

⑤

Int. Cl. 2:

**C 07 C 69/40**

⑯ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

C 07 C 61/36

C 07 C 69/145

C 07 C 69/95

C 07 C 93/197

C 07 D 295/16

**DEUTSCHES PATENTAMT**



Behördeneigentum

**DT 27 11 081 A 1**

⑪

# **Offenlegungsschrift 27 11 081**

⑫

Aktenzeichen: P 27 11 081.2

⑬

Anmeldetag: 14. 3. 77

⑭

Offenlegungstag: 29. 9. 77

⑳

Unionspriorität:

㉒ ㉓ ㉔

15. 3. 76 Großbritannien 10207-76

⑤④

**Bezeichnung:** Tritiumderivate der Glycyrrhetinsäure und Verfahren zu ihrer Herstellung

⑦①

**Anmelder:** Biorex Laboratories Ltd., London

⑦④

**Vertreter:** Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys. Dr.;  
Weickmann, F.A., Dipl.-Ing.; Huber, B., Dipl.-Chem.; Pat.-Anwälte,  
8000 München

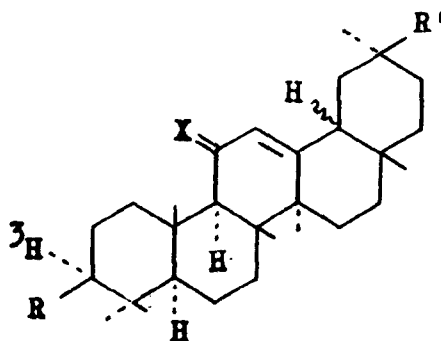
⑦⑦

**Erfinder:** Turner, John Cameron, West Wickham, Kent (Großbritannien)

**DT 27 11 081 A 1**

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Tritiumderivate der Glycyrrhetinsäure der allgemeinen Formel



in der

- 5 R eine freie oder veresterte Hydroxygruppe,  
R' eine freie oder veresterte Carbonsäuregruppe  
oder eine unsubstituierte oder substituierte  
Amidgruppe und  
X zwei Wasserstoffatome oder ein Sauerstoff-  
atom  
10 bedeuten, sowie die Salze dieser Verbindungen,  
die mindestens eine freie Carbonsäuregruppe auf-  
weisen.

2.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure.

3.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Carbenoxolon.

15 4. Natriumsalz des  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Carbenoxolons.

5. Basisches Aluminiumsalz des  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Carbenoxolons.

6.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ - $3\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure.
7.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ - $3\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäurecinnamylester.
8.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetyl- $3\beta$ -O-cyclohexan-1,2-dicarboxylat.
9. Piperazinsalz der  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure.
- 5 10.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäuredimethylaminoäthylester.
11.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ - $3\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure-N-methyl-piperazinamid.
12.  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure-N-methyl-piperazinamid.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h - n e t, daß man die 3-Keto-glycyrrhetinsäure oder einen ihrer Ester mit Natriumbortritiid zu  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure oder einem ihrer Ester reduziert und anschließend gewünschtenfalls das er-  
15 haltene Produkt in einen Ester, ein Amid oder ein Salz überführt.

