

4 Experimenteller Teil

4.1 Chemikalien

Alle für die Synthesen benötigten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Lancaster, ABCR, Acros, Fluka und Merck bezogen. Das bei der Säulenchromatographie verwendete Kieselgel 60-200 stammt von der Firma Merck.

4.2 Geräte

Bestimmung der Schmelzpunkte:

Linström-Gerät (unkorrigiert)

Bei der Beobachtung einer Zersetzung ist die Temperatur angegeben, bei der dieser Vorgang beginnt und mit dem Zusatz (Zers.) hinter der angegebenen Temperatur versehen.

Gelöscht: d

Elementaranalysen:

Perkin-Elmer Elementar vario EL.

IR-Spektren:

Perkin-Elmer 1420 Ratio Recording infrared Spectrophotometer.

Die Frequenzangaben erfolgen in cm^{-1} , die Angabe breiter Banden erfolgt unter dem Zusatz "br" hinter der Wellenzahl.

Kernresonanzspektren:

Bruker AC-300 und Bruker AVANCE DPX 400 in den angegebenen Lösungsmitteln mit TMS als internen Standard, die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm nach der δ_{TMS} -Skala.

Es gelten folgende Abkürzungen:

Singulett (s), Dublett (d), Dublett vom Dublett (dd), Triplett (t), Dublett vom Dublett vom Dublett (ddd), Multiplett (m).

nJ – Betrag der Kopplungskonstanten über n Bindungen. Ist der Kopplungspartner kein Proton, sondern ein Kern X, so werden in Klammern die Kopplungspartner angegeben.

Die Interpretation erfolgt nach den Regeln für Spektren erster Ordnung [109].

Massenspektren:

EI-MS: CH-7A-Varian MAT (70 eV)

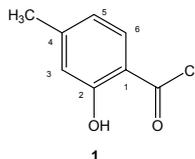
FAB-MS: CH-5-DF-MAT-Varian (80 eV) in den angegebenen Lösungsmitteln, Reaktandgas:
Xenon.

Dünnschichtchromatographie:

DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten der Firma Merck

4.3 Synthesevorschriften und analytische Daten

4-Methylsalicylsäurechlorid (1)



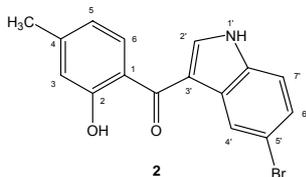
4,00 g (0,03 mol) 4-Methylsalicylsäure werden mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt, unter Feuchtigkeitsausschluss bei 70°C 90 Minuten rückfließend erhitzt und das überschüssige Thionylchlorid anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

1: Graues Öl, Ausbeute: 4,00 g (78,14%), C₈H₇ClO₂ (170,63)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,22 (s, 1H, OH), 7,69 (d, 1H, ³J=7,91 Hz, H3), 6,74 (m, 2H, H5, H6), 2,28 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 35°C): m/z 170 (M⁺, 27,05%, ³⁵Cl).

(5-Bromo-1H-indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methylphenyl)-methanon (2)



In ein Gemisch aus 0,25 g Magnesiumspänen und etwas Iod werden 1,2 mL Iodmethan, gelöst in 5 mL Diethylether, tropfenweise unter Eiskühlung hinzugefügt und die Mischung 15 Minuten lang gerührt. Anschließend werden 0,50 g (0,03 mol) 5-Bromindol in 15 mL Diethylether aufgenommen und unter Eiskühlung tropfenweise zu der Mischung gegeben. Nach 15 Minuten erfolgt die Zugabe von 15 mL Diethylether, und es werden 0,68 g (0,004 mol) 4-Methylsalicylsäurechlorid (1) portionsweise hinzu gegeben. Nachdem die Mischung 60 Minuten rückfließend bei 70°C erhitzt wurde, wird sie auf Eis gegossen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Das erhaltene Rohprodukt wird durch SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)] gereinigt, und der dabei erhaltene Rückstand in absolutem Ethanol resuspendiert und abgesaugt.

Gelöscht: eine wenig

Gelöscht: in den Reaktionsansatz

2: Hellgelbes Pulver, Smp. 201 °C, Ausbeute: 0,038 g (3,84%), C₁₆H₁₂BrNO₂ (330,17)

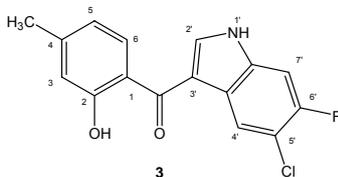
CHN: ber.: C 58,20 H 3,66 N 4,24 gef.: C 58,21 H 3,75 N 4,31

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3273,86 br (OH), 3120,15 (NH), 3036,48 (CH arom.), 2923,28 (CH₃), 636,37 (C-Br)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,30 (s, 1H, NH), 11,17 (s, 1H, OH), 8,31 (d, 1H, ⁴J=1,53 Hz, H4'), 8,07 (s, 1H, H2'), 7,60 (d, 1H, ³J=7,81 Hz, H7'), 7,49 (d, 1H, ³J=8,67 Hz, H6), 7,38 (dd, 1H, ³J=8,52 Hz ⁴J=1,64 Hz, H6'), 6,81 (d, 1H, ⁴J=5,90 Hz, H3), 6,76 (d, 1H, ³J=8,22 Hz, H5), 2,30 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 150°C): m/z 329,1 (M⁺, 40,39%).

(5-Chloro-6-fluoro-1H-indol-3-yl)(2-hydroxy-4-methylphenyl)-methanon (3)



1,2 mL Iodmethan werden in 5 mL Diethylether gelöst und tropfenweise zu einer Mischung aus 0,25 g Magnesiumspänen und etwas Iod unter Eiskühlung hinzugefügt. Dieses Gemisch wird anschließend 15 Minuten lang weiterhin unter Kühlung gerührt. Danach werden 0,50 g (0,03 mol) 5-Chlor-6-fluorindol (**10**), die zuvor in 15 mL Diethylether gelöst wurden, tropfenweise hinzugefügt und die Reaktionsmischung weitere 15 Minuten gerührt. Nach der Zugabe von 15 mL Diethylether werden bei RT 0,68 g (0,004 mol) 4-Methylsalicylsäurechlorid (**1**) anteilig hinzu gegeben und die Mischung 60 Minuten bei 70°C rückfließend erhitzt. Anschließend wird sie auf Eis gegossen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt durch SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)] mit anschließender Suspension in absolutem Ethanol.

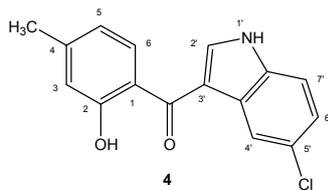
3: Hellgelbes Pulver, Smp. 213°C, Ausbeute: 0,016 g (1,76%), C₁₆H₁₀ClFNO₂ (303,70)

CHN: ber.: C 63,27 H 3,65 N 4,61 gef.: C 63,12 H 3,95 N 4,81

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3432,31 br (OH), 3274,80 (NH), 3048,52 (CH arom.), 2954,88 (CH₃)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,32 (s, 1H, NH), 11,10 (s, 1H, OH), 8,26 (d, 1H, ⁴J=7,55, H4'), 8,09 (s, 1H, H2'), 7,58 (d, 1H, ⁴J=7,9 Hz, H3), 7,52 (d, 1H, ³J=6,92 Hz, H7'), 6,81 (d, 1H, ³J=6,87 Hz, H5), 6,78 (d, 1H, ³J=7,96 Hz, H6), 2,31 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 120°C): m/z 303 (M⁺, 69,84%, ³⁵Cl).

(6-Chloro-1*H*-indol-3-yl)(2-hydroxy-4-methylphenyl)methanon (4)

0,25 g Magnesiumspäne und etwas Iod werden nach und nach mit einer Mischung aus 1,2 mL Iodmethan in 5 mL Diethylether unter Eiskühlung versetzt und 15 Minuten lang gerührt. Anschließend werden die zuvor in 15 mL Diethylether gelösten 0,50 g (0,03 mol) 6-Chlorindol tropfenweise hinzugefügt, und es wird weitere 15 Minuten lang gerührt. Nachdem die Reaktionsmischung mit 15 mL Diethylether ergänzt wurde, werden bei RT 0,68 g (0,004 mol) 4-Methylsalicylsäurechlorid (**1**) portionsweise hinzu gegeben und die Mischung 60 Minuten bei 60°C rückfließend erhitzt. Dann wird diese auf Eis gegossen, mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet.

Nach Entfernen des überschüssigen Lösemittels im Vakuum wird das Rohprodukt säulenchromatographisch [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)] aufgereinigt und der verbleibende Rückstand mit absolutem Ethanol gewaschen.

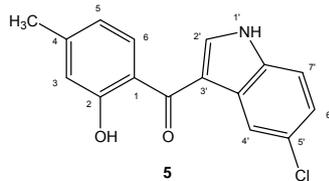
4: Hellgelbes Pulver, Smp. 213°C, Ausbeute: 0,031 g (3,62%), C₁₆H₁₂ClNO₂·0,5 H₂O (285,82*9,01)

CHN: ber.: C 66,21 H 4,25 N 4,83 gef.: C 66,02 H 4,45 N 4,47

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3414,73 br (OH), 3296,99 (NH), 3053,16 (CH aromat.), 2964,23 (CH₃)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,10 (s, 1H, NH), 11,15 (s, 1H, OH), 8,11 (d, 1H, ³J=8,53 Hz, H4'), 8,02 (s, 1H, H2'), 7,58 (d, 1H, ⁴J=7,88 Hz, H3), 7,54 (d, 1H, ⁴J=1,81 Hz, H7'), 7,22 (dd, 1H, ³J=8,53 Hz, ⁴J=1,53 Hz, H5'), 6,80 (d, 1H, ³J=6,26 Hz, H5), 6,73 (d, 1H, ³J=8,02 Hz, H6), 2,31 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 200°C): m/z 285 (M⁺, 48,42%, ³⁵Cl).

(5-Chloro-1*H*-indol-3-yl)(2-hydroxy-4-methylphenyl)methanon (5)

Eine Mischung aus 1,2 mL Iodmethan und 5 mL Diethylether wird tropfenweise unter Eiskühlung auf 0,25 g Magnesiumspäne und etwas Iod gegeben. Nach 15 Minuten werden 0,50 g (0,03 mol) 5-Chlorindol, die zuvor in 15 mL Diethylether gelöst wurden, nach und nach hinzugefügt und die Reaktionsmischung wieder 15 Minuten lang gerührt. Anschließend erfolgt bei RT die anteilige Zugabe von 0,68 g (0,004 mol) 4-Methylsalicylsäurechlorid (1). Die Mischung wird 60 Minuten bei 70°C erhitzt, auf Eis gegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Gelöscht: in wenig

Gelöscht: -minütigem Rühren

Das Rohprodukt wird durch SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)] gereinigt und der verbleibende Rückstand mit absolutem Ethanol gewaschen.

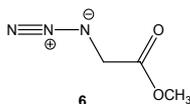
5: Hellgelbes Pulver, Smp. 188°C, Ausbeute: 0,0067 g (0,78%), C₁₆H₁₂ClNO₂ (285,71)

CHN: ber.: C 67,26 H 4,23 N 4,90 gef.: C 67,18 H 4,53 N 4,66

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3432,69 br (OH, NH), 2954,59 (CH arom.), 1452,71 (CH₃)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,21 (s, 1H, NH), 11,11 (s, 1H, OH), 8,15 (d, 1H, ³J=1,96 Hz, H7'), 8,05 (s, 1H, H2'), 7,59 (d, 1H, ⁴J=7,94 Hz, H3), 7,49 (d, 1H, ⁴J=8,64 Hz, H4'), 7,26 (dd, 1H, ³J=8,60 Hz, ⁴J=1,89 Hz, H6'), 6,81 (d, 1H, ⁴J=6,18 Hz, H5), 6,78 (d, 1H, ³J=8,05 Hz, H6), 2,31 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 250°C): m/z 285 (M⁺, 50,23%, ³⁵Cl).

Methylazidoacetat (6)

Zu einer Suspension aus 44 g (0,68 mol) Natriumazid in 500 mL *N,N*-Dimethylformamid werden 65 mL Methylbromacetat hinzugefügt und die Mischung 16 Stunden lang bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in Eiswasser gegeben und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und Salzwasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum eingengt.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der Vakuumdestillation.

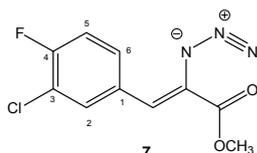
6: Farbloses Öl, Ausbeute: 64,20 g (82,10%), C₃H₅N₃O (115,10)

IR (Film): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 2958,33 (CH₂), 2850,83 (OCH₃), 2111,67 (N₃), 1751,10 (C=O)

¹H-NHR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 3,92 (s, 2H, CH₂), 3,78 (s, 3H, OCH₃)

MS (EI, 30°C): m/z 115 (M⁺, 50,55%).

