

Arch. Pharm. (Weinheim) 311, 469–475 (1978)

Anneli Kaukinen*), Jaako Halmekoski und Harry Auterhoff**)

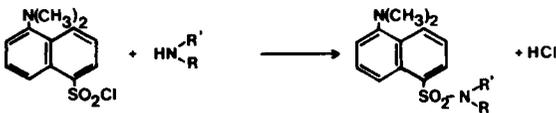
Dansylchlorid als Reagens für Sympathicomimetika, 1. Mitt.Aus den Pharmazeutischen Instituten der Universitäten Tübingen und Helsinki
(Eingegangen am 13. Juni 1977)

Von den Sympathicomimetika Ephedrin, Tyramin und Sympatol[®] und deren Modell-Substanzen β -Phenyläthylamin und 4-Äthylphenol wurden mit 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) fluoreszierende Derivate dargestellt. Bei Tyramin und Sympatol[®] gelang es, Didansyl und N-Monodansyl-derivate rein darzustellen. Von den isolierten Dansyl-derivaten wurden die Strukturen geklärt.

Dansyl Chloride as a Reagent for Sympathomimetic Amines, I.

Fluorescent derivatives of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride (dansyl chloride) are synthesized from the sympathomimetic amines ephedrine, tyramine and Sympatol[®] and their model substances β -phenylethylamine and 4-ethylphenol. Tyramine and Sympatol[®] give didansyl and N-monodansyl derivatives. The dansyl derivatives are isolated and their structures determined.

Dansylchlorid (1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid) wird seit 1952 als Reagens zur Untersuchung von Makromolekülen¹⁾, bei der Analytik von Enzymen²⁾ und bei der Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden³⁾ eingesetzt. Da Dansylchlorid mit verschiedenen funktionellen Gruppen, wie mit primären und sekundären Amino-, phenolischen Hydroxyl- und Imidazolgruppen, reagiert und fluoreszierende Derivate bildet, ist die Verwendung dieses Reagenzes auf die Untersuchung verschiedener Arzneimittel ausgedehnt worden. So hat man die Dansyl-derivate einiger Sympathicomimetika dargestellt und diese hauptsächlich untersucht⁴⁾⁵⁾.



* Aus der Dissertation von A. Kaukinen, Tübingen 1976.

** Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Horst Böhme zum 70. Geburtstag gewidmet.

1 G. Weber, Biochem. J. 51, 155 (1952).

2 B. S. Hartley und V. Massex, Biochem. Biophys. Acta 21, 58 (1956).

3 W. R. Gray und B. S. Hartley, Biochem. J. 89, 59 P (1963).

4 N. Seiler und M. Wiechmann, J. Chromatogr. 28, 350 (1967).

5 N. Seiler und M. Wiechmann, Progress in Thin-Layer Chromatography and related Methods, I. Band, Ann Arbor-Humphrey, Science Publisher, Ann Arbor 1970.



Für diese Arbeit wurden solche Sympathicomimetika ausgewählt (Ephedrin, Tyramin und Sympatol®), die sich in den funktionellen Gruppen voneinander unterscheiden. Zur Klärung der Strukturen der Reaktionsprodukte wurden die Modell-Substanzen β -Phenyläthylamin und 4-Äthylphenol herangezogen. Bei Ephedrin wurde der Einfluß der Reaktionszeit, des Aceton-Wasser-Verhältnisses, der Dansylchloridmenge und des Lichtes untersucht und dc kontrolliert. Die Dansylderivate wurden mittels Säulen- und/oder Dünnschichtchromatographie gereinigt.