Biorex Laboratories  
Limited

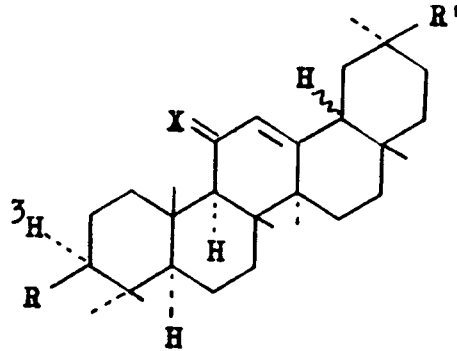
---

Die Erfindung betrifft Tritiumderivate der Glycyrrhetinsäure und ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Verschiedene Derivate der Glycyrrhetinsäure werden in großem Umfang zur Behandlung von Geschwüren und Entzündungszuständen verwendet. Eines der bestbekanntesten und am häufigsten verwendeten Derivate der Glycyrrhetinsäure ist sein Hemisuccinat, das zur Behandlung von Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüren geeignet ist. Das Dinatriumsalz des Glycyrrhetinsäure-Hemisuccinats, das auch als Carbenoxolon-Natrium bekannt ist, kann mit Hilfe von spektrophotometrischen Methoden (siehe Coleman und Parke, J.Pharm.Pharmacol. 15 (1963) 841 bis 845) oder gaschromatographisch (vg. Rhodes and Wright, J.Pharm.Pharmacol. 26 (1974) 894 bis 898) in biologischen Fluiden nachgewiesen werden.

In jüngster Zeit sind arzneimittelspezifische Antikörper zur schnellen, empfindlichen und spezifischen immunologischen Bestimmung von verschiedenen Arzneimitteln verwendet worden (siehe Butler, J.Immunol.Methods 7 (1975) 1 bis 24).

Um diese hochentwickelte und elegante Bestimmungsmethode auch für Glycyrrhetinsäurederivate anwendbar zu machen, werden erfindungsgemäß Tritiumderivate der Glycyrrhetinsäure der allgemeinen Formel



in der

R für eine freie oder veresterte Hydroxygruppe,

R' für eine freie oder veresterte Carbonsäuregruppe  
oder eine unsubstituierte oder substituierte

5 Amidgruppe und

X für zwei Wasserstoffatome oder ein Sauerstoffatom  
stehen, sowie die Salze jener Verbindungen, die  
mindestens eine freie Carbonsäuregruppe aufweisen,  
geschaffen.

10 Durch statistische Anlagerung von Tritium gebildete  
Tritiumderivate der Glycyrrhetinsäure sind bereits  
bekannt. Um Tritium-Glycyrrhetinsäure oder ihre  
Tritiumderivate zur Durchführung von immunologischen  
Bestimmungsmethoden in zufriedenstellender Weise ver-  
15 wenden zu können, ist es erforderlich, daß mindestens  
ein spezifisches Wasserstoffatom (<sup>1</sup>H) durch Tritium  
(<sup>3</sup>H) ersetzt wird, um eine Verbindung mit bekannter  
spezifischer Aktivität zu erhalten.

20 Es hat sich nunmehr gezeigt, daß wenn man 3-Keto-  
glycyrrhetinsäure oder einen ihrer Ester mit Natrium-  
bortritiid (NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>) reduziert, die 3β-Hydroxygruppe der  
Glycyrrhetinsäure zurückgebildet wird und in die

3 $\alpha$ -Stellung ein Tritiumatom (<sup>3</sup>H) eingeführt wird. Die 3 $\beta$ -Hydroxygruppe der in dieser Weise erhaltenen Tritium-glycyrrhetinsäure kann gewünschtenfalls in üblicher Weise mit Monocarbonsäuren oder Polycarbonsäuren zu den entsprechenden 3-Estern verestert werden oder man kann die Carbonsäuregruppe der 3 $\alpha$ -Stellung in bekannter Weise verestern oder in das Amid überführen, so daß man die entsprechenden Ester oder Amide erhält.

10 Einzelheiten der Verfahren, die zur Herstellung von Salzen, Säuren und Amidn ausgehend von der 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure hergestellt werden können, finden sich beispielsweise in den britischen Patentschriften 843 133, 843 135, 870 651, 894 265, 950 777, 1 022 869, 15 1 022 968, 1 032 710, 1 060 344, 1 212 610, 1 255 098, 1 255 672, 1 273 598, 1 326 962, 1 387 499, 1 433 559 und 1 438 612 der Anmelderin.

Die Reduktion mit Natriumbortritiid erreicht man in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Methanol, Äthanol, 20 wäßrigem Methanol, wäßrigem Äthanol oder wäßriger Natriumhydroxidlösung, wobei man als Lösungsmittel vorzugsweise eine etwa 50 volumenprozentige wäßrige Äthanol-lösung verwendet, die etwa 1 Gew.-% Natriumhydroxid enthält.

