erforderlich, um den Einfluß von Strukturelementen katamphiphiler Arzneistoffe des Strukturtyps 1 auf die Wechselwirkung mit Phospholipiden zu erkennen und damit möglicherweise diese unerwünschte Nebenwirkung durch gezielte Abänderung ihrer Struktur vermindern zu können.

Methodik

Wechselwirkungen von Pharmaka mit Makromolekülen können nach Jardetzky³⁾ NMR-spektroskopisch bestimmt werden. Hierzu wird die transversale Relaxationszeit T_2 von Atomgruppen des Pharmakons in Gegenwart steigender Konzentrationen an makromolekularer Verbindung gemessen. In verdünnter Lösung sind die Atomgruppen des Pharmakons weitgehend frei beweglich und weisen daher eine lange Relaxationszeit auf. Setzt man dieser Lösung eine makromolekulare Verbindung zu, welche einen Teil des Pharmakons bindet, so sind die Atomgruppen der gebundenen Pharmakonmoleküle in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt und besitzen sehr kurze Relaxationszeiten (T_2) gebunden. Wegen des raschen Ligandenaustausches zwischen frei in Lösung befindlicher und am Makromolekül gebundener Pharmakonmoleküle erhält man den Mittelwert der Relaxationszeiten aller in der Meßprobe befindlichen Pharmakonmoleküle. Meßtechnisch besonders einfach lassen sich diese Relaxationszeiten nach Gl. (1) aus der Linienbreite $\Delta\nu$ von NMR-Signalen bestimmen, wonach die Verkürzung der Relaxationszeit als Bandenverbreiterung angezeigt wird.

$$\pi \cdot \Delta\nu = \frac{1}{T_2} \quad (1)$$

Die bisherigen Messungen zur Wechselwirkung katamphiphiler Pharmaka mit Lecithin waren mit Chlorphentermin und Phentermin in wäßriger Pufferlösung bei pH 7.4 durchgeführt worden, wobei man das Lecithin durch Einwirkung von Ultraschall in der Meßprobe verteilte²⁾. Für die vorgesehenen Meßreihen mußten Genauigkeit und Empfindlichkeit des Meßverfahrens verbessert werden. Die Vorversuche ergaben, daß Chlorphentermin nur in protonisierter Form, nicht dagegen als freie Base an Lecithin gebunden wird. Da unter den bisherigen Meßbedingungen die Pharmaka überwiegend als Basen vorgelegt hatten, führte man die nachfolgend be-

2 J.K. Seydel und O. Wassermann, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279, 207 (1973).

3 O. Jardetzky und N.G. Wade-Jardetzky, Mol. Pharmacol. 1, 214 (1965).

schriebenen Versuche mit Hydrochloriden in ungepufferter Lösung durch. Ferner war die Zugabe des Lecithins als methanolische Lösung vorteilhaft, da es einfach durch kurzes Umschütteln in der Meßprobe verteilt werden konnte und Ultraschallung der Probe nicht mehr erforderlich war. Schließlich waren die in Gegenwart von Lecithin gemessenen Bandenverbreiterungen der NMR-Signale von Arzneistoffen unterschiedlicher Struktur wegen teilweise stark aufgespaltener und sich überlagernder Signalgruppen nur schwierig auszuwerten. Um eine quantitative Beziehung zwischen der Lecithinbindung und Strukturmerkmalen aufzustellen, wurden Verbindungsreihen des Strukturtyps 1 untersucht, bei denen man jeweils nur ein Strukturelement veränderte. Nachfolgend wird über die Lecithinbindung ringsubstituierter Benzylammoniumderivate (1, $R^3 = CH_2$, $R^4 = R^5 = H$) mit variiertem Rest R^1 berichtet.

Meßergebnisse

Abb. 1 zeigt die Signalform von Aromatenprotonen (f) und Methylenprotonen (a) des 4-Brombenzylammoniumchlorids (12) in wäßrig-methanolischer Lösung ohne Lecithin. Durch Zusatz steigender Mengen Lecithin, dessen NMR-Signale wegen der geringen Konzentration nicht im Spektrum erscheinen, werden sowohl das AA'BB'-System bei 7.48 ppm (f–j, Aromatenprotonen) als auch das Singulett bei 4.13 ppm (b–e, CH_2 -Gruppe) zunehmend verbreitert. Das NMR-Signal der Methylgruppe von CH_3OD , welches zur Erkennung von Störungen der Messung zugesetzt worden war, hatte sich nicht verändert. Die Bandenverbreiterung der NMR-Signale von 12 ist somit nicht durch unspezifische Effekte wie Viskositäts-erhöhung oder Inhomogenität des Magnetfeldes verursacht worden.