Die „Dansylierung“ verläuft rasch; so scheint die Umsetzung des Ephedrins mit Dansylchlorid schon nach 10 Minuten vollständig zu sein. Zur Sicherheit wurde eine Reaktionszeit von zwei Stunden gewählt. Die Umsetzung wurde in einem Aceton-Wasser-Gemisch durchgeführt. Auf die entstehende Dansylderivatmenge scheint das Verhältnis Aceton zu Wasser keinen wesentlichen Einfluß zu haben. In der Arbeit wird das Aceton-Wasser-Verhältnis 1 : 1 verwendet, weil hier die Mengen der Nebenprodukte am geringsten sind. Die Reaktionslösung wird mit NaHCO_3 alkalisiert, weil in diesem Milieu die Aminogruppe leicht reagiert⁶⁾. Da während der Reaktion Nebenreaktionen ablaufen, muß Dansylchlorid im Überschuß vorhanden sein. Die zweifache Menge ist für eine funktionelle Gruppe genügend. Die Abb. 1 stellt ein DC des Reaktionsgemisches des Ephedrins dar. Daneben sind auch reines und vorbehandeltes Dansylchlorid aufgetragen.

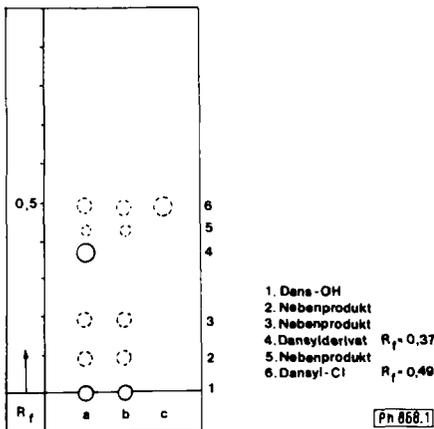


Abb. 1: Schematisches DC des Dansylderivats von Ephedrin (a), des vorbehandelten Dansylchlorids (b) und des Dansylchlorids (c). Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator „Merck“; Cyclohexan-Essigsäureäthylester 2 + 1; Detektion: UV, 366 nm

..... Fluoreszenz gering.

————— Fluoreszenz intensiv.

6 N. Seiler, *Methods Biochem. Anal.* 18, 259 (1970).

Man sieht, daß die Nebenprodukte aus dem Dansylchlorid und nicht aus dem Ephedrin stammen. Licht scheint mehr Einfluß auf die Bildung von 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonsäure (Dans-OH) als auf die Dansylierung von Ephedrin zu haben. Bei 4-Äthylphenol, in dem eine phenolische Gruppe mit Dansylchlorid reagiert, wird die Reaktionsmischung mit Na_2CO_3 alkalisiert. In Tyramin und Sympatol[®] können die Amino- und die phenolischen Hydroxylgruppen reagieren. Wenn man das Reaktionsgemisch mit NaHCO_3 alkalisiert, entstehen zwei Derivate in gleichen Mengen, die sich bei der Strukturklärung als N,O-Didansylderivat und N-Monodansylderivat erwiesen. Wenn man jedoch die Reaktionslösung mit Na_2CO_3 alkalisiert, bekommt man ein Gemisch, bei dem die Menge des Didansylderivates weit überwiegt.

Isolierung und Kristallisation der Derivate haben Schwierigkeiten bereitet. Trennung und Reinigung wurden mittels Säulen- und Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Kristallisation geschah in Methanol nach Zugabe von Wasser, Eis oder Trockeneis. Zur Strukturklärung wurden physikalische und chemische Methoden eingesetzt. Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen gaben in allen Fällen gute Ergebnisse. In den Massenspektren bekommt man von allen Derivaten ähnliche Bruchstücke, die zeigen, daß der Zerfall der untersuchten Substanzen gleichartig verläuft. Nur waren die Mengen der Spaltstücke unterschiedlich, was von den verschiedenen Versuchstemperaturen abhängt. Ephedrin wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen untersucht, weil Schwierigkeiten bestanden, solche Bedingungen zu finden, die es ermöglichten, das ganze Spektrum zu bekommen.