25 Die für die Reduktion angewandte Temperatur ist nicht kritisch und kann sich beispielsweise von -10°C bis +70°C erstrecken, wobei man vorzugsweise bei Raumtemperatur arbeitet und dann die Reaktion durch mäßiges Erwärmen beendet.

30 Um das Natriumbortritiid so weit wie möglich auszunutzen, ist es von Vorteil, die 3-Keto-glycyrrhetinsäure in geringfügigem Überschuß zu verwenden und anschließend

überschüssiges Natriumborhydrid zuzusetzen, um die überschüssige 3-Keto-glycyrrhetinsäure zu reduzieren.

Obwohl, wie bereits angegeben wurde, die durch die Reduktion von 3-Keto-glycyrrhetinsäure gebildete  
5  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure in üblicher Weise verestert werden kann, führt man die Veresterung vorzugsweise in einem geschlossenen Rohr durch, um die Nebenreaktionen auf einem Minimum zu halten, die bei radioaktiven Verbindungen leichter ablaufen.

10 Da das erhältliche Natriumbortritiid stets eine gewisse Menge Natriumborhydrid enthält, enthält auch die gebildete  $3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure stets eine gewisse Menge der  $3\alpha$ - $^1\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure. Ebenso enthalten die  
15 daraus gebildeten Ester stets eine gewisse Menge des nichtradioaktiven Materials. So besitzt im Fall des Hemisuccinats das erhaltene Produkt eine spezifische Aktivität von bis zu etwa 10 mCi/mg, während das rein radioaktive Hemisuccinat eine spezifische Aktivität von 47 mCi/mg besitzt.

20 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Die chemische Identität der Produkte wurde durch Dünnschichtchromatographie im Vergleich mit authentischen, nicht radioaktiv markierten Materialien nachgewiesen.

25 Beispiel 1

$3\alpha$ - $^3\text{H}$ -Glycyrrhetinsäure

Zu einer Lösung von 100 mg 3-Keto-glycyrrhetinsäure in einer Mischung aus 0,7 ml Äthanol und 0,3 ml einer wäßrigen 1n-Natriumhydroxidlösung gibt man eine Lösung  
30 von 750 mCi Natriumbortritiid (mit einer spezifischen Aktivität von 390 mCi/mg) in einer Mischung aus 0,4 ml einer wäßrigen 0,1n-Natriumhydroxidlösung und 0,1 ml Äthanol. Man läßt die Reaktionsmischung während einer

Stunde bei Raumtemperatur stehen und erwärmt dann während 15 Minuten auf 40°C. Dann gibt man 5 mg Natriumborhydrid zu und hält die Temperatur der Reaktionsmischung während weiterer 15 Minuten auf 40°C. Dann versetzt man die Reaktionsmischung mit 5 ml Chloroform und 1 ml einer 0,1n-Chlorwasserstoffsäure, trennt die organische Schicht ab, wäscht sie zweimal mit jeweils 2 ml Wasser und dampft sie dann zur Trockene ein, wobei man die 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure erhält.

10 Beispiel 2

3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Carbenoxolon

Man erhitzt die gemäß Beispiel 1 erhaltene 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure während 16 Stunden im Vakuum in einem verschlossenen Rohr mit 100 ml Bernsteinsäureanhydrid und 0,2 ml Pyridin auf 130°C. Dann vermischt man die Reaktionsmischung mit 5 ml Chloroform und 3 ml 1n-Chlorwasserstoffsäure, trennt die Chloroformschicht ab und wäscht sie dreimal mit jeweils 3 ml Wasser. Man dampft die Chloroformlösung zur Trockene ein und erhält 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Carbenoxolon.