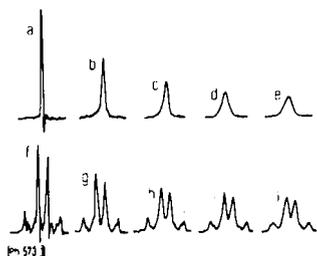


Abb. 1: Signalform (60 MHz-NMR-Spektrum) von 12 ohne Lecithin (a, f) sowie nach Zusatz von 3.0 (b, g), 6.0 (c, h), 9.0 (d, i) und 12 (e, j) mg/ml Lecithin. Sweep width = 500.

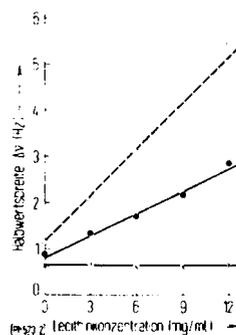


Abb. 2: Halbwertsbreiten (Hz) der NMR-Signale von 12 in Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration.) —o—o—o— Methylengruppe; —●—●—●— Aromatenprotonen; —x—x—x— Monodeuteromethanol (CH_3OD)

In Abb. 2 sind die Meßpunkte für die Breite der NMR-Signale von 12 auf halber Peakhöhe (Halbwertsbreite $\Delta\nu$) gegen die Lecithinkonzentration aufgetragen. Man erhält Geraden, deren Steigung m als quantitatives Maß für die Bindung des jeweiligen Molekülteils an Lecithin durch Regressionsrechnung ermittelt wurde. Diese Werte sowie die Ordinatenabschnitte b der Regressionsgeraden wurden für die Methylengruppe weiterer 17 Benzylammoniumverbindungen mit variiertem Substituenten bestimmt (Tab. 1). Von den Verbindungen dieser Reihe wird somit die Cyanoverbindung 2 am wenigsten, die Cyclohexylverbindung 19 am stärksten an Lecithin gebunden. Als Maß für diese Bindungsfestigkeit wurde nach Gl. (1) und (2) aus der Steigung m durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor der jeweilige Wert von $(1/T_2)_{\text{gebunden}}$ berechnet und als Logarithmus in Tab. 1 angegeben. Dabei setzte man als Molekulargewicht für das verwendete Eilecithin den Wert 760 ein, wobei die Assoziation zu Micellarstrukturen nicht berücksichtigt ist.

$$(2) \quad (1/T_2)_{\text{gebunden}} \approx \frac{[(1/T_2)_{\text{beobachtet}} - (1/T_2)_{\text{frei}}] \cdot [B]}{[L]}$$

[B] = Konzentration an Benzylammoniumderivat

[L] = Konzentration an Lecithin

Auf gleichem Wege berechnete man die Werte für $(1/T_2)_{\text{gebunden}}$ von Aromatenprotonen, wobei nur Spektren mit gut auswertbarem AA'BB'-System berücksichtigt sind (Tab. 1, in Klammern angegeben). Diese Daten für die Wechselwirkung der Methylengruppen- und Aromatenprotonen sind in Tab. 1 den π -Werten (Hansch)⁴ als Maß der Lipophilie des jeweiligen Substituenten gegenübergestellt und in Abb. 3 gegeneinander aufgetragen.