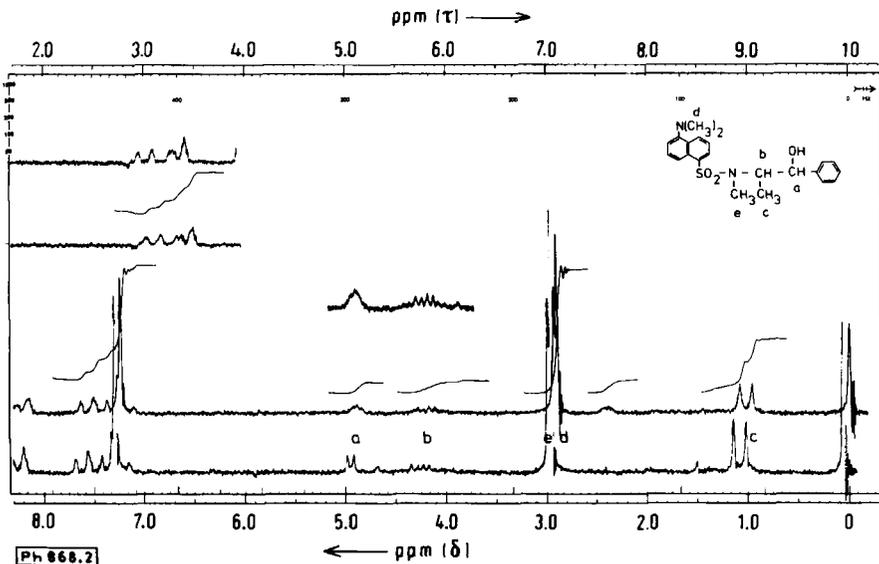


Abb. 2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Dansylderivats von Ephedrin in CDCl_3 . TMS $\delta = 0,00$ ppm

Bei Tyramin und Sympatol[®], wo jeweils zwei Derivate entstehen (Di- und Monodansyl-derivate), wurde mit *Folin-Ciocalteu*-Reagens geprüft. Die Reaktion war beim Monodansyl-derivat positiv, es lag also ein N-Monodansyl-derivat mit freier phenolischer Hydroxylgruppe vor.

In den ¹-H-NMR-Spektren sieht man die Signale der Protonen der Naphthalin- und Benzolringe zwischen ca. δ 8,50–7,00 ppm und die der Protonen der N(CH₃)₂-Gruppe bei ca. δ 2,90 ppm. Das Signal des Protons am C-Atom neben dem aromatischen Ring ist in Bezug zum Proton des C-Atoms neben der Aminogruppe zum tieferen Feld verschoben.

In den IR-Spektren liegen starke Banden von SO₂-Gruppen zwischen 1350–1310 cm⁻¹ und 1160–1120 cm⁻¹, der SO₂-C-Gruppe zwischen 1420–1330 cm⁻¹ und 1200–1145 cm⁻¹, der SO₂-N-Gruppe zwischen 1180–1160 cm⁻¹. Wenn man die Spektren von Di- und Monodansyl-derivaten vergleicht, bemerkt man, daß das Didansyl-derivat zwischen 1400–1300 cm⁻¹ und 1200–1100 cm⁻¹ dem Spektrum des Dansyl-derivates von 4-Äthylphenolamin (starke Bande der SO₂-O-Gruppe) ähnelt. Das Spektrum des Monodansyl-derivates hat Ähnlichkeit mit dem des Dansyl-derivates des β -Phenyläthylamins, so daß auch daraus auf ein N-Dansyl-derivat geschlossen werden kann.