Methyl- α -azido-3-chlor-4-fluorcinnamat (7)



Unter Eiskühlung und Rückfluss werden zunächst 1,35 g (0,059 mol) Natrium in 30 mL Methanol gelöst und anschließend langsam unter Eiskühlung langsam in eine Mischung aus 4,65 g (0,029 mol) 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyd und 6,75 g (0,059 mol) Methylazidoacetat (**6**) getropft und drei Stunden lang bei RT gerührt. Anschließend wird unter Eiskühlung mit 2N-HCl neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter Salzlösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel bei max. 40°C Wasserbadtemperatur im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wird mit Hilfe der SC [Ethylacetat/n-Hexan (1:3)] aufgereinigt.

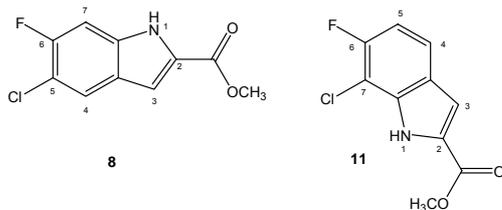
7: Farblose Kristalle, Smp. 58°C, Ausbeute: 4,55 g (60,7%), C₁₀H₇ClFN₃O₂ (255,86)

CHN: ber.: 46,98 H 2,76 N 16,44 gef.: C 47,05 H 2,80 N 16,36

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3064,76 (CH aromat.), 2960,17 (CH aliph.), 2850,10 (OCH₃), 2127,06 (N₃), 1709,85 (O=C-OCH₃)

¹H-NHMR([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 8,13 (dd, 1H, ³J=7,42 Hz, ⁴J=2,16 Hz, H2), 7,90 (m, 1H, H6), 7,47 (t, 1H, ³J=9,01 Hz, H5), 6,93 (s, 1H, -CH=), 3,78 (s, 3H, OCH₃)

MS (EI, 45°C): m/z 255 (M⁺, 6,76%, ³⁵Cl).

Methyl-5-chlor-6-fluor-indol-2-carboxylat (**8**) und Methyl-7-chlor-6-fluorindol-2-carboxylat (**11**)

2,38 g (0,0093 mol) Methyl- α -azido-3-chlor-4-fluorcinnamat (**7**) werden in 180 mL Xylen 90 Minuten bei 140°C rückfließend erhitzt. Die nach dem nahezu vollständigen Einengen des Lösemittels im Vakuum verbleibende Suspension wird über Nacht bei 8°C aufbewahrt. Dabei entsteht ein Gemisch der beiden Ester **8** und **11**, welche beide zusammen isoliert werden.

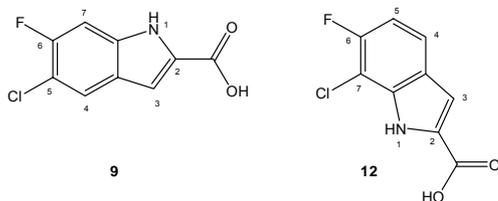
8, 11: Farblose Kristalle, Ausbeute: 1,80 g (85,0%), C₁₀H₇ClFNO₂ (227,72)

CHN: ber.: C 52,77 H 3,10 N 6,15 gef.: C 52,83 H 3,31 N 6,02

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3327,69 (NH), 3013,62 (CH arom.), 2839,11 (OCH₃), 1708,74 (C=O), 1291,91, 1260,26 (C-F), 1026,43, 766,10 (C-Cl)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,37 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O, **11**), 12,21 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O, **8**), 7,91 (d, 1H, ⁴J_{H-F}=7,47 Hz, H4, **8**), 7,67 (m, 1H, H4, **11**), 7,35 (d, 1H, ³J_{H-F}=9,87 Hz, H7, **8**), 7,29 (s, 1H, H3, **11**), 7,17 (t, 1H, ³J=9,20 Hz, H5, **11**), 7,15 (s, 1H, H3, **8**), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,87 (s, 1H, H3)

MS (EI, 60°C): m/z 227 (M⁺, 72,88%, ³⁵Cl).

5-Chlor-6-fluorindolcarbonsäure (**9**) und 7-Chlor-6-fluorindol-2-carbonsäure (**12**)

2,04 g (0,009 mol) Methyl-5-chlor-6-fluor-indol-2-carboxylat (**8**) werden in 90 mL Ethanol und 45 mL 2N-NaOH suspendiert und 120 Minuten bei RT gerührt. Das Ethanol wird im Vakuum entfernt, die verbleibende wässrige Suspension bis zum Erreichen eines sauren pH-Wertes mit 2N-HCl behandelt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wird ein Gemisch der beiden Carbonsäuren **9** und **12** isoliert.

9, 12: Farbloses Pulver, Ausbeute: 1,8 g (94,1%), C₉H₅ClFNO₂ (213,70)

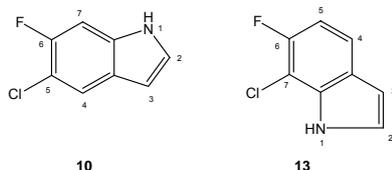
CHN: ber.: C 50,61 H 2,36 N 6,56 gef.: C 50,49 H 2,60 N 6,34

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3439,03 (NH), 3069,61 (COOH), 1679,65 (C=O), 1261,73, 1224,87 (C-F), 1020,47, 768,57 (C-Cl)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 13,10 (s, 1H, COOH, **9**, **12**), 12,18 (s, 1H, NH, austauschbar mit D_2O , **12**), 12,02 (s, 1H, NH, austauschbar mit D_2O , **9**), 7,88 (d, 1H, $^4J_{\text{H-F}}=7,48$, H4, **9**), 7,65 (m, 1H, H4, **12**), 7,34 (d, 1H, $^3J_{\text{H-F}}=9,94$ Hz, H7, **9**), 7,21 (s, 1H, H3, **12**), 7,13 (t, 1H, $^3J=9,07$ Hz, H5, **12**), 7,08 (s, 1H, H3, **9**)

MS (EI, 60°C): m/z 213 (M^+ , 55,96%, ^{35}Cl).

5-Chlor-6-fluorindol (**10**) und 7-Chlor-6-fluorindol (**13**)



1,92 g (0,009 mol) 5-Chlor-6-fluorindolcarbonsäure (**9**) werden in 45 mL Diphenylether suspendiert und bei 260°C rückfließend vier Stunden lang erhitzt. Anschließend wird der Diphenylether mit Hilfe der SC [n-Hexan] entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt auf derselben Säule durch SC [n-Hexan/Toluol (3+1)], wobei das Gemisch in die Verbindungen **10** und **13** aufgetrennt wird.

10: Farblose Kristalle, Smp. 83°C, Ausbeute.: 0,70 g (45,86%), $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClFN}$ (169,60)

CHN: ber.: C 56,66 H 2,97 N 8,26 gef.: C 56,67 H 3,06 N 8,15

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3390,06 (NH), 3042,34 (CH arom.), 1317,99, 1223,33 (C-F), 1098,20, 760,15 (C-Cl)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,32 (s, 1H, NH, austauschbar mit D_2O), 7,71 (d, 1H, $^4J_{\text{H-F}}=7,4$ Hz, H4), 7,41 (t, 1H, $J=5,70$ Hz, H2), 7,37 (d 1H, $J_{\text{H-F}}=10,22$ Hz, H7), 6,41 (t, 1H, $J=5,02$ Hz, H3)

MS (EI, 30°C): m/z 169 (M^+ , 100%, ^{35}Cl).

13: Hellbraune Kristalle, Smp.: 42°C, Ausbeute: 0,40 g (26,3%), $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClFN}$ (169,60)

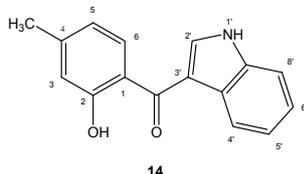
CHN: ber.: C 56,66 H 2,97 N 8,26 gef.: C 56,63 H 3,09 N 8,17

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3409,68 (NH), 3117,61 (CH arom.), 1328,90, 1233,63 (C-F), 1094,27, 799,61 (C-Cl)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,61 (s, 1H, NH, austauschbar mit D₂O), 7,53 (m, 1H, H₄), 7,42 (t, 1H, ³J=5,46 Hz, H₂), 7,04 (t, 1H, ³J=8,79 Hz, H₅), 6,54 (t, 1H, ³J=4,94 Hz, H₃)

MS (EI, 35°C): m/z 169,1 (M⁺, 100,0%).

(2-Hydroxy-4-methylphenyl)(1H-indol-3-yl)methanon (14)



Zu einem Gemisch aus 0,25 g Magnesiumspänen und etwas Iod wird eine Lösung aus 1,2 mL Iodmethan und 5 mL Diethylether tropfenweise unter Eiskühlung hinzugefügt und die Mischung 15 Minuten lang gerührt. Anschließend werden 1,00 g (0,0085 mol) Indol in 15 mL Diethylether aufgenommen und unter Eiskühlung tropfenweise hinzu gegeben. Nach 15 Minuten erfolgt die Zugabe von 15 mL Diethylether und 1,40 g (0,0082 mol) 4-Methylsalicylsäurechlorid (1). Nachdem die Mischung 60 Minuten lang rückfließend bei 70°C erhitzt wurde, wird sie auf Eis gegossen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt mittels SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)], und der dabei erhaltene Rückstand wird in absolutem Ethanol resuspendiert und abgesaugt.

Gelöscht: iner ein wenig

Gelöscht: -minütigem Rühren

Gelöscht: und der Zugabe von

Gelöscht: werden bei RT

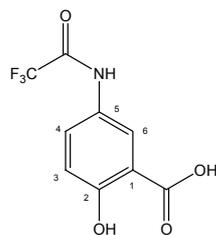
14: Hellgelbes Pulver, Smp.: 165°C, Ausbeute: 0,25 g (12,5 %), C₁₆H₁₃O₂N

CHN: ber.: C 76,47 H 5,21 N 5,57 gef.: C 76,39 H 5,44 N 5,50

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3257,74 (br OH, NH), 3092,47 (CH arom.), 2861, 49 (CH₃)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,17 (s, 1H, NH), 11,43 (s, 1H, OH), 8,21 (dd, 1H, ³J=8,46 Hz, ⁴J=1,48 Hz, H_{7'}), 8,06 (d, 1H, ⁴J=3,07 Hz, H_{2'}), 7,70 (d, 1H, ³J=7,88 Hz, H₃), 7,58 (dd, 1H, ³J=8,34 Hz, ⁴J=1,34 Hz, H_{4'}), 7,28 (m, 2H, H_{5'}, H_{6'}), 6,84 (m, 2H, H₆, H₅), 2,37 (s, 3H, CH₃)

MS (EI, 50°C): m/z 251,3 (M⁺, 33,22%).

2-Hydroxy-5-[trifluoracetyl]-amino]-benzoesäure (17)

17

Eine Lösung von 2,00 g (0,013 mol) 5-Aminosalicylsäure in 80 mL absolutem 1,4-Dioxan wird vorsichtig mit 10 mL Trifluoacetanhydrid versetzt und 30 Minuten lang bei RT gerührt. Nach Zugabe von 30 mL Wasser wird die Mischung weitere 60 Minuten bei RT gerührt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Der verbleibende Rückstand ist analysenrein.

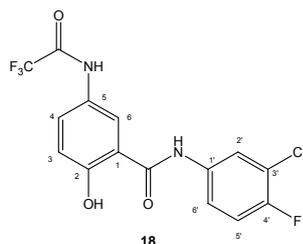
17: Farblose Kristalle, Smp. 260°C, Ausbeute: 3,03 g (92%), C₉H₆F₃NO₄ (249,14)

CHN: ber.: C 43,39 H 2,43 N 5,62 gef.: C 43,20 H 2,56 N 5,78

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3416 (OH_{säure}), 3291 (NH), 3107 (OH), 1702 (C=O_{säure}), 1637 (C=O_{Amid}) cm⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,21 (s, 2H, OH-2, NH-5, austauschbar mit D₂O), 8,15 (d, 1H, ⁴J=2,7 Hz, H6), 7,75 (dd, 1H, ³J=9,0 Hz, ⁴J=2,8 Hz, H4), 7,01 (d, 1H, ³J=9,0 Hz, H3), 3,40 (Mischpeak H₂O/COOH)

MS (EI, 105°C): m/z 249 (M⁺, 34,58%).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxy-5-[(2,2,2.-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (18)

18

2,00 g (0,008 mol) 2-Hydroxy-5-[trifluoracetyl]-amino]-benzoesäure (17) werden mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt und bei 70°C 90 Minuten lang unter Feuchtigkeitsausschluss rückfließend erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird im Vakuum entfernt,

der Rückstand in 150 mL 1,4-Dioxan gelöst und mit 1,16 g (0,008 mol) 3-Chlor-4-fluoranilin versetzt. Nachdem die Mischung 60 Minuten bei 80°C unter Rückfluss erhitzt wurde wird diese abgekühlt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird vollständig eingeeengt, der Rückstand in 100 mL Wasser aufgenommen, mit 10 mL 5N-HCl versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt.