Den erhaltenen Rückstand löst man in der minimalen Menge 50%igen wäßrigen Acetons, das einen geringen Überschuß Natriumhydroxid enthält. Man gibt weiteres Aceton zu, wodurch 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Carbenoxolon-natrium auskristallisiert. Man filtriert das Produkt ab, wäscht und trocknet es und erhält 110 mg 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Carbenoxolon-Natrium, das man in Form einer 0,5%igen Lösung in Äthanol aufbewahren kann.

Die Identität und die Reinheit des Produkts wird dünn-schichtchromatographisch auf einer Siliciumdioxidschicht unter Verwendung einer Mischung aus 5 Volumenteilen n-Butanol und 1 Volumenteil einer wäßrigen Ammoniaklösung (Dichte 0,88 g/cm<sup>3</sup>) als Entwicklungslösungsmittel, gefolgt von einer Autoradiographie, bestätigt.

709839/0842



Das Produkt besitzt eine Reinheit von mehr als 99%.  
Die durch Szintillationszählung ermittelte spezifische  
Aktivität des Produkts beträgt  $630/100 = 5,7$  mCi/mg.

5 Zur Bereitung des entsprechenden basischen Aluminium-  
salzes löst man  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-Carbenoxolon in warmem n-Propa-  
nol. Dann gibt man die doppelte molare Menge frisch  
destilliertes Aluminiumisopropylat in einer Lösung in  
warmem Isopropylalkohol zu und gießt die beiden sie-  
denden Lösungen gleichzeitig in ein Becherglas, worauf  
10 man das gebildete Gel mit Wasser versetzt. Man dampft  
die Mischung dann auf einem siedenden Wasserbad zur  
Trockene ein und erhält das gewünschte basische  
Aluminiumsalz in Form eines Pulvers.

Beispiel 3

15  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-3 $\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure

Man erhitzt 50 ml  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure (spezifi-  
sche Aktivität = 4,7 mCi/mg) mit 0,5 ml Essigsäure-  
anhydrid während 1 Stunde zum Sieden am Rückfluß. Dann  
gibt man zu der heißen Lösung 0,5 ml Essigsäure und  
20 0,2 ml Wasser. Man filtriert das beim Abkühlen aus-  
kristallisierende Produkt ab, wäscht es mit einer ge-  
ringen Menge Essigsäure und dann mit Wasser und trock-  
net es, wobei man 45 mg  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-3 $\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetin-  
säure erhält, die im Vergleich zu Acetyl-glycyrrhetin-  
säure dünn-schichtchromatographisch rein ist. Die  
25 spezifische Aktivität des Produkts beträgt 4,3 mCi/mg.

Beispiel 4

3 $\beta$ -O-Acetyl- $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-glycyrrhetinsäure-cinnamylester

Man wandelt 91 mg  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-3-O-Acetyl-glycarrhetinsäure  
30 in das entsprechende Säurechlorid um, indem man ent-  
weder die Säure mit überschüssigem Thionylchlorid  
während 1 Stunde erwärmt und dann das überschüssige  
Thionylchlorid verdampft, oder indem man  $3\alpha$ -<sup>3</sup>H-

709839/0842

Glycyrrhetinsäure mit überschüssigem Acetylchlorid zum Sieden am Rückfluß erhitzt, das überschüssige Acetylchlorid verdampft und Petroläther zusetzt.

5 Dann gibt man 0,2 ml wasserfreies Pyridin und 100 mg Cinnamylalkohol zu und erhitzt die Reaktionsmischung in einem verschlossenen Rohr unter Stickstoff während 4 Stunden auf 130°C. Man löst die Mischung in 3 ml Äthylacetat und wäscht mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure und Wasser. Durch Verdampfen des Äthylacetats  
10 erhält man den gewünschten 3 $\beta$ -O-Acetyl-3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-glycyrrhetinsäure-cinnamylester, den man durch präparative Dünnschichtchromatographie weiter reinigt (wozu man als Lösungsmittelsystem eine Petroläther/Aceton/Diäthyläther-Mischung, 8/1/8 verwendet).  
15 Das Produkt besitzt eine spezifische Aktivität von 3,5 mCi/mg.