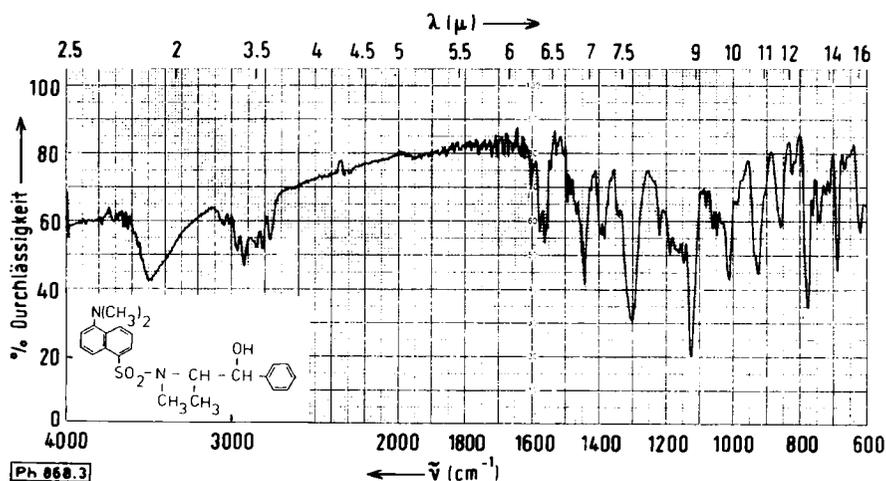


Abb. 3: IR-Spektrum des Dansyl-derivats von Ephedrin in KBr

In den UV-Spektren, Erregungs- und Fluoreszenzspektren gibt es keine großen Unterschiede in der Lage der Maxima bei den verschiedenen Derivaten.

Experimenteller Teil

Massenspektren: Varian CH 7 (70 eV). – **¹NMR-Spektren:** Varian A-60 (TMS als inn. Stand.). – **IR-Spektren:** Beckman IR 20 A-X und Unicam SP 1000. – **Elektronenspektren:** Beckman DB-GT. – **Elementaranalysen:** Alfred Bernhardt, Elbach, und Ilse Beetz, Kronach. – **Mol.-Gew.-Bestimmung:** Bernhardt, Elbach, nach Rast oder im Tübinger Institut osmometrisch. – **Fluorimetrie:** Fluorospektralphotometer 203 Hitachi Perkin-Elmer. – **DC:** DC-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator, Merck. – **Präp. Schichtchromatographie:** PSC-Fertigplatte Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck. – **Schmelzpunkte:** Kofler-Heiztisch-Mikroskop „RCH“ (unkorrigiert).

Dansylderivat des Ephedrins

1,0 g Ephedrinhydrochlorid wird in 60 ml Wasser und 1,34 g Dansylchlorid werden in 60 ml Aceton gelöst. Dem Aceton werden 200 mg NaHCO₃ beige mischt. Die wäßrige Lösung wird unter Schütteln in kleinen Mengen zur Acetonlösung hinzugefügt. Man führt die Reaktion im Dunkeln und bei Raumtemp. durch. Nach 2 Std. wird das Reaktionsgemisch dreimal mit je 30 ml Benzol ausgeschüttelt, die organische Lösung mit Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der gelbe, ölige Rückstand wird mit präp. Platten gereinigt. Das gereinigte Derivat wird in Methanol gelöst. Nach Zusatz von Eis fällt ein Niederschlag aus. Schmp. 51–53°. Ausb. 20 % d. Th.
 C₂₂H₂₆N₂O₃S Ber.: C 66,30 H 6,34 N 7,03 O 12,04 S 8,04, Mol.-Gew.: 398; Gef.: C 65,40 H 6,36 N 7,13 O 12,51 S 8,18 Mol.-Gew.: 386 (nach Rast). DC: Cyclohexan/Essigsäureäthylester 2 + 1, Rf = 0,37. MS (Probentemp. 50° und 62°): 398 (22,7), 292 (35,1), 262 (37,1), 234 (47,6), 223 (74,2), 170 (1,5), 119 (48,5), 51 (2,4), 41 (74,2). UV-Spektrum (Methanol): Max. 252, 338 nm. Erregungsspektrum: Max. 360 nm; Fluoreszenzspektrum: Max. 480 nm (Benzol).

