

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

274 287

(21) PV 9883-86.F

(22) Přihlášeno 27 12 86

(30) Právo přednosti od 27 12 85 DE

(P 35 46 218.3)

(40) Zveřejněno 14 08 90

(45) Vydáno 08 07 92

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵

C 07 D 471/20

C 07 D 451/02//

A 61 K 31/435

(72) Autor vynálezu

GRIMMINGER WOLF dr.,
GÖRLER KLAUS dr., BERGISCHE GLADBACH
ODENTHAL KARL PETER dr., GREVENBROICH (DE)

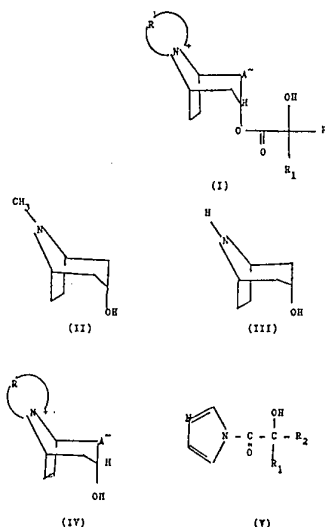
(73) Majitel patentu

MADAUS AKTIENGESSELLSCHAFT, KÖLN (DE)

(54)

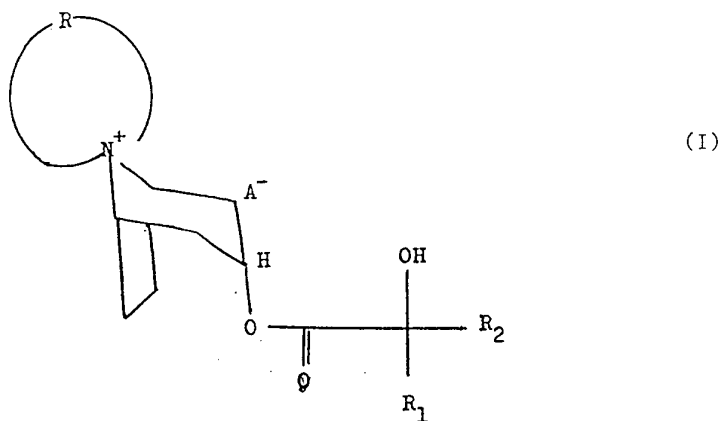
Způsob výroby azoniaspironortropanolových
esterů

(57) Řešení spočívá ve způsobu výroby esterů obecného vzorce I, v němž R znamená substituovaný alkylenový zbytek, oxaalkylový zbytek, o-fenylový zbytek, perinaftylenový zbytek nebo 2,3-chinoxylinový zbytek, R_1 a R_2 , stejné nebo různé, znamenají fenyl, alkylfenyl, alkoxyfenyl nebo halogenfenyl, přičemž alkylová skupina a alkoxy skupina v těchto zbytcích má přímý nebo rozvětvený řetězec a obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku a A^- znamená anion jednosytné až trojsytné anorganické kyseliny tak, že se A) demethyluje tropin vzorce II na nortropin, B) takto získaný nortropin vzorce III se uvede do reakce v dipolárním aprotickém rozpouštědle se sloučeninou obecného vzorce A-R-A, kde A a R mají svrchu uvedený význam, za přítomnosti sekundárního nebo terciárního aminu při teplotě místnosti po dobu jednoho nebo většího počtu dnů a C) takto získaná sloučenina obecného vzorce IV, kde R a A^- mají svrchu uvedený význam se esterifikuje v bezvodém dipolárním aprotickém rozpouštědle s imidazolinem obecného vzorce V, kde R_1 a R_2 mají svrchu uvedený význam za přítomnosti katalyzátoru. Tyto látky je možno užít jako spasmolytika zejména proti spasmům bronchů a zažívací soustavy.



Vynález se týká způsobu výroby nových esterů azoniaspironortropanolu. Tyto látky je možno zpracovat na farmaceutické prostředky s vyjádřeným antispasmodickým účinkem.

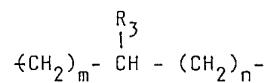
Nové estery je možno vyjádřit obecným vzorcem I



kde

R znamená

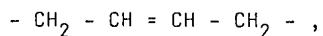
a) alkylenový zbytek obecného vzorce