Beispiel 5

3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetyl-3 $\beta$ -O-cyclohexan-1,2-dicarboxylat

20 Diese Verbindung bereitet man in ähnlicher Weise wie das Hemisuccinat (vgl. Beispiel 2) unter Verwendung von cis-1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid anstelle von Bernsteinsäureanhydrid.

Beispiel 6

Piperazinsalz der 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure

25 Man löst 20 mg Piperazin-hexahydrat in 2 ml siedendem Wasser und gibt dann 90 mg 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure, die man mit Wasser angeteigt hat, zusammen mit 2 ml Äthanol zu. Man erhitzt die Reaktionsmischung auf einem Wasserbad, filtriert eine geringe Menge eines unlöslichen Materials ab und dampft das Filtrat ein. Den  
30 Rückstand trocknet man im Vakuum über festem Kaliumhydroxid, wobei man das gewünschte Piperazinsalz der 3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure erhält.

709839/0842

Beispiel 7

$3\alpha$ - $^3$ H-Glycyrrhetinsäure-dimethylaminoäthylester

Man löst 17 mg Diäthylaminoäthylchlorid-hydrochlorid  
in 2 ml kaltem Wasser, gibt 2 ml einer gesättigten  
5 wäßrigen Kaliumcarbonatlösung zu und extrahiert die  
Mischung mit 2 ml Diäthyläther. Dann filtriert man  
den Extrakt und trocknet ihn über wasserfreiem Kalium-  
carbonat. Man suspendiert 24 mg  $3\alpha$ - $^3$ H-Glycyrrhetin-  
säure in 3 ml kaltem, wasserfreiem Isopropylalkohol und  
10 gibt dann die Lösung der Base in Äther zu. Man erhitzt  
die Reaktionsmischung zur Entfernung des Äthers auf  
einem Dampfbad und erhitzt dann während 3 Stunden zum  
Sieden am Rückfluß. Man dampft die Lösung auf etwa die  
Hälfte ihres Volumens ein und läßt sie dann über Nacht  
15 stehen. Das erhaltene rohe Produkt wird aus absolutem  
Äthanol umkristallisiert und ergibt den reinen  
 $3\alpha$ - $^3$ H-Glycyrrhetinsäure-dimethylaminoäthylester.

Beispiel 8

20  $3\alpha$ - $^3$ H-3 $\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure-N-methyl-  
piperazinamid

Man erhitzt  $3\alpha$ - $^3$ H-3-O-Acetyl-glycyrrhetinsäurechlorid  
(das man gemäß der in Beispiel 4 angegebenen Verfahrens-  
weise bereitet hat) während 1 Stunde in Gegenwart eines  
vierfachen Überschusses von N-Methyl-piperazin auf  
25 80°C. Dann gießt man die Reaktionsmischung in kaltes  
Wasser und filtriert das ausgeschiedene Reaktionsprodukt  
ab, wäscht es mit kaltem Wasser und trocknet es. Nach  
der Umkristallisation aus einer Dichlormethan/Petrol-  
äther-Mischung und aus absolutem Äthanol erhält man  
30 reines  $3\alpha$ - $^3$ H-3 $\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure-N-methyl-  
piperazinamid.

Beispiel 9

3  $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetinsäure-N-methyl-piperazinamid

Man erhitzt 3  $\alpha$ -<sup>3</sup>H-3 $\beta$ -O-Acetyl-glycyrrhetinsäure-N-  
5 methylpiperazinamid (das man gemäß Beispiel 8 erhalten  
hat) während 2 Stunden in 50%igem wäßrigem Äthanol,  
das Kaliumhydroxid enthält, auf 90°C. Dann gießt man  
die Reaktionsmischung in kaltes Wasser, filtriert den  
gebildeten Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser und  
trocknet ihn. Nach der Umkristallisation aus wäßrigem  
10 Dimethylformamid erhält man reines 3  $\alpha$ -<sup>3</sup>H-Glycyrrhetin-  
säure-N-methyl-piperazinamid.

709839/0842

~~1~~