Dansylderivat des β-Phenyläthylamins

Das Derivat wird wie das des Ephedrins dargestellt. Der ölige Rückstand wird in Äthanol gelöst und über eine Al₂O₃-Säule (basisch) gereinigt. Nach Einengen der Äthanolösung wird tropfenweise Wasser hinzugefügt, wobei sich die Lösung trübt. Nach einiger Zeit fallen farblose Kristalle aus, die nochmals in gleicher Weise umkristallisiert werden. Ausb. 55,2 % d. Th., Schmp. 107–108°.

C₂₀H₂₂N₂O₂S Ber.: C 67,77 H 6,26 N 7,90 O 9,03 S 9,04, Mol.-Gew.: 354,5. Gef.: C 67,65 H 6,12 N 7,95 O 9,09 S 8,96, Mol.-Gew.: 386 (nach Rast). DC: Cyclohexan/Essigsäureäthylester 2 + 1, Rf = 0,41. MS (Probentemp. 98°) 354 (24,2), 262 (14,2), 234 (12,1), 186 (8,7), 170 (100), 126 (91,7), 91 (22,9), 44 (16,7). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 8,66–6,83 (arom. H), 4,83 (NH), 3,13 (CH₂ neben NH), 2,90 (N(CH₃)₂), 2,67 (CH₂ neben arom. Ring). IR (KBr): 3320 (NH), 2960–2850 (CH₂), 2800 (N-CH₃), 1620, 1595, 1510 (arom. Ring), 1580 (C-N), 1320, 1150 (SO₂), 1165 cm⁻¹ (SO₂-N). UV (Methanol): Max. 250, 340 nm. Erregungsspektrum: Max. 350 nm, Fluoreszenzspektrum: Max. 475 nm (Benzol).

Dansylderivat des 4-Äthylphenols

Die Lösung wird mit Na₂CO₃ alkalisiert, die Reaktion sonst wie oben durchgeführt. Der ölige Rückstand wird in Äthanol gelöst und über eine Al₂O₃-Säule gereinigt. Zu der konzentrierten Lösung wird tropfenweise Wasser hinzugefügt, wobei sich die Lösung trübt und sich nach einiger Zeit gut kristallisierende, gelbe Nadeln bilden. Ausb. 48 % d. Th., Schmp. 65–66°.

C₂₂H₂₁N₃S Ber.: C 67,57 H 5,96 N 3,95 O 13,50 S 9,02, Mol.-Gew.: 355,5; Gef.: C 67,42 H 5,83 N 4,04 O 13,71 S 8,85, Mol.-Gew.: 361 (nach Rast). DC: Benzol/Triäthylamin 10 + 1, Rf = 0,65. MS (Probentemp. 30°): 355 (90,5), 234 (17,5), 186 (21,3), 171 (100), 107 (16,7)

77 (24,3), 65 (13,6), 51 (13,6), 44 (28,2), 39 (18,4). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 8,96–6,67 (arom. H), 2,91 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,53 (CH_3), 1,11 (CH_3). IR (KBr): 2960–2850 (CH_2 , CH_3), 2820 (N-CH_3), 1620, 1595, 1510 (arom. Ring), 1580 (C-N), 1370, 1200–1145 ($\text{SO}_2\text{-O}$), 1360, 1160–1120 cm^{-1} (SO_2). UV (Methanol): Max 258, 340 nm. Erregungsspektrum: Max. 360 nm, Fluoreszenzspektrum Max. 500 nm (Benzol).

Dansylderivate des Tyramins

Bei Tyramin reagiert je nach pH-Wert Amino- und/oder Phenolgruppe mit Dansylchlorid. Zuerst wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Bildung der verschiedenen Derivate überprüft. 100 mg Tyraminhydrochlorid werden in 20 ml Wasser und 387 mg Dansylchlorid in 20 ml Aceton gelöst. 10 ml der wäßrigen Tyramin-Lösung wurden in 10 ml der Acetonlösung gegossen. Ein Ansatz wurde mit NaHCO_3 (ca. pH 8), ein zweiter mit Na_2CO_3 (ca. pH 10) gesättigt.