Gelöscht: rotiert

Gelöscht: ausgeschüttelt

Der erhaltene Rückstand muss nach dem Trocknen nicht weiter aufgereinigt werden.

18: Farblose Kristalle, Smp. 242°C, Ausbeute: 2,10 g (69%), C₁₅H₉ClF₄N₂O₃ (376,69)

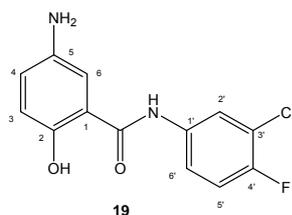
CHN: ber.: C 47,83 H 2,41 N 7,44 gef.: 47,87 H 2,67 N 7,49

IR (KBr): 3295 br (OH, NH), 1794, 1638 (C=O) cm⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,43 (s, 1H, OH, austauschbar mit D₂O), 11,24 (s, 1H, NH-5, austauschbar mit D₂O), 8,08 (d, 1H, ⁴J=2,7 Hz, H6), 8,06 (dd, 1H, ³J=6,9 Hz, ⁴J=2,6 Hz H4), 7,68, 7,63 (m, 2H, H2',H6'), 7,43 (t, 1H, ³J_{F,H}= 9,1Hz, H5'), 7,05 (d, 1H, ³J=8,8 Hz, H3)

MS (EI, 170°C): m/z 376 (M⁺, 28,1%, ³⁵Cl).

5-Amino-N-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (19)



1,20 g (0,003 mol) *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxy-5-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (**18**) werden in einer Mischung aus 80 mL Methanol und 10 mL Wasser gelöst. Nach Zugabe von 2,00 g (0,014 mol) K₂CO₃ wird die Lösung 120 Minuten unter Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum vertrieben. Der verbleibende Rückstand wird mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Gelöscht: ausgeschüttelt

Gelöscht: .

19: Hautfarbenes Pulver, Smp. 232-233°C, Ausbeute: 0,56 g (67%), C₁₃H₁₀ClFN₂O₂*0,5 H₂O (280,68*9,01)

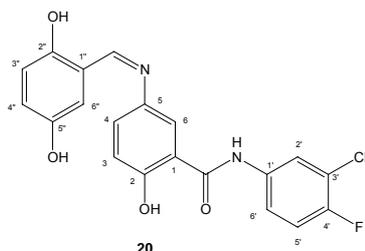
CHN: ber.: C 53,90 H 3,83 N 9,67 gef.: C 54,62 H 3,76 N 9,77

IR (KBr): 3363, 3232 br (OH,NH), 1661, 1602 (C=O, NH₂) cm⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 10,48 (s, 2H, OH, NH-1', austauschbar mit D₂O), 8,04 (dd, 1H, ³J=6,83 Hz, ⁴J=2,58 Hz, H2'), 7,61 (m, 1H, H6'), 7,41 (t, ³J_{F,H}=9,13 Hz, H5'), 7,09 (s, 1H, H6), 6,71 (m, 2H, H3, H4), 4,7 (s, 2H, NH₂)

MS (EI, 169°C): m/z 280 (M⁺, 22,2%, ³⁵Cl).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (**20**)



0,40 g (0,001 mol) 5-Amino-*N*-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (**19**) werden in 40 mL einer Mischung aus Ethanol und Eisessig (1+1) gelöst, mit 0,019 g (0,0014 mol) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd versetzt und 60 Minuten lang unter Rückfluss bei 120°C erhitzt. Das Ethanol wird im Vakuum entfernt, der Rückstand auf Eis gegossen und mit gesättigter Na₂CO₃-Lsg. auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Anschließend wird mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt durch SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)].

20: Orangefarbenes Pulver, Smp. 228°C (Zers.), Ausbeute.: 0,47 g (82%), C₂₀H₁₄ClFN₂O₄ (400,79)

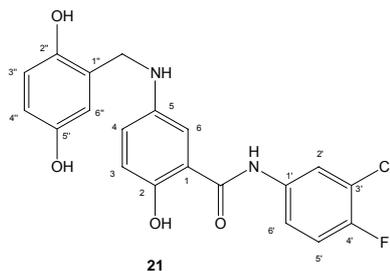
CHN: ber.: C 59,94 H 3,52 N 6,99 gef.: C 59,95 H 3,75 N 6,74.

IR (KBr): 3237 br (OH,NH), 1650, 1604 (C=O,C=N) cm⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,32 (s, 1H,OH-2, austauschbar mit D₂O), 11,66 (s, 1H, NH-1', austauschbar mit D₂O), 10,59 (s, 1H, OH-2'', austauschbar mit D₂O), 9,10 (s, 1H, O-5'', austauschbar mit D₂O), 8,93 (s, 1H, CH-1''), 8,05 (dd, 1H, ³J=6,8 Hz, ⁴J=2,44 Hz, H2'), 7,96 (d, 1H, ⁴J=2,44 Hz, H6), 7,68 (m, 1H, H6'), 7,60 (dd, 1H, ³J=8,69 Hz, ⁴J=2,48 Hz, H4), 7,46 (t, 1H, ³J_{F,H}=9,02 Hz, H5'), 7,07 (d, 1H, ³J=8,64 Hz, H3), 7,03 (d, 1H, ⁴J=2,68 Hz, H6''), 6,83 (m, 2H, H4'', H3'')

MS (EI, 240°C): m/z 400 (M⁺, 55,2%, ³⁵Cl).

Gelöscht: ¶

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-(2,5-dihydroxybenzylamino)-2-hydroxybenzamid (**21**)

Zu einer auf 5-10°C gekühlten Suspension aus 0,20 g (0,0005 mol) *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (**20**) in 5 mL Eisessig werden 0,03 g (0,0001 mol) Borandimethylaminkomplex, gelöst in 5 mL Eisessig, langsam hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wird die Mischung bei RT so lange gerührt, bis eine klare Lösung entsteht. Diese Lösung wird anschließend auf Eis gegossen. Durch Zugabe von 5N-NaOH wird ein pH-Wert von 6 eingestellt, und anschließend wird die Mischung mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet.

Gelöscht: und d

Gelöscht: Mit

Gelöscht: tronlauge

Gelöscht: auf

Gelöscht: ausgeschüttelt

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt mittels SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)].

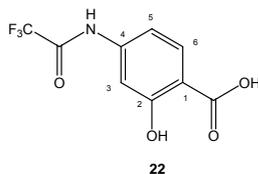
21: Farblose Kristalle, Smp. 206°C, Ausbeute: 0,15 g (74,6%), C₂₀H₁₆ClFN₂O₄ (402,79)

CHN: ber.: C 59,64, H 4,00 N 6,95 gef.: C 59,82 H 4,43 N 7,12

IR (KBr): 3364 br (OH,NH), 1649 (C=O) cm⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 10,57 (s, 1H, OH-2, austauschbar mit D₂O), 10,49 (s, 1H, NH-1', austauschbar mit D₂O), 8,78 (s, 1H, OH-2'', austauschbar mit D₂O), 8,56 (s, 1H, OH-5'', austauschbar mit D₂O), 8,03 (dd, 1H, ³J=6,84 Hz, ⁴J=2,46 Hz, H2'), 7,60 (m, 1H, H6'), 7,41 (t, ³J_{F,H}=9,17 Hz, H5'), 7,08 (d, 1H, ⁴J=2,00 Hz, H6), 6,76 (m, 2H, H3, H4), 6,64 (d, 1H, ⁴J=2,85 Hz, H6''), 6,60 (d, 1H, ³J=8,52 Hz, H3''), 6,43 (dd, ³J=8,45 Hz, ⁴J=2,69 Hz, H4''), 4,07 (d, 2H, CH₂)

MS (EI, 190°C): m/z 402 (M⁺, 0,7%, ³⁵Cl).

2-Hydroxy-4-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzoesäure (22)

2,00 g (0,013 mol) 4-Aminosalicylsäure werden in 80 mL absolutem 1,4-Dioxan gelöst und anschließend vorsichtig mit 10 mL Trifluoressigsäure versetzt. Nachdem die Reaktionsmischung 30 Minuten lang bei RT gerührt wurde, erfolgt die Zugabe von 30 mL Wasser. Anschließend wird die Mischung 60 Minuten lang gerührt, mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

Der nach Entfernen des überschüssigen Lösemittels und Trocknen verbleibende Rückstand ist analysenrein.

Gelöscht: die Verbindung 22.

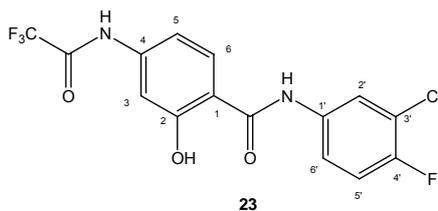
22: Schwach rosafarbene Kristalle, Smp. 247-248°C, Ausbeute: 2,99 g (92%), $\text{C}_9\text{H}_6\text{F}_3\text{NO}_4$ (249,14)

CHN: ber.: C 43,39 H 2,43 N 5,62 gef.: C 43,39 H 2,42 N 5,84

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3305 (NH), 3128 br (OH), 1697, 1636 (C=O) cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,44 (s, 2H, OH-2, NH-4, austauschbar mit D_2O), 7,81 (d, 1H $^3J=8,8$ Hz, H5), 7,36 (d, 1H, $^4J=1,6$ Hz, H3), 7,25 (d, 1H, $^3J=8,8$ Hz, H6), 3,35 (Mischpeak $\text{H}_2\text{O}/\text{COOH}$)

MS (EI, 140°C): m/z 249 (M^+ , 50,4%).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxy-4-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (23)

2,00 g (0,008 mol) 2-Hydroxy-4-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzoesäure (22) werden mit einem Überschuss an Thionylchlorid 90 Minuten lang bei 70°C unter Feuchtigkeitsausschluss erhitzt. Nach dem Entfernen des überschüssigen Lösemittels wird der verbleibende Rückstand in 150 mL 1,4-Dioxan gelöst, mit 1,16 g (0,008 mol) 3-Chlor-4-fluor-anilin versetzt und 60 Minuten lang bei 80°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die

Gelöscht: in

Mischung filtriert und das Filtrat vollständig eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 10 mL 5N-HCl angesäuert und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird mittels SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)] aufgereinigt.

23: Hautfarbenes Pulver, Smp. 242°C, Ausbeute: 1,77 g (83%), C₁₅H₉ClFN₂O₃ (376,86)

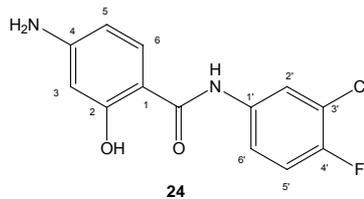
CHN: ber.: C 47,83 H 2,41 N 7,44 gef.: C 47,73 H 2,50 N 7,10

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3308,13 br (OH, NH), 1713,45, 1543,38, (C=O)

¹H-NMR: ([D₆] DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,83 (s, 1H, OH), 11,42 (s, 1H, NH-4), 10,45 (s, 1H, NH-1'), 8,04 (dd, 1H, ³J=6,69 Hz, ⁴J=2,49 Hz, H5), 7,91 (d, 1H, ³J=8,70 Hz, H6), 7,64 (m, 1H, H2'), 7,48 (d, 1H, ⁴J=1,60 Hz, H3), 7,42 (t, 1H, ³J_{F,H}=9,09 Hz, H5'), 7,25 (dd, 1H, ³J=8,24 Hz, ⁴J=1,89 Hz, H6')

MS (EI, 150°C): m/z 376 (M⁺, 12,57%, ³⁵Cl).

4-Amino-N-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (24)



In einer Mischung aus 80 mL Methanol und 10 mL Wasser werden 1,20 g (0,003 mol) *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxy-4-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (**23**) gelöst und mit 2,00 g (0,014 mol) K₂CO₃ versetzt. Die Reaktionsmischung wird 120 Minuten lang rückfließend erhitzt und das überschüssige Lösemittel anschließend im Vakuum vertrieben. Der verbleibende Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wird anschließend getrocknet.

Gelöscht: aliumcarbonat

Gelöscht: anschließend

Der verbleibende Rückstand wird getrocknet.

24: Hautfarbenes Pulver, Smp. 222°C, Ausbeute.: 0,68 g (81%), C₁₃H₁₀ClFN₂O₂ (280,85)

CHN: ber.: C 55,63 H 3,59 N 9,98 gef.: C 55,61 H 3,77 N 9,87

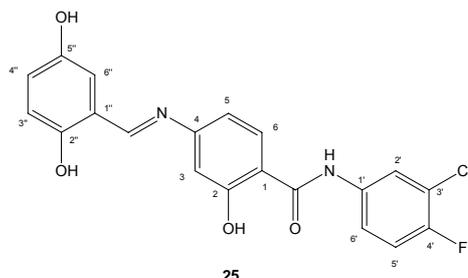
IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3499,50, 3401,50 (OH;NH), 1588,99 (C=O)

$^1\text{H-NMR}$: ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,12 (s, 1H, NH-1'), 10,03 (s, 1H, OH), 7,95 (dd, 1H, $^3J=6,89$ Hz, $^4J=2,54$ Hz, H2'), 7,69 (d, 1H, $^3J=8,71$ Hz, H6), 7,60 (m, 1H, H6'), 7,39 (t, 1H, $^3J_{\text{F,H}}=9,10$ Hz, H5'), 6,14 (dd, 1H, $^3J=8,78$ Hz, $^4J=2,07$ Hz, H5), 6,03 (d 1H, $^4J=2,08$ Hz, H3), 5,90 (s, 2H, NH₂)

MS (EI, 260°C): m/z 280 (M^+ , 30,05%).