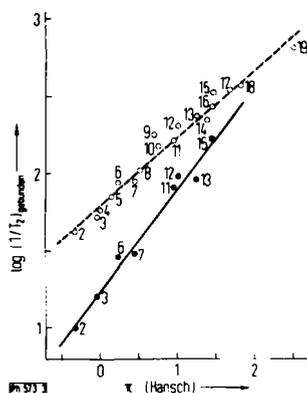
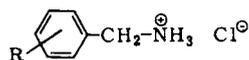


Abb. 3: Bindungskonstanten $\log(1/T_2)_{\text{gebunden}}$ (sec^{-1}) ringsubstituierter Benzylammoniumsalze in Abhängigkeit der Substituentenkonstanten π (Hansch).
 ○—○—○ Methylengruppen: —●—●—● Aromatenprotonen

4 T. Fujita, J. Iwasa und C. Hansch, J. Amer. chem. Soc. 86, 5175 (1964).

Tabelle 1: NMR-Daten für die Bindung der Methylenprotonen (Aromatenprotonen) von 2–19 an Lecithin und Vergleich mit den Substituentenkonstanten π (Hansch). r = Regressionskoeffizient.



Substituent R	m	b	r	$\log(1/T_{2\text{gebunden}})$	π (Hansch)
2 4-CN	0.0708 (0.0166)	1.30 1.06	0.998 0.994	1.626 0.997)	- 0.32
3 4-OCH ₃	0.0879 (0.0265)	1.14 0.85	0.991 0.996	1.720 1.200)	- 0.04
4 H	0.0985	0.86	0.965	1.764	0.00
5 4-F	0.1191	1.42	0.982	1.852	0.15
6 4-NO ₂	0.1468 (0.0422)	1.31 0.85	0.993 0.999	1.943 1.459)	0.24
7 4-C ₂ H ₅ O	0.1304 (0.0505)	1.15 0.93	0.996 0.993	1.891 1.479)	0.46
8 4-CH ₃	0.1729	0.97	0.937	2.014	0.52
9 4-Cl	0.2969	0.62	0.997	2.249	0.70
10 3-Cl	0.2460	1.21	0.987	2.167	0.76
11 4-n-C ₃ H ₇ O	0.2672 (0.1405)	1.60 0.91	0.992 0.997	2.203 1.905)	0.96
12 4-Br	0.3374 (0.1587)	1.17 0.83	0.995 0.994	2.304 1.977)	1.02
13 4-J	0.3929 (0.1522)	1.26 0.81	0.997 0.996	2.370 1.958)	1.26
14 4-iso-C ₃ H ₇	0.3686	1.17	0.985	2.343	1.40
15 4-n-C ₄ H ₉ O	0.5487 (0.2801)	1.31 0.81	0.997 0.986	2.515 2.223)	1.46
16 3,4-di-Cl	0.4464	0.98	0.994	2.426	1.46

Fortsetzung von Tabelle 1:

Substituent R	m	b	r	$\log (1/T_{2\text{gebunden}})$	π (Hansch)
17 4-tert-C ₄ H ₉	0.5710	0.97	0.995	2.533	1.68
18 4-sec-C ₄ H ₉	0.6164	1.05	0.997	2.566	1.82
19 4-o-C ₆ H ₁₁	1.077	0.66	0.996	2.808	2.51

Man erhält somit trotz sehr unterschiedlicher Substitution der Verbindungen 2–19 eine ausgezeichnete Korrelation der Bindungswerte sowohl von Methylen- als auch von Aromatenprotonen mit den π -Werten der Substituenten, die von *Hansch* aus Verteilungskoeffizienten substituierter Phenoxyessigsäurederivate bestimmt worden sind.

Die Lecithinbindung substituierter Benzylamine als Modellverbindungen katamphiphiler Pharmaka nimmt somit stetig mit der Lipophilie des Substituenten zu und wird nicht durch induktiven oder sterischen Effekt des Substituenten beeinflusst.

Die Regressionsrechnung liefert für die Meßpunkte der Abb. 3 folgende Werte:

	Methylenprotonen	Aromatenprotonen
Steigung m	0.435	0.662
Ordinatenabschnitt b	1.795	1.232
Zahl der Werte n	18	8
Korrelationskoeffizient r	0.983	0.990

Als Maß für die Bindungsfestigkeit wird üblicherweise nicht $(1/T_2)_{\text{gebunden}}$ selbst, sondern der Quotient $(T_2)_{\text{frei}}/(T_2)_{\text{gebunden}}$ angegeben. Die lineare Korrelation dieser Werte mit π (*Hansch*) scheint jedoch verschlechterte Regressionskoeffizienten zu ergeben:

	Methylenprotonen	Aromatenprotonen
Steigung m	0.481	0.702
Ordinatenabschnitt b	1.200	0.758
Zahl der Werte n	18	8
Korrelationskoeffizient r	0.947	0.986

Dabei wurde $(T_2)_{\text{frei}}$ jeweils nach Gl. (1) aus den Ordinatenabschnitten b (Halbwertsbreite der NMR-Signale ohne Lecithinzusatz) berechnet. Diese Auswertung ist offenbar nicht ausreichend genau durchzuführen, da die NMR-Signale besonders der Methylenprotonen durch Fernkopplung mit Aromatenprotonen je nach Substitution unterschiedlich verbreitert werden.