Die Reaktion wurde mit 10-fachen Mengen bei pH 8 durchgeführt. Man extrahierte das Reaktionsgemisch zweimal mit je 50 ml Essigsäureäthylester. Die organische Lösung wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft. Die Trennung der Substanzen I und II erfolgt sc (Benzol/Triäthylamin 10 + 1). I wurde zuerst von der Säule eluiert, das Lösungsmittel abgedampft und das zurückgebliebene Öl in Äthanol gelöst. Die Lösung wurde mit Eis gekühlt und in eiskaltes Wasser gegossen. Es fiel ein feiner Niederschlag aus. Schmp. 74–75°. II muß mittels präp. Platten gereinigt werden (Benzol/Triäthylamin 10 + 1). Es wurde 2 mal chromatographiert. Das Dansylderivat wurde mit Aceton vom Kieselgel eluiert, das Aceton abgedampft, der Rückstand in Äthanol gelöst, mit Eis gekühlt und Eis hineingegeben. Es entstand eine harte Masse, die i. Vak. getrocknet wurde. Schmp. 45–46°.

N,O-Didansylderivat (Substanz I)

$\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$ Ber.: C 63,54 H 5,65 N 6,98 O 13,35 S 10,50 Mol.-Gew.: 603,4. Gef.: C 63,68 H 5,47 N 6,97 O 13,27 S 10,61, Mol.-Gew.: 593 (osm.). DC: Benzol/Triäthylamin 10 + 1, Rf = 0,28. MS (Probentemp. 195°): 603 (4,7), 370 (2,6), 263 (2,1), 234 (2,1), 186 (2,1), 171 (18,4), 127 (4,2), 107 (4,2), 77 (3,2), 44 (100), 39 (4,7). $^1\text{H-NMR}$ (Deuteroaceton): δ (ppm) = 8,80–7,20 (H vom Naphthalin), 6,81 (H vom Benzolring), 3,21 (CH_2 neben arom. Ring), 2,97 und 2,90 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2,68 (CH_2 neben NH). IR (KBr): 3300 (NH), 2950–2840 (CH_2), 2800 (N-CH_3), 1600, 1580, 1500 (arom. Ring), 1565 (C-N), 1350 und 1190 ($\text{SO}_2\text{-O}$), 1310 und 1135 (SO_2), 1170 cm^{-1} ($\text{SO}_2\text{-N}$). UV (Methanol): Max. 252, 342 nm. Erregungsspektrum: Max 355 nm; Fluoreszenzspektrum: Max. 500 nm (Benzol).

N-Monodansylderivat (Substanz II)

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ Ber.: C 64,80 H 6,04 N 7,45 O 12,99 S 8,66, Mol.-Gew. 370,3. Gef.: C 64,86 H 5,95 N 7,57 O 12,97 S 8,65, Mol.-Gew.: 355 (osm.). DC: Benzol/Triäthylamin 10 + 1, Rf = 0,05. MS (Probentemp. 75°): 354 (8,4), 263 (4,4), 186 (4,4), 126 (4,4), 121 (6,0), 77 (15,6), 65 (7,2), 51 (9,2), 43 (100), 39 (22,4). $^1\text{H-NMR}$ (Deuteroaceton): δ (ppm) = 8,83–7,25 (H vom Naphthalin), 6,78 (H von Benzol), 3,15 (CH_2 neben arom. Ring), 2,90 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2,53 (CH_2 neben NH). IR (KBr): 3600–3200 (OH, NH), 2960–2840 (CH_2), 2800 (N-CH_3), 1610, 1590, 1515 (arom. Ring), 1570 (N-C), 1300, 1140 cm^{-1} (SO_2). UV (Methanol): Max. 250, 335 nm. Erregungsspektrum: Max. 350 nm; Fluoreszenzspektrum: Max. 475 nm (Benzol).