Gelöscht: ¶

N -(3-Chlor-4-fluorphenyl)-4-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (25)



Nachdem 0,40 g (0,001 mol) 4-Amino- N -(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (**24**) in einer Mischung aus Ethanol und Eisessig (1+1) gelöst wurden, wird die Reaktionsmischung mit 0,19 g (0,0014 mol) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd ergänzt. Die Mischung wird 60 Minuten lang bei 120°C rückfließend erhitzt. Anschließend wird das Ethanol im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird auf Eis gegeben und mit einer gesättigten Na₂CO₃ auf einen pH-Wert von 6 eingestellt.

Gelöscht: und a

Der bereits bei der Extraktion mit Ethylacetat anfallende Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet.

Gelöscht: Nach

Gelöscht: werden die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Vertreiben des überschüssigen Lösemittels verbleibt die Verbindung **25**.

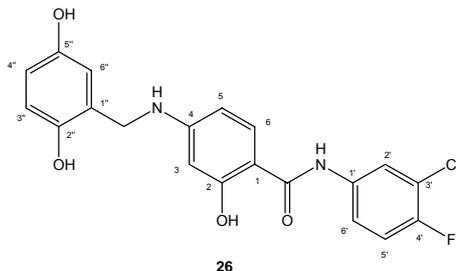
25: Purpurrotes Pulver, Smp. 271°C, Ausbeute.: 0,25 g (62%), C₂₀H₁₄ClF₂N₂O₄ (400,95)

CHN: ber.: C 59,94 H 3,52 N 6,99 gef.: 59,84 H 3,76 N 6,80

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3354,80 br (OH, NH), 1633,67, 1605,03 (C=O, C=N)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,95 (s, 1H, OH), 11,84 (s, 1H, NH-1'), 10,50 (s, 1H, OH-1''), 9,14 (s, 1H, OH-4''), 8,86 (s, 1H, CH-1'), 8,05 (dd, 1H, $^3J=6,80$ Hz, $^4J=2,57$ Hz, H2'), 8,01 (d, 1H, $^3J=8,5$ Hz, H6), 7,68 (m, 1H, H6'), 7,45 (t, 1H, $^3J_{\text{F,H}}=9,10$ Hz, H5'), 7,09 (d, 1H, $^4J=2,95$ Hz, H3), 6,99 (dd, 1H, $^3J=8,47$ Hz, $^4J=1,92$ Hz, H5), 6,93 (d, $^4J=1,93$ Hz, H6''), 6,90 (dd, 1H, $^3J=8,81$ Hz, $^4J=2,95$ Hz, H4''), 6,81 (d, 1H, $^3J=8,78$ Hz, H3'')

MS (EI, 260°C): m/z 400 (M^+ , 48,17%, ^{35}Cl).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-4-(2,5-dihydroxybenzylamino)-2-hydroxybenzamid (**26**)**26**

0,20 g (0,0005 mol) *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-4-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (**25**) werden in 5 mL Eisessig gelöst, die Mischung auf 5-10°C gekühlt und tropfenweise mit 0,03 g (0,0001 mol) Borandimethylaminkomplex, der zuvor in 5 mL Eisessig aufgenommen wurde, versetzt. Anschließend wird die Mischung so lange bei RT gerührt, bis eine klare Lösung entsteht. Diese wird dann auf Eis gegeben. Nach Einstellung eines pH-Wertes von 6 mit 5N-NaOH, wird mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum vertrieben.

Gelöscht: auf einen

Gelöscht: tronlauge

Der verbleibende Rückstand wird mit Dichlormethan gewaschen und anschließend getrocknet.

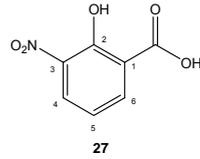
26: Hellgelbes Pulver, Smp. 185°C, Ausbeute: 0,09 g (45,8%), C₂₀H₁₆ClFN₂O₄ *0,5 H₂O (402,79*9,01)

CHN: ber.: C 58,30 H 4,16 N 6,83 gef.: C 58,29 H 4,08 N 6,66

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3399,70 br (OH, NH), 1639,14 (C=O)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,16 (s, 1H, OH-2), 10,05 (s, 1H, NH-1'), 8,84 (s, 1H, OH-2''), 8,77 (s, 1H, OH-5''), 7,95 (dd, 1H, ³J=6,80 Hz, ⁴J=2,48 Hz, H2'), 7,71 (d, 1H, ³J=8,89 Hz, H6), 7,60 (m, 1H, H6'), 7,39 (t, ³J_{F,H}=9,10 Hz, H5'), 6,91 (t, 1H, J=5,85 Hz, NH-4), 6,63 (d, 1H, ³J=8,53 Hz, H3''), 6,57 (d, 1H, ⁴J=2,78 Hz, H3), 6,45 (dd, 1H, ³J=8,50 Hz, ⁴J=2,85 Hz, H4''), 6,22 (dd, 1H, ³J=8,76 Hz, ⁴J=1,75 Hz, H5), 5,97 (d, 1H, ⁴J=1,60 Hz, H6''), 4,15 (s, 2H, -CH₂-).

MS (FAB): m/z 403,2 (M⁺, 98,5%, ³⁵Cl).

3-Nitrosalicylsäure (27)

0,015 mol (2,07 g) Salicylsäure werden in 30 mL abs. Dichlormethan suspendiert. Anschließend werden 0,0007 mol (0,25 g) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 0,0375 mol (3,93 g) Isopropylnitrat und 2,0 mL konz. H_2SO_4 hinzugegeben und diese Mischung 75 Minuten lang bei RT gerührt. Danach wird die Suspension auf 300 mL Eiswasser gegeben und der Niederschlag abgesaugt. Dieser wird mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Gelöscht: Zu einer bei RT gerührten Suspension aus

Gelöscht: in

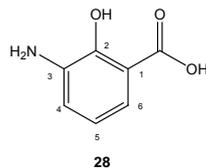
Gelöscht: werden

Gelöscht: gefolgt von

Gelöscht: bei RT

Gelöscht: Anschließend

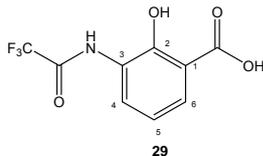
27: Gelbes Pulver, Smp. 121-122°C, Ausbeute: 1,49 g (54,3%) Gemisch mit 5-Nitrosalicylsäure, $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_5$ (183,18) [96].

3-Aminosalicylsäure (28)

0,018 mol (3,30 g) 3-Nitrosalicylsäure werden in 570 mL Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 3,15 g Pd/C (5%) und 70 mL Cyclohexen wird die Suspension sieben Stunden lang unter Rückfluss bei 100°C erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung heiß filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt.

Der Rückstand wird mit Ethanol gewaschen und abgesaugt.

28: Braunes Pulver, Smp. 240°C (ABCR), Ausbeute: 0,69 g (25,0%), $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$ (153,19)

2-Hydroxy-3-[2,2,2-trifluoracetyl]-amino]-benzoesäure (29)

Nachdem 0,88 g (0,058 mol) 3-Aminosalicylsäure in 40 mL absolutem 1,4-Dioxan gelöst wurden, wird die Mischung mit 4,5 mL Trifluoacetanhydrid versetzt und anschließend 30 Minuten lang bei RT gerührt. Dann werden 30 mL Wasser hinzugefügt, und die Reaktionsmischung wird 60 Minuten lang bei RT gerührt. Nach Extraktion mit Ethylacetat werden die organischen Phasen mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der verbleibende Rückstand wird abgesaugt und getrocknet.

Gelöscht: er

Gelöscht: ansatz

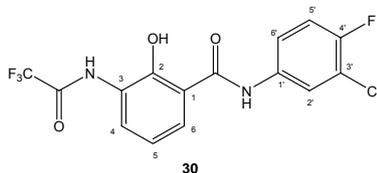
29: Graues Pulver, Smp. 211-212°C, Ausbeute: 0,847 g (59,2%), C₉H₆O₄NF₃ (249,14)

CHN: ber.: C 43,39 H 2,43 N 5,65 gef.: C 43,46 H 2,67 N 5,61

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3404,70 (OH_{Säure}), 3020,29 (NH), 1728,31 (C=O_{Säure}), 1626,08 (C=O_{Amid}).

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,44 (COOH), 10,80 (s, 2H, OH-2, NH-3, austauschbar mit D₂O), 7,85 (dd, 1H, ³J=7,94 Hz, ⁴J=1,56 Hz, H6), 7,54 (dd, 1H, ³J=7,79 Hz, ⁴J=1,43 Hz, H4), 6,83 (t, 1H, ³J=7,88 Hz, H5)

MS (EI, 80°C): m/z 249 (M⁺, 52,55%).

N-(3-Chlor-4-phenyl)-2-hydroxy-3-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (30)

Nachdem 0,70 g (0,0028 mol) 2-Hydroxy-3-[2,2,2-trifluoracetyl]-amino]-benzoesäure (29) mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt wurden, wird die Mischung 90 Minuten lang bei 70°C erhitzt und anschließend das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird in 150 mL 1,4-Dioxan aufgenommen und mit 0,422 g (0,0029 mol) 3-Chlor-4-fluoranilin ergänzt. Nachdem die Mischung 60 Minuten lang bei 80°C unter Rückfluss erhitzt wurde, wird diese auf RT abgekühlt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 100 mL Wasser aufgenommen. Nach Hinzufügen von 10 mL 5N-HCl wird mit Ethylacetat extrahiert, und die vereinigten

organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum vertrieben.

Der verbleibende Rückstand wird abgesaugt und mit Diethylether gewaschen.

30: Braunes Pulver, Smp. 169 °C, Ausbeute: 0,67 g (88%), $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3\text{ClF}_4$ (376,69)

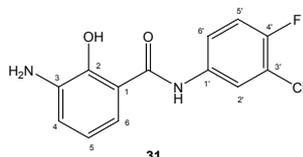
CHN: ber.: C 47,83 H 2,41 N 7,44 gef.: C 47,89 H 2,65 N 7,50

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3393,50 br (OH, NH), 1719,79, 1550,29 (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 400 MHz): δ (ppm) 12,54 (s, 1H, OH, austauschbar mit D_2O), 11,98 (s, 1H, NH-3, austauschbar mit D_2O), 11,37 (s, 1H, NH-1', austauschbar mit D_2O), 7,96 (dd, 1H, $^3J=8,76$ Hz, $^4J=1,10$ Hz, H2'), 7,63 (m, 1H, H6'), 7,58 (dd, 1H, $^3J=7,85$ Hz, $^4J=1,08$ Hz, H6), 7,39 (t, 1H, $^3J_{\text{F,H}}=9,12$ Hz, H5'), 6,96 (2H, dd, $^3J=6,47$ Hz, $^4J=2,52$ Hz, H4; t, H5)

MS (EI, 250°C): m/z 376 (M^+ , 26,27%, ^{35}Cl).

3-Amino-*N*-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (**31**)



1,00 g (0,003 mol) *N*-(3-Chlor-4-phenyl)-2-hydroxy-3-[(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-benzamid (**30**) werden in einer Mischung aus 80 mL Methanol und 10 mL Wasser gelöst und mit 1,67 g (0,014 mol) K_2CO_3 versetzt. Die Reaktionsmischung wird 120 Minuten lang unter Rückfluss erhitzt, und anschließend wird das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt. Nachdem der verbleibende Rückstand in Wasser aufgenommen wurde, wird mit Ethylacetat extrahiert und das Lösemittel im Vakuum vertrieben.

Die Aufreinigung erfolgt durch SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)].