Messungen zur Lecithinbindung weiterer Substanzgruppen der Struktur 1 unter Variation anderer Molekülteile werden zur Zeit durchgeführt⁵⁾.

Herrn Prof. Dr. O.-E. Schultz danken wir für die Förderung dieser Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

NMR-Messungen

0.125 mmol des jeweiligen ringsubstituierten Benzylammoniumchlorids wurden in der Mischung aus 200 μl D_2O , 10 μl CH_3OD , 290 μl CD_3OD und einer Spur TMS klar gelöst. Bei einer Sondentemperatur von 37° wurden mit sweep width 50 die NMR-Spektren (Varian A 60 A) aufgenommen, wobei vor jeder Messung die Feldhomogenität anhand des CH_3OD -Signals überprüft wurde. Aus mindestens 5 Messungen berechnete man die Mittelwerte der Halbwertsbreiten. Zur NMR-Messung in Gegenwart von Lecithin löste man entsprechend 0.125 mmol des ringsubstituierten Benzylammoniumchlorids in der Mischung aus 200 μl D_2O , 10 μl CH_3OD , einer Spur TMS sowie x μl CD_3OD und fügte aus einer Mikroliterspritze y μl einer 25proz. Lösung von Lecithin in CD_3OD zu ($x + y = 290$). Vor der Messung temperierte man die milchig-trüben Proben 1h bei 37°. Messung und Auswertung der Spektren erfolgte wie vorstehend beschrieben. Die Halbwertsbreiten wurden bei mindestens 4 gleichmäßig abgestuften Lecithinkonzentrationen bestimmt, wobei man Verbindungen mit geringer Affinität zu Lecithin wie 3 bis zu 40 mg/ml Lecithin zusetzte. Chemische Verschiebungen der NMR-Signale von 2–19 wurden nach Lecithinzusatz nicht beobachtet.

Substanzen

Durch sc Reinigung von Eilecithin (Merck, Art.-Nr. 5331) erhielt man dc einheitliches Lecithin⁶⁾.

Die nachfolgend aufgeführten Benzylammoniumchloride wurden aus Äthanol umkristallisiert, wobei die Reinheit dc, gc und NMR-spektroskopisch abgesichert wurde. 4-Cyanobenzyl- (2, Schmp. 271–272°, Lit.⁷⁾: 274°, 4-Fluorbenzyl- (5, Schmp. 279°, Lit.⁸⁾: 279–281°, 4-Chlorbenzyl- (9, Schmp. 263°, Lit.⁹⁾: 261.5°, 3-Chlorbenzyl- (10, Schmp. 228–230°, Lit.¹⁰⁾: 225° und 3,4-Dichlorbenzylammoniumchlorid (16, Schmp. 250°, Lit.¹¹⁾: 248–249°) wurden aus den Basen