Dansylderivate des Sympatols[®]

Weil die Sympatol[®]-Base in Aceton nicht löslich ist, wurde ein Dioxan-Wassergemisch (1+1) verwendet. 325 mg Sympatol[®]-Base wurden in 75 ml Wasser gelöst und die Lösung in kleinen

Mengen zu einer Lösung von 1,75 g Dansylchlorid in Dioxan, gesättigt mit NaHCO_3 , gegeben. Die entstehenden Substanzen I und II wurden sc getrennt. Fließmittel: Chloroform/Essigsäure 98 % / Wasser (5 + 1 + 1). Die gewonnene, relativ saubere Substanz I wurde in Methanol gelöst und über eine Al_2O_3 -Säule gereinigt. Zur eluierten Methanollösung wurde Wasser in kleinen Mengen hinzugefügt, bis sich die Lösung trübte. Nach einiger Zeit fiel ein sehr feines, pulverartiges Derivat aus. Schmp. von I: 76–78°. II läßt sich nur sehr langsam von der Säule eluieren. Die Fraktion wurde mit präp. Platten gereinigt (Benzol/Triäthylamin 10 + 1). Es wurde dreimal chromatographiert und das Dansylderivat mit Methanol vom Kieselgel eluiert. Die eingeengte Lösung wurde mit Trockeneis versetzt, worauf eine pulverartige Substanz ausfiel, Schmp. 67–70°.

N,O-Didansylderivat (Substanz I)

$\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ Ber.: C 62,53 H 5,58 N 6,63 O 15,15 S 10,12, Mol.-Gew.: 633,8. Gef.: C 62,60 H 5,72 N 6,52 O 14,98 S 10,00, Mol.-Gew.: 609 (nach Rast). DC: Benzol/Triäthylamin 10 + 1, Rf = 0,25. MS (Probestemp. 225°): 634 (14,6), 399 (5,9), 365 (5,9), 307 (4,3), 276 (3,4), 263 (9,2), 234 (11,1), 186 (12,7), 170 (100), 167 (14,3), 127 (14,3), 121 (7,9), 51 (7,9), 44 (1,5). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 8,72–6,75 (H von arom. Ringen), 4,83 (CH), 3,25 (CH_2), 2,93 (N- CH_3), 2,90 (N(CH_3) $_2$). IR (KBr): 3500 (OH), 2980–2850 (CH, CH_2), 2800 (N- CH_3), 1620, 1590, 1510 (arom. Ring), 1580 (C-N), 1370, 1200–1145 (SO_2 -O), 1340–1310, 1160–1120 (SO_2), 1175 cm^{-1} (SO_2 -N). UV (Methanol): Max 254, 340 nm. Erregungsspektrum: Max. 355 nm; Fluoreszenzspektrum: Max. 495 nm (Benzol).

N-Monodansylderivat (Substanz II)

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ Ber.: C 60,26, H 6,26 N 6,69 O 19,11, S 7,66, Mol.-Gew.: 400,5. Gef.: C 59,90 H 6,50 N 6,90 O 18,03 S 7,48, Mol.-Gew.: 404 (osm.). DC: Benzol/Triäthylamin 10 + 1, Rf = 0,05. MS (Probestemp. 130°): 400 (6,9), 382 (6,9), 234 (22,2), 170 (26,4), 166 (43,0), 44 (100), 39 (7,6). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,58–6,57 (H von arom. Ringen), 4,78 (CH), 3,37 (CH_2), 2,90 (N- CH_3), 2,88 (N(CH_3) $_2$). IR (KBr): 3400 (OH), 2960–2860 (CH, CH_2), 2800 (N- CH_3), 1610, 1590, 1510 (arom. Ring), 1570 (C-N), 1300, 1130 cm^{-1} (SO_2). UV (Methanol): Max. 252, 337 nm. Erregungsspektrum: Max. 395 nm; Fluoreszenzspektrum: Max 480 nm (Benzol).