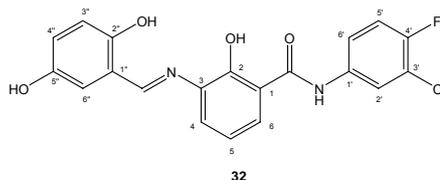
31: Braunes Pulver, Smp. 169-170°C, Ausbeute: 0,041 g (27,5%), $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{ClF}$ (280,68)

CHN: ber.: C 55,63 H 3,59 N 9,98 gef.: C 55,38 H 3,82 N 9,81

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3400,61, 3126,65 (OH, NH), 1639,99, 1553,57 (C=O, NH_2)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 400 MHz): δ (ppm) 10,33 (s, 2H, OH, NH-1'), 7,94 (dd, 1H, $^3J=6,86$ Hz, $^4J=2,55$ Hz, H2'), 7,63 (m, 1H, H6'), 7,39 (t, $^3J_{\text{F,H}}=9,09$, H5'), 7,18 (dd, 1H, $^3J=7,89$ Hz, $^4J=0,70$ Hz, H6), 6,82 (dd, 1H, $^3J=7,66$ Hz, $^4J=0,75$ Hz, H4), 6,66 (t, 1H, $^3J=7,85$, H5)

MS (EI, 125°C): m/z 280 (M^+ , 22,64%, ^{35}Cl).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-3-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (**32**)

0,12 g (0,00034 mol) 3-Amino-*N*-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (**31**) werden in 40 mL einer Mischung aus Ethanol und Eisessig (1+1) gelöst und mit 0,056 g (0,0004 mol) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd versetzt. Nachdem die Reaktionsmischung 60 Minuten lang rückfließend bei 120°C erhitzt wurde, wird das Ethanol im Vakuum entfernt und der Rückstand auf Eis gegeben. Die Mischung wird mit gesättigter Na₂CO₃-Lsg. auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum vertrieben.

Der verbleibende Rückstand wird mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

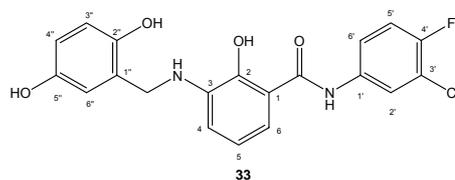
32: Weinrotes Pulver, Smp. 220°C, Ausbeute: 0,20 g (34,9%), C₂₀H₁₄ClFN₂O₄ (400,95)

CHN: ber.: C 59,61 H 4,00 N 6,98 gef.: C 59,56 H 4,36 N 6,77

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3319,42 br (OH, NH), 1578,60, 1430,15 (C=O, C=N)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,20 (s, 1H, NH-1'), 11,52 (s, 1H, OH-2), 10,50 (s, 1H, OH-2''), 9,02 (s, 1H, OH-5''), 8,80 (s, 1H, CH), 7,99 (dd, 1H, ³J=6,80 Hz, ⁴J=2,42 Hz, H2'), 7,92 (dd, 1H, ⁴J=2,26 Hz, ³J=8,81 Hz, H4''), 7,64 (m, 1H, H6'), 7,52 (dd, 1H, ³J=8,69 Hz, ⁴J=2,51 Hz, H6), 7,35 (t, 1H, ³J_{F,H}=4,57 Hz, H5'), 7,04 (d, 1H, ³J=8,76 Hz, H3''), 6,99 (d, 1H, ⁴J=2,79 Hz, H6''), 6,81 (dd, 1H, ³J=8,83 Hz, ⁴J=2,83 Hz, H4), 6,71 (t, 1H, ³J_{H,H}=8,78 Hz, H5)

MS (EI, 280°C): m/z 400 (M⁺, 44,86%, ³⁵Cl).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-3-(2,5-dihydroxybenzylamino)-2-hydroxybenzamid (**33**)

Es wird eine Suspension aus 0,70 g (0,0018 mol) *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-3-[(2,5-dihydroxybenzyliden)-amino]-2-hydroxybenzamid (**32**) und 5 mL Eisessig hergestellt und diese

auf 5-10°C gekühlt. Anschließend werden 0,20 g (0,0003 mol) Borandimethylaminkomplex in 5 mL Eisessig gelöst und hinzugeetropt. Die Reaktionsmischung wird so lange gerührt, bis eine Lösung entsteht. Diese wird dann auf Eis gegeben, mit 5N-NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt durch SC [Ethylacetat/n-Hexan (9+1)].

33: Hellgelbes Pulver, Smp.: 179°C, Ausbeute: 0,15 g (20,83%), C₂₀H₁₆N₂O₄ClF (402,79)

CHN: ber.: C 59,64, H 4,00 N 6,95 gef.: C 59,56 H 4,36 N 6,77

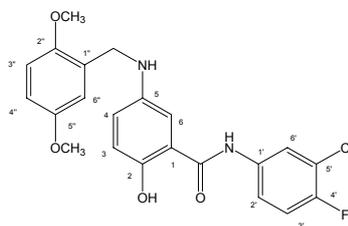
IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3387,33, 3130,59 (OH, NH), 1634,16 (C=O)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,08 (s, 1H, OH-2, austauschbar mit CD₃O), 10,33 (s, 1H, N-1', austauschbar mit CD₃O), 8,74 (s, 1H, OH-2'', austauschbar mit D₂O), 8,45 (s, 1H, OH-5'', austauschbar mit D₂O), 7,91 (dd, 1H, ³J=6,66 Hz, ⁴J=2,54 Hz, H2'), 7,60 (m, 1H, H6'), 7,34 (t, ³J_{F,H}=9,06 Hz, H5'), 7,19 (dd, 1H, ³J=9,91 Hz, ⁴J=3,76 Hz, H4''), 6,77 (t, 1H, ³J_{H,H}=7,92 Hz, H5), 6,72 (d, 1H, ⁴J=3,65 Hz, H6''), 6,67 (d, 1H, ⁴J=2,94 Hz, H6), 6,61 (dd, 1H, ³J=8,47 Hz, ⁴J=2,96 Hz, H4), 4,29 (s, 2H, -CH₂-).

MS (EI, 220°C): m/z 402 (M⁺, 6,38%, ³⁵Cl).

N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-(2,5-dimethoxybenzylamino)-2-hydroxybenzamidhydrochlorid

(35)



35

Zu einer bei RT gerührten Lösung aus 0,28 g (0,001 mol) 5-Amino-*N*-(3-chlor-4-fluorphenyl)-2-hydroxybenzamid (**19**) und 0,18 g (0,001 mol) 2,5-Dimethoxybenzaldehyd in 45 mL Dichlormethan werden 0,0014 mol Triacetoxyborhydrid hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1N-NaOH beendet. Anschließend wird mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Zugabe von methanolischer HCl (2%) wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand getrocknet.

Gelöscht: ig

Gelöscht: .

35: Hellgelbes Pulver, Smp. 178°C, Ausbeute: 0,137 g (32%), C₂₂H₂₀ClFN₂O₄*HCL*0,5 H₂O (430,84*36,50*9,01)

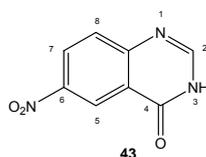
CHN: ber.: 55,47 H 4,66 N 5,88 gef.: C 55,46 H 4,74 N 5,96

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3433,26 br (OH, NH), 2837,65 (OCH₃), 1654,22 (C=O)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,43 (s, 1H, OH-2, austauschbar mit D₂O), 10,53 (s, 1H, NH-1', austauschbar mit D₂O), 8,06 (dd, 1H, ³J=6,8 Hz, ⁴J=2,45 Hz, H2'), 7,64 (m, 1H, H6'), 7,43 (t, ³J_{F,H}=9,11 Hz, H5'), 7,14 (d, 1H, ⁴J=2,1 Hz, H6), 7,01 (m, 2H, H3, H4), 6,96 (d, 1H, ³J=8,94 Hz, H3''), 6,89 (dd, 1H, ³J=8,84 Hz, ⁴J=2,72 Hz, H4''), 4,37 (s, 2H, CH₂), 3,76 (s, 3H, OCH₃-2''), 3,68 (s, 3H, OCH₃-5'')

MS (EI, 295°C): m/z 430 (M⁺, 36,39%, ³⁵Cl).

6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin-4-on (43)



6,3 g (0,035 mol) 2-Amino-5-nitrobenzoesäure werden mit 8,5 g Formamidinacetat in 100 mL 2-Methoxyethanol neun Stunden lang rückfließend erhitzt. Der nach dem Abkühlen auf RT anfallende Niederschlag wird abgesaugt und mit n-Hexan gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und der dabei entstehende Niederschlag abgesaugt und mit n-Hexan gewaschen.

Gelöscht: ¶

Die beiden Rückstände werden vereinigt und getrocknet.

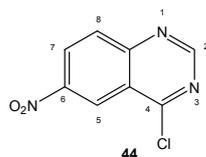
43: Gelbes Pulver, Smp. 272°C, Ausbeute: 4,39 g (66,41%), C₈H₅N₃O₃ (191,33)

CHN: ber.: 50,22 H 2,63 N 22,06 gef.: C 50,25 H 2,73 N 22,09

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3404,36 (NH), 3074,75 (CH arom.), 1615,24 (C=O)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,78 (s, 1H, NH-3), 8,81 (d, 1H, H5, ⁴J=2,63 Hz), 8,55 (dd, 1H, H7, ³J=9,04 Hz, ⁴J=2,59 Hz), 8,32 (s, 1H, H2), 7,87 (d, 1H, H8, ³J=8,99 Hz)

MS (EI, 100°C): m/z 191,2 (M⁺, 100%).

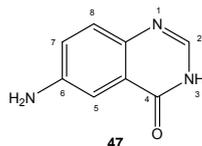
6-Nitro-4-chlorchinazolin (44)

1,00 g (0,0052 mol) 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**43**) werden mit 15 mL Thionylchlorid, 2 mL Phosphorylchlorid und 0,2 mL *N,N*-Dimethylformamid versetzt und vier Stunden lang bei 100°C erhitzt. Das überschüssige Lösemittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand mit Diethylether gewaschen.

44: Gelbes Pulver, Ausbeute: 0,65 g (59,63%), C₈H₄ClN₃O₂ (209,82)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 8,82 (d, 1H, ⁴J=2,64 Hz, H5), 8,55 (dd, 1H, ³J=9,07 Hz, ⁴J=2,88 Hz, H6), 8,32 (s, 1H, H2), 7,86 (d, 1H, ³J=8,99 Hz, H7).

MS (EI, 150°C): m/z = 208,9 (M⁺, 100%).

6-Amino-3,4-dihydrochinazolin-4-on (47)

90 mL Ethanol werden zusammen mit 23 mL Essigsäure (50%) auf 110°C erhitzt. Nach Zugabe von 2,62 g (0,014 mol) 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**43**) und 2,30 g Eisenpulver wird die Mischung drei Stunden lang bei dieser Temperatur stark gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt, auf Eis gegeben und mit einer gesättigten Na₂CO₃-Lsg. neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und verworfen. Nach fünfmaligem Extrahieren mit Ethylacetat wird das Lösemittel im Vakuum entfernt, der verbleibende Rückstand abgesaugt und getrocknet.

Gelöscht: triumcarbonatlösung

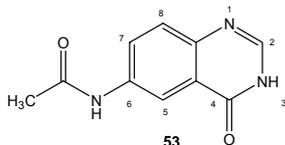
47: Hellgelbe Kristalle, Smp.265°C (Zers.), Ausbeute: 0,86 g (38,05%), C₈H₇N₃O (161,35)

CHN: ber.: C 59,63 H 4,35 N 26,09 gef.: C 59,63 H 4,54 N 26,11

IR (KBr): ν(cm⁻¹) 3437,19 (NH), 3056,95 (CH aromat.), 1672,25 (C=O)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,81 (s, 1H, NH-3), 7,75 (s, 1H,H2), 7,37 (d, 1H, H8, ³J=8,63 Hz), 7,17 (d, 1H, H5, ⁴J=2,66 Hz), 7,06 (dd, 1H, H7, ³J=8,62 Hz, ⁴J=2,55 Hz)

MS (EI, 125°C): m/z 161,1 (M⁺, 100%).

N-(3,4-dihydro-4-oxochinazolin-6-yl)acetamid (53)

1,0 g (0,006 mol) 6-Amino-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**43**) werden zusammen mit 122 mL Acetanhydrid und 1,22 mL Pyridin zwei Stunden lang bei 120°C erhitzt. Nachdem die Reaktionsmischung auf Eis gegeben und gerührt wurde, wird ein Großteil des Lösemittels im Vakuum entfernt. Nach Abkühlen dieser Lösung entsteht ein flockiger Niederschlag, der abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet wird.

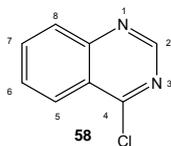
53: Farblose Kristalle, Smp. >300°C, Ausbeute: 0,67 g (54,9%), C₁₀H₉N₃O₂ (203,38)

CHN: ber.: C 59,05 H 4,46 N 20,75 gef.: C 59,09 H 4,49 N 20,62

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3288,43 (NH), 3067,85 (CH arom.), 1674 (C=O)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,16 (s, 1H, NH-3), 10,27 (s, 1H, NH-6), 8,45 (s, 1H, H2), 7,99 (d, 1H, H5, ⁴J=3,48 Hz), 7,91 (dd, 1H, ³J=8,75 Hz, ⁴J=2,33, H7), 7,62 (d, 1H, ³J=8,79 Hz, H8)

MS (EI, 120°C): m/z 203,07 (M⁺, 55,40%).

4-Chlorchinazolin (58)

1,0 g (0,007 mol) Hydroxychinazolin-4-on werden mit 3 mL Phosphorylchlorid versetzt und auf 80°C erhitzt. Sobald sich die Mischung verflüssigt hat, werden 1,45 g Phosphor-pentachlorid hinzugefügt und die Reaktionsmischung drei Stunden lang bei dieser Temperatur erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt und der entstandene Niederschlag getrocknet.

58: Gelbes Pulver, Ausbeute: 0,80 g (69,57%), C₈H₅ClN₂*HCl (164,76*36,51)

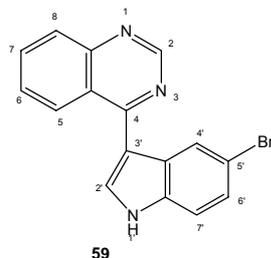
CHN: ber.: C 47,74 H 3,00 N 13,98 gef.: C 48,12 H 3,21 N 13,94

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3069,15 (CH arom.), 766,85 (C-Cl)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 8,86 (s, 1H, H2), 8,19 (dd, 1H, ³J=7,97 Hz, ⁴J=1,35 Hz, H5), 7,94 (t, 1H, ³J=7,17 Hz, H5), 7,85 (d, 1H, ³J=8,05 Hz, H6), 7,66 (t, 1H, ³J=7,97 Hz, H7)

MS (EI, 35°C): m/z 164,0 (M⁺, 65,9%).

4-(5-Brom-1H-indol-3-yl)chinazolin (59)



Gelöscht: ¶

0,28 g Magnesiumspäne und etwas Iod werden zusammen mit einer Mischung aus 1,4 mL Methyljodid und 6 mL Diethylether unter Eiskühlung tropfenweise versetzt und nach Lösen des Magnesiums 15 Minuten lang gerührt. Anschließend werden 0,84 g (0,004 mol) 5-Bromindol, gelöst in 15 mL Diethylether, tropfenweise hinzugefügt und die Reaktionsmischung 30 Minuten lang bei RT gerührt. Nachdem 0,80 g (0,005 mol) 4-Chlorchinazolin (**58**) portionsweise beigefügt wurden, wird die Mischung 60 Minuten lang unter Rückfluss erhitzt, abgekühlt und auf Eis gegeben. Nach Extraktion mit Ethylacetat wird die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)].

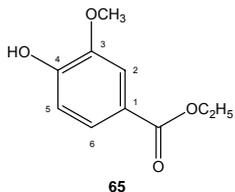
59: Gelbe Kristalle, Smp.235°C, Ausbeute: 0,02 g (2,47%), C₁₆H₁₀BrN₃ (324,35)

CHN: ber.: C 59,24 H 3,11 N 13,01 gef.: C 59,33 H 3,32 N 13,04

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3418,62 (NH), 3071,54 (CH aromat.), 650,52 (C-Br)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,23 (s, 1H, NH), 8,54 (d, 1H, ³J=8,46 Hz, H5), 8,50 (d, 1H, ⁴J=1,91 Hz, H4'), 8,37 (d, 1H, ⁴J=2,58 Hz, H2'), 8,01 (m, 2H, H8, H6), 7,76 (m, 1H, H7), 7,53 (d, 1H, ³J=8,60 Hz, H7'), 7,39 (dd, 1H, ³J=8,58 Hz, ⁴J=1,97 Hz, H6')

MS (EI, 30°C): m/z 324,1 (M⁺, 100,0%).

Ethyl-4-hydroxy-3-methoxybenzoat (65)

5,00 g (0,03 mol) Vanillinsäure werden in 300 mL Ethanol gelöst, mit 1 mL konz. H_2SO_4 versetzt und bei 100°C erhitzt. Nach 60 Minuten wird erneut 1 mL konz. H_2SO_4 hinzugefügt und die Mischung weitere 3,5 Stunden lang auf der gleichen Temperatur gehalten. Nach Entfernen des Ethanols im Vakuum wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

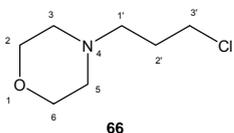
65: Gelb-braunes Öl, Ausbeute: 4,09 g (70,15%), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (196,19).

CHN: ber.: C 61,22 H 6,17 gef.: C 61,07 H 6,20

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3401,56 (OH), 3082,27 (CH arom.), 2842,42 (OCH_3)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}^6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 9,93 (s, 1H, OH), 7,47 (dd, 1H, $^3J=8,15$ Hz, $^4J=1,96$, H6), 7,43 (d, 1H, $^4J=1,85$ Hz, H2), 6,86 (d, 1H, $^3J=8,38$), 3,87 (q, 2H, CH_2), 3,82 (s, 3H, OCH_3), 1,30 (t, 3H, CH_3)

MS (EI, 35°C): m/z 196,2 (M^+ , 58,19%).

3-Morpholino-propylchlorid (66)

52,2 mL Morpholin werden zusammen mit 30 mL 1-Brom-3-chlorpropan und 180 mL Toluol drei Stunden lang bei 70°C erhitzt. Anschließend wird der anfallende Feststoff abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und das Filtrat dreimal mit 3N-HCl extrahiert. Nach Alkalisieren mit 10N-NaOH wird mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über K_2CO_3 getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt. Übrig bleibt eine Mischung aus einem Öl mit etwas Feststoff. Das Öl wird dekantiert und zur Aufreinigung einer Vakuumdestillation unterworfen.

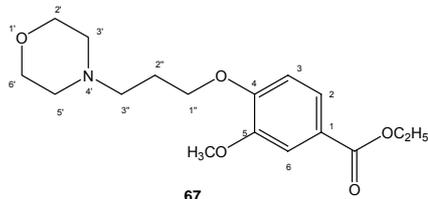
66: Farbloses Öl, Ausbeute: 35,50 g (0,22 mmol), $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}$.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) 2958,87 (CH_2), 1118,52 (C-Cl).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}^6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 3,66 (t, 2H, H3'), 3,56 (t, 4H, H2, H6), 2,38 (t, 2H, H1'), 2,33 (t, 4H, H3, H5), 1,86 (m, 2H, H2')

MS (EI, 120°C): m/z 163,1 (M^+ , 5,7 %).

Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-3-methoxybenzoat (67)



Eine Mischung aus 1,90 g (0,01 mol) Ethyl-4-hydroxy-3-methoxybenzoat (**65**), 3,80 g K_2CO_3 , 0,38 g 18-Krone-6, 190 mL Acetonitril und 1,9 mL 3-Morpholino-propylchlorid (**66**) wird vier Stunden lang unter Rühren bei 80°C erhitzt, heiß filtriert und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand muss nicht weiter aufgereinigt werden.

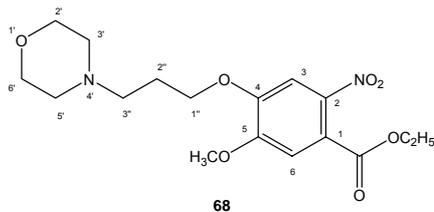
67: Zart lachsfarbenes Pulver, Smp. 48°C, Ausbeute: 1,37 g (45,97%), $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}$ (323,44)

CHN: ber.: C 63,26 H 8,15 N 4,30 gef.: C 63,26 H 8,15 N 4,30

IR (KBr): ν (cm^{-1}) 2947,02 (CH arom.), 2900,35 (CH_2), 2816,48 (OCH_3), 1710,72 (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}^6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 7,57 (dd, 1H, $^3J=8,27$ Hz, $^4J=1,96$ Hz, H6), 7,44 (d, 1H, $^4J=1,88$ Hz, H2), 7,07 (d, 1H, $^3J=8,49$ Hz, H5), 4,28 (q, 2H, CH_2), 4,08 (t, 2H, 1''), 3,81 (s, 3H, OCH_3), 3,56 (m, 4H, H3', H5'), 2,42 (t, 2H, H3''), 2,36 (m, 4H, H2', H5'), 1,89 (m, 2H, H2''), 1,31 (t, 3H, CH_3)

MS (EI, 80°C): m/z 323,3 (M^+ , 7,00%).

Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-3-methoxy-2-nitrobenzoat (68)

25 mL gekühlte konz. HNO₃ werden tropfenweise unter Kühlung in 1,00 g (0,003 mol) Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-3-methoxybenzoat (**67**) gegeben, und die Mischung wird zwei Stunden lang auf Eis gerührt. Anschließend wird diese auf Eis gegossen und mit NaOH (20%) alkalisiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan und Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wird das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand wird getrocknet.

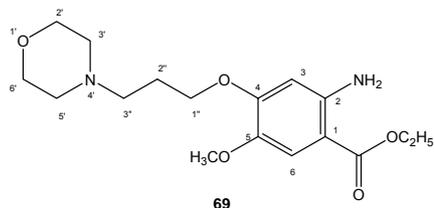
68: gelbes Öl, Ausbeute: 0,51 g (45,0%), C₁₇H₂₄N₂O₇ (368,50)

CHN: ber.: 55,43 H 6,57 N 7,60 gef.: 55,35 H 6,45 N 7,58

IR (Film): ν (cm⁻¹) 3059,87 (CH arom.), 2917,84 (CH₂), 28,14,67 (OCH₃), 1730,15 (C=O), 1578,72 (NO₂)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 7,63 (s, 1H, H₆), 7,29 (s, 1H, H₃), 4,29 (q, 2H, CH₂), 4,16 (t, 2H, H_{1''}), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,57 (m, 4H, H_{3'}, H_{5'}), 2,40 (m, 2H, H_{3''}), 2,37 (m, 4H, H_{2'}, H_{6'}), 1,89 (m, 2H, H_{2''}), 1,26 (t, 3H, CH₃)

MS (EI, 125 °C): m/z 368,2 (M⁺, 4,38%).

Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-2-amino-3-methoxybenzoat (69)

2,97 g (0,008 mol) Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-3-methoxy-2-nitrobenzoat (**68**) werden in 300 mL Ethanol gelöst und mit 1,70 g Pd/C (5%) und 30 mL Cyclohexen versetzt. Diese Mischung wird zwei Stunden lang bei 100°C erhitzt, heiß filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels SC [Dichlormethan/Methanol (9+1)] und anschließender Umkristallisation aus Ethylacetat/N-Hexan.

69: Farblose Kristalle, 85°C, Ausbeute: 0,55 g (20%), C₁₇H₂₆N₂O₅ (338,4).

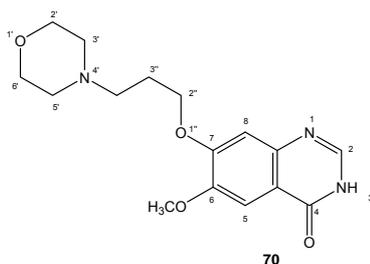
CHN: ber.: C 60,34 H 7,74 N 8,28 gef.: C 60,29 H 7,66 N 8,23

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3471,08 (NH₂), 2957,35 (CH₂), 2871,44 (OCH₃), 1628,23 (C=O)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 7,12 (s, 1H, H₆), 6,39 (s, 2H, NH₂), 6,34 (s, 1H, H₃), 4,20 (q, 2H, CH₂), 3,95 (t, 2H, H_{1''}), 3,63 (s, 3H, OCH₃), 3,55 (m, 4H, H_{3'}, H_{5'}), 2,40 (m, 2H, H_{3''}), 2,31 (m, 4H, H_{2'}, H_{6'}), (m, 2H, H_{2''}), 1,26 (t, 3H, CH₃)

MS (EI, 50°C): m/z 338,4 (M⁺, 4,65%).

7-(3-morpholinopropoxy)-6-methoxychinazolin-4-(3H)-on (70)



2,00 g (0,006 mol) Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-2-amino-3-methoxybenzoat (**69**) und 3,36 g (0,032 mol) Formamidinacetat werden in 39 mL 2-Methoxyethanol acht Stunden lang rückfließend erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird mit Ethylacetat gewaschen und getrocknet.

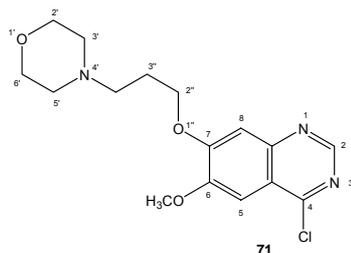
70: Farblose, leicht gelbliche Kristalle, Smp. 211°C, Ausbeute: 0,005 g (2,41%), C₁₆H₂₁N₃O₄*0,25 H₂O (319,53*4,50).

CHN: ber.: C 59,30 H 6,55 N 13,03 gef.: C 59,76 H 6,72 N 12,84

IR (KBr): ν (cm⁻¹) 3429,58 (NH), 2912,39 (CH₂), 2874,09 (OCH₃)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 11,62 (s, 1H, NH), 7,98 (s, 1H, H₂), 7,43 (s, 1H, H₅), 7,12 (s, 1H, H₈), 4,15 (t, 2H, H''), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,58 (m, 4H, H_{3'}, H_{5'}), 2,43 (t, 2H, H_{3''}), 2,37 (m, 4H, H_{2'}, H_{6'}), 1,93 (m, 2H, H_{2''})

MS (EI, 200°C): m/z 319,2 (M⁺, 3,32%).

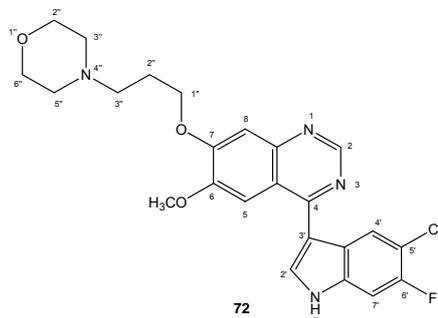
7-(3-morpholinopropoxy)-4-chlor-6-methoxychinazolin (71)

0,34 g (0,001 mol) 7-(3-Morpholinopropoxy)-6-methoxychinazolin-4-(3*H*)-on (**70**) werden in einer Mischung aus 2 mL Phosphorylchlorid und 0,25 g Phosphorpentachlorid zwei Stunden lang unter Rühren bei 80°C erhitzt. Das überschüssige Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit Diethylether gewaschen.

71: Beige-bräunliches Pulver, Ausbeute: 0,30 g (88,8%), C₁₆H₂₀ClN₃O₃ (337,79)

¹H-NMR ([D⁶]DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 8,88 (s, 1H, H2), 7,49 (s, 1H, H5), 7,40 (s, 1H, H8), 4,35 (t, 2H, H'), 4,01 (2, 3H, OCH₃), 3,77 (t, 4H, H2', H6'), 3,23 (m, 2H, H3''), 3,09 (m, 4H, H3', H5'), 2,30 (m, 2H, H2'')

MS (EI, 150°C): m/z 337,3 (M⁺, 4,86%).

4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-methoxy-7-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin (72)

0,15 g Magnesiumspäne werden zusammen mit etwas Iod tropfenweise mit einer Mischung aus 0,80 mL Iodmethan und 3 mL Diethylether unter Eiskühlung versetzt. Nachdem sich das Magnesium vollständig gelöst hat, wird die Reaktionslösung 15 Minuten lang unter Eiskühlung gerührt. Anschließend werden 0,30 g (0,001 mol) 5-Chlor-6-fluorindol (**10**), gelöst in 9 mL Ether, tropfenweise hinzugegeben und die Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 0,40 g (0,001 mol) 7-(3-morpholinopropoxy)-4-chlor-6-methoxychinazolin (**71**) wird 60 Minuten lang bei 60°C rückfließend erhitzt, die Mischung auf Eis

gegossen und viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird einer SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)] unterzogen und anschließend durch Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan gereinigt.

72: Hellgelbes Pulver, Smp. 190°C , Ausbeute: 0,024 g (4,31%), $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_3$ (470,7).

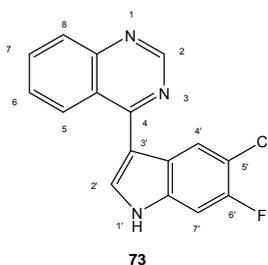
CHN: ber.: C 61,21 H 5,14 N 11,90 gef.: 61,44 H 5,53 N 11,81

IR (KBr): ν (cm^{-1}) 3427,71 (NH), 3058,16 (CH arom.), 2955,72 (CH_2), 2865,01 (OCH_3), 1328,99, 1162,62 (C-F), 1069,38, 822,82 (C-Cl)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}^6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,05 (s, 1H, NH), 9,05 (s, 1H, H2), 8,41 (d, 1H, $^4J=2,42$ Hz, H2'), 8,36 (d, 1H, $^4J_{\text{H-F}}=7,53$ Hz, H4'), 7,67 (s, 1H, H5), 7,53 (d, 1H, $^3J_{\text{H-F}}=9,77$ Hz, H7'), 7,37 (s, 1H, H8), 4,25 (t, 1H, H1''), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,58 (4H, H2'', H6''), 2,44 (t, 2H, H3'''), 2,37 (t, 4H, H3'', H5''), 1,98 (m, 2H, H2''')

MS (EI, 175°C): m/z 470,0 (M^+ , 1,89%).

4-(5-chlor-6-fluor-1*H*-indol-3-yl)-chinazolin (73)



Zu einem Gemisch aus 0,25 g Magnesiumspänen und etwas Iod werden tropfenweise 1,20 mL Iodmethan in 5 mL Diethylether unter Eiskühlung hinzugefügt. Nach der Auflösung des Magnesiums wird die Mischung 15 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Dann werden 0,60 g 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) in 15 mL Diethylether gelöst und tropfenweise zu der Mischung gegeben. Anschließend wird die Lösung 30 Minuten bei RT gerührt und portionsweise mit 0,60 g 4-Chlorchinazolin (**58**) ergänzt. Nachdem die Mischung 60 Minuten lang bei 60°C erhitzt wurde, wird diese auf Eis gegossen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, getrocknet und im Vakuum eingengt.

Das Rohprodukt wird einer SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)] unterzogen und anschließend durch Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan gereinigt.

73: Gelbe Kristalle, Smp. 197°C , Ausbeute: 0,021 g (0,19 %), $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClFN}_3$ (297,9)

CHN: ber.: C 64,17 H 3,045 N 14,17 gef.: C 64,79 H 3,28 N 14,08

IR (KBr): ν (cm^{-1}) 3435,09 (NH), 3047,64 (CH arom.), 1324,10, 1157,89 (C-F), 1022,80, 826,99 (C-Cl)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}^6]$ DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 12,31 (s, 1H, NH), 9,29 (s, 1H, H2), 8,53 (dd, 1H, $^3J=8,47$ Hz, H5), 8,46 (d, 1H, $^4J_{\text{H-F}}=7,67$ Hz, H4'), 8,39 (s, 1H, H2'), 7,99 (m, 2H, H6, H8), 7,76 (m, 1H, H7), 7,56 (d, 1H, $^3J_{\text{H-F}}=9,76$ Hz, H7')

MS (EI, 160°C): m/z 297,1 (M^+ , 59,16%).

4.4 Pharmakologische Testungen

4.4.1 In vitro-Tests auf EGFR-und HER-2-TK-inhibitorische Aktivität

Diese Tests werden von MDS Pharma Services, Taipei, R.O.C. Taiwan durchgeführt. Es handelt sich dabei um Enzym Assays, die mittels ELISA-Methode quantitativ ausgewertet wurden.

Proteinkinase, EGF-Rezeptor:

Enzymquelle:	humane A431 Zellen
Substrat:	10 $\mu\text{g/mL}$
Polyglutaminsäure/Tyrosin [poly(glu:tyr)].	
Vehikel:	1% DMSO
Präinkubationszeit/Temp.:	15 Minuten bei 25°C
Inkubationszeit/Temp.:	60 Minuten bei 25°C
Inkubationspuffer:	50 mM HEPES, pH 7,4, 20 mM MgCl_2 , 0,2 mM Na_3VO_4
Signifikanzkriterium:	$\geq 50\%$ der maximalen Stimulation oder Inhibition

Proteintyrosinkinase, HER2-Rezeptor

Quelle:	humane rekombinante Insekten Sf9 Zellen
Substrat:	10 $\mu\text{g/mL}$ Poly (Glu:Tyr)
Vehikel:	1% DMSO
Präinkubationszeit/Temp.:	15 Minuten, 25°C
Inkubationszeit/Temp.:	5 Minuten, 25°C
Inkubationspuffer:	50 mM Hepes, 20 mM DTT, 20 mM MgCl_2 , 200 μM Na_3VO_4 , pH 7,4
Quantifizierungsmethode:	ELISA-Quantifizierung von Poly (Glu:Tyr-P)
Signifikanzkriterium:	$\geq 50\%$ der maximalen Stimulation bzw. Hemmung

Der jeweilige Enzymassay wurde in Wells gegeben, die mit poly(glu/tyr) Substrat bedeckt waren. Hinzugefügt wurden der Inkubationspuffer, die zu testende Substanz und das Enzym. Nach Zugabe von ATP startete die Reaktion. Um die inhibitorische Aktivität berechnen zu können, enthält jeder Assay jeweils zwei Wells für die Bestimmung der maximalen Phosphorylierungsrate ($p\text{-tyr}_{\text{max}}$: in Abwesenheit des Inhibitors) und der minimalen Phosphorylierungsrate ($p\text{-tyr}_{\text{min}}$: in Abwesenheit des Enzyms).

Die Quantifizierung von Phospho-Tyrosin ($p\text{-tyr}$) erfolgte mittels ELISA [100-113].

Die folgende Gleichung dient der Berechnung:

$$\text{Inhibition [\%]} = 100\% - 100\% * (p\text{-tyr}_{\text{test}} - p\text{-tyr}_{\text{min}}) / (p\text{-tyr}_{\text{max}} - p\text{-tyr}_{\text{min}})$$

4.4.2 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität

Dieser In vitro-Test an 60 humanen Tumorzelllinien wurde vom National Cancer Institute, Bethesda, USA, durchgeführt.

Die dabei verwendeten Zelllinien stammen von folgenden humanen Tumorarten ab: Leukämie, Melanom, Lunge, Kolon, Gehirn, Ovarien, Brust, Prostata und Niere. Das Ziel ist die Auswahl bestimmter Substanzen mit selektiver Wachstumshemmung oder Inhibition von einzelnen Tumorzelllinien für weitere Tests.

In **Abb. 160** ist die Vorgehensweise zur Kultivierung der Zelllinien schematisch dargestellt.

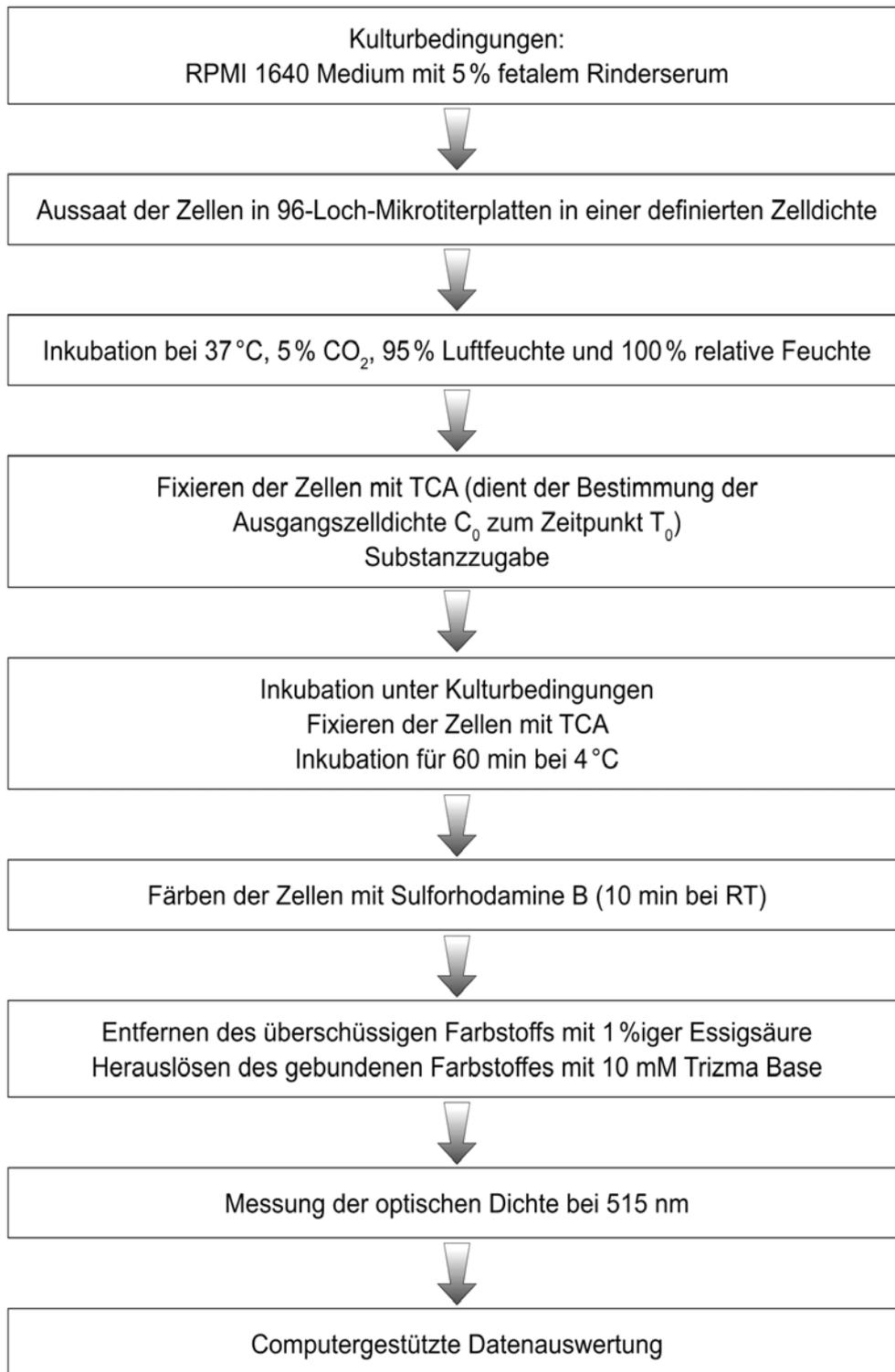


Abb. 160: Flussdiagramm für den Testablauf des Zytotoxizitäts-Tests

Die Aussaat der Zellen in Mikrotiterplatten erfolgt in einer definierten Zelldichte, je nach Verdoppelungszeit der einzelnen Zelllinien. Nach Inkubation unter festgelegten Kulturbedingungen erfolgt die Substanzzugabe auf die Zellen, nachdem die Proben in verschiedenen Konzentrationen in DMSO gelöst wurden und mit frischem Medium, das 50 µg/mL Gentamycin enthält, verdünnt wurden. Nach Inkubation erfolgt eine Fixierung mit 50%iger TCA und anschließender Inkubation bei 4°C. Der Überstand wird verworfen und nach Waschen und Trocknen wird der Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) hinzugefügt. Ungebundener Farbstoff wird durch 1%ige Essigsäure und gebundener Farbstoff durch 10 nM Trizma Base entfernt und anschließend die Absorption bei 515 nm gemessen [114]. Die prozentuale Wachstumshemmung wird wie folgt ermittelt:

$$\left[\frac{(T_i - T_z)}{(C - T_z)} \right] * 100 \text{ für Konzentrationen mit } T_i \geq T_z$$

$$\left[\frac{(T_i - T_z)}{T_z} \right] * 100 \text{ für Konzentrationen mit } T_i < T_z$$

T_i: Zellwachstum in Anwesenheit der Substanz in 5 Konzentrationen

T_z: Anfangszeit

C: Zellwachstum der Kontrollsubstanz

Gleichung 1: Gleichung zur Ermittlung der zytotoxischen Aktivität

4.4.3 *In vivo*-Test (Hollow fiber assay)

Weniger als 1% der ursprünglich 208 Substanzen, die im Test an drei Zelllinien T/C Werte von 32 bis 50% erreicht haben, werden für den *in-vivo* hollow fiber assay ausgewählt.

Für den Routine-hollow fiber assay werden 12 Tumorzelllinien verwendet, und zwar NCI-H23, NCI-H522 (beide Nicht-kleinzelliges Lungenkrazinom), MDA-MB-231, MDA-MB-435 (beide Brustkrebs), SW-620, COLO 205 (Kolonkrebs), LOX, UACC-62 (Melanom), OVCAR-3, OVCAR-5 (Eierstockkrebs), U251 und SF-295 (ZNS). Zusätzlich Zelllinien werden für spezielle nicht routinemäßig durchgeführte Tests verwendet.

Die Zelllinien werden in RPMI-1640-Medium kultiviert, welches außerdem 10% FBS und 2 mM Glutamin enthält. Einen Tag vor der hollow fiber Vorbereitung werden die Zellen mit frischem Medium ergänzt, um ein log-Phasen-Wachstum zu erhalten. Um die Fasern vorzubereiten werden die Zellen geerntet und in der gewünschten Zelldichte (2-10 x 10⁶ Zellen/mL) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in 1 mm Polyvinyliden Fluorid hollow fibers gegossen, wobei ein Ausschluss des Molekulargewichtes über 500.000 Da stattfindet. Die Hohlfasern werden hitzeversiegelt und diese Proben in Gewebe Kulturmedium gegeben

und bei 37°C in 5% CO₂ über 24 bis 48 Stunden vor der Implantation inkubiert. Insgesamt drei verschiedene Zelllinien werden für jedes Experiment vorbereitet, so dass jede Maus drei intraperitoneale Implantate (1 von jeder Tumoralinie) und drei subkutane (1 von jeder Tumoralinie) erhält. Am Tag der Implantation wird der Zellmasse zum Zeitpunkt Null durch den beständigen Endpunkt MTT assay ermittelt. 3 bis 4 Tage nach der Implantation werden den Mäusen über vier Tage lang die Testsubstanzen durch intraperitoneale Injektion in zwei verschiedenen Dosen verabreicht. Einen Tag nach der letzten Substanzgabe werden die Fasern eingesammelt und einem Endpunkt MTT assay unterworfen. Die optische Dichte jeder Probe wird spektrometrisch bei 450 nm ermittelt und der Mittelwert jeder Gruppe berechnet. Das prozentuale Nettowachstum wird für jede Zelllinien in jeder Gruppe bestimmt und mit dem prozentualen Nettowachstum in der Kontrollgruppe verglichen. Ein positives Ergebnis bedeutet eine mindestens 50%ige Reduktion des Wachstums gegenüber der Kontrollgruppe und wird mit zwei Punkten berechnet. Die Addition der Punkte kann maximal 96 ergeben, wobei nur Substanzen mit einer ip + sc- Punktzahl von 20 oder darüber, einem ac Wert von mindestens 8 oder bei beiden Dosen einen Zelltod jeder Zelllinie verursachen für einen Xenograft Test ausgewählt werden [115].

4.4.4 Zytotoxizitätstest (Kristallviolett-Assay in Mikrotiterplatten)

Die Durchführung des Tests auf zytotoxischen Eigenschaften mit Hilfe des Kristallviolett-Assays an hormonabhängigen MCF-7-Zelllinien wurde von Frau S. Bergemann (Arbeitskreis Prof. Dr. R. Gust) unternommen.

Hierbei wird das Zellwachstum in Gegenwart und in Abwesenheit der zu testenden Substanz untersucht, wobei die Änderung der Zellmenge in Bezug zur Ausgangszellmenge bestimmt wird.

Die **Abb. 161** zeigt die einzelnen Arbeitsschritte des Kristallviolett-Assays:

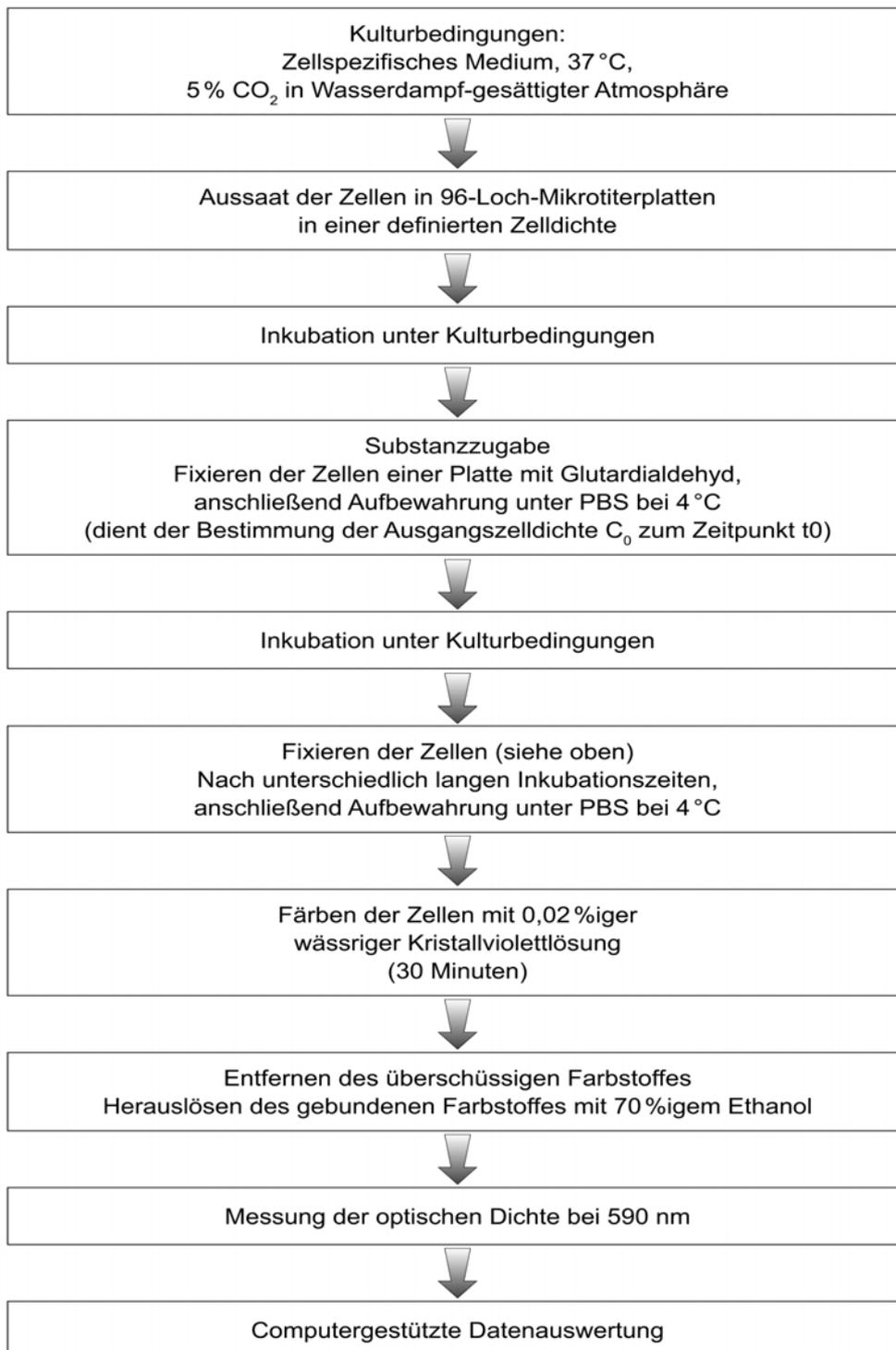


Abb. 161: Flussdiagramm für den Testablauf des Kristallviolett-Essays

Die Aussaat der Zellen erfolgt in Mikrotiterplatten in einer definierten Zelldichte. Da die Aussaatdichte einen Einfluss auf den Testverlauf hat, wird die durchschnittliche Zelldichte mikroskopisch pro Milliliter bestimmt und das Aussaatvolumen gegebenenfalls angepasst.

Nach einer definierten Inkubationszeit erfolgt die Substanzzugabe. Dazu werden die Substanzen in frischem Medium gelöst und in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben, nachdem das alte Medium entfernt wurde.

Gleichzeitig werden die Kulturen einer kompletten Mikrotiterplatte nach Entfernen des Kulturmediums auf dem Boden der Löcher mit Glutardialdehydlösung fixiert. Eventuell tote Zellen werden mit dem Medium entfernt.

Anschließend werden die Zellen mit PBS (phosphate-buffered saline: 0.08 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{O}$, 0.20 g KH_2PO_4 /1000mL Aqua purificata) überschichtet und bei 4°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die durchschnittliche Zellmenge der Kulturen dieser Platte dient als Ausgangszelldichte C_0 bei der Testauswertung.

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten werden auch die Zellen der anderen Mikrotiterplatten fixiert und bis zur Aufarbeitung bei 4°C gelagert.

Auf jeder Mikrotiterplatte werden neben den behandelten Kulturen auch Kontrollkulturen mitgeführt, denen nur Medium mit Lösemittel zugeführt wird. Das ist zur Ermittlung der antineoplastischen Aktivität der Testsubstanz ($T/C_{\text{korrr.}}$ -Werte) notwendig, da die daraus ermittelte Wachstumskinetik der Kontrollkulturen (C^*) neben der von den behandelten Kulturen (T^*) in die Berechnung einfließt.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Anfärben der Zellen mit Kristallviolettlösung zeitgleich für alle Mikrotiterplatten.

Durch Kristallviolett werden vor allem Nukleoproteine angefärbt. Durch Wässern wird der überschüssige Farbstoff entfernt. Das in den Zellen gebundene Kristallviolett wird mit 70%-igem Ethanol herausgelöst und die Lösung anschließend vermessen [116, 117].

Aus den Absorptionen der Kristallviolett-Lösungen (=Zelldichte, C_0 , C^* , T^*), die sehr gut mit der Zellzahl korrelieren, werden computergestützt die $T/C_{\text{korrr.}}$ -Werte (Zytotoxischer Effekt in %) berechnet.

$$T/C_{\text{korrr.}} = \left(\frac{(T^* - C_0)}{(C^* - C_0)} \right) \times 100 [\%]$$

C_0 : Mittelwert der optischen Dichte der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

T^* : Mittelwert der optischen Dichte der behandelten Kulturen

C^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kontrollkulturen

Gleichung 2: Gleichung zur Ermittlung des zytotoxischen Effektes

4.4.5 Colchicin Radioligand-Binding Assay

Dieser Test wird von MDS Pharma Services, Taipei, R.O.C. Taiwan durchgeführt.

Dazu werden Gehirnmembranen von Wistar-Ratten, die 150 g +/- 10 g wiegen, in einem Natriumphosphat-Puffer auf pH 6,7 eingestellt. Ein Aliquot von 0,1 mg wird mit [³H]-Colchicin 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein unspezifisches Binden wird bei Anwesenheit von 100 µM Colchicin abgeschätzt. Anschließend werden die Membranen gefiltert, dreimal nachgewaschen und ausgezählt, um die spezifische Bindung des [³H]-Colchicin zu ermitteln.

Die zu untersuchenden Substanzen werden in einer Konzentration von 10 µM vermessen [118, 119].