5 Dissertation R. Jörgens, Univ. Kiel, voraussichtlich 1975; Dissertation G. Claassen, Univ. Bonn, voraussichtlich 1976.

6 M. Marsh und R. Th. Holzbach, Clin. Chim. Acta 43, 87 (1973).

7 F. Ehrlich, Ber. dtsh. chem. Ges. 34, 3366 (1901).

8 R.W. Taft, E. Price, I.R. Fox, I.C. Lewis, K.K. Andersen und G.T. Davis, J. Amer. chem. Soc. 85, 3146 (1963).

9 K. Kindler, Arch. Pharmaz. 265, 389 (1927).

10 J. v. Braun, M. Kühn und J. Weismantel, Liebigs Ann. Chem. 449, 249 (1926).

11 S.L. Shapiro, E.S. Isaacs, V. Bandurco und L. Freedman, J. med. Chem. 5, 793 (1962).

(Fa. Aldrich) erhalten. 4-Methoxy- (3, Schmp. 243°, Lit.¹²): 244°, 4-Nitro- (6, Zers.-P. 263°, Lit.¹³): Zers. ab 256°), 4-Äthoxy- (7, Schmp. 248°, Lit.¹⁴): 243°), 4-Methyl- (8, Schmp. 237°, Lit.¹⁵): 234,5–235°), 4-n-Propoxy- (11, Schmp. 259–260°, Lit.¹⁶): 258–259°), 4-Brom- (12, Schmp. 279°, Lit.¹⁰): 279°), 4-Jod- (13, Schmp. 292°, Lit.¹¹): 290°), 4-Isopropyl- (14, Schmp. 239°, Lit.¹⁷): 239–240°), 4-n-Butoxy- (15, Schmp. 255°, Lit.¹⁸): 257–260°) und 4-tert-Butylbenzylammoniumchlorid (17, Schmp. 266–267°, Zers.-P. des Pikrats 218°, Lit.¹⁹): Zers.-P. 220°) stellte man in Anlehnung an Literaturvorschriften her⁵).

4-sec-Butylbenzylammoniumchlorid (19)

Aus 18.27 g (100 mmol) 4-sec-Butylbenzylchlorid erhielt man analog zur Darstellung von Benzylammoniumchlorid²⁰) 9.4 g (47 % d.Th.) weiße Nadeln vom Zers.-P. 178° (Äthanol). C₁₁H₁₈N · Cl (199.7) Ber.: N 7.01; Gef.: N 6.97.

4-Cyclohexylbenzylammoniumchlorid (19)

Wie vorstehend beschrieben wurden aus 20.9 g (100 mmol) 4-Cyclohexylbenzylchlorid²¹) 9.2 g (40.7 % d.Th.) weiße Nadeln vom Zers.-P. 267° (Äthanol) erhalten. C₁₃H₂₀N · Cl (225.8) Ber.: N 6.21; Gef.: N 6.21.

12 E.Ch.S. Jones und F.L. Pyman, J. chem. Soc. (London) 127, 2588 (1925).

13 J. Graymore, J. chem. Soc. (London) 1947, 1116.

14 DRP 360529 vom 7.10.1920, Chem. Werke Grenzach, zit. in C. 94/2, 478 (1923).

15 E. Bamberger und W. Lodter, Ber. dtsh. chem. Ges. 20, 1703 (1887).

16 E. Profft, F. Runge und A. Jumar, J. prakt. Chem. 273, 57 (1955).

17 H. Franzen, J. prakt. Chem. 72, 211 (1905).

18 E. Profft, D.P. (DDR) 27241 vom 11.10.1961, zit. in C. 1965, 13665.

19 J.W. Baker, W.S. Nathan und Ch.W. Shoppe, J. chem. Soc. 1935, 1847.

20 B. Reichert und W. Dornis, Arch. Pharmaz. 282, 100 (1944).

21 D. Bodroux und R. Thomassin, Bull. Soc. chim. France 6, 1411 (1939).

Anschrift: Prof. Dr. G. Blaschke, 5300 Bonn, An der Immenburg.

[Ph 573]

Elemér Vinkler*, Pál Németh*, Géza Stájer, Pál Sohár** und Gyula Jerkovich**

Über eine neue Identitätsreaktion des Glutethimids

* Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Medizinischen Universität, Szeged und

** aus dem Institut für Arzneimittelforschung, Budapest.

(Eingegangen am 30. April 1975)

Es wurde eine spezifische Reaktion zur Identifizierung von Glutethimid ausgearbeitet, welche auf der Nitrierung der Substanz beruht. Bei dieser konnten fünf Nitro-Derivate isoliert und deren Struktur IR-, NMR- und massenspektroskopisch aufgeklärt werden. Eines dieser Derivate, das α -(3,4-Dinitro-phenyl)- α -äthyl-glutarsäureimid gibt nach Reduktion in alkalischem Medium eine intensive violette Farbe. Anhand dieser Farbreaktion können schon 0,5 mg/ml Glutethimid spezifisch nachgewiesen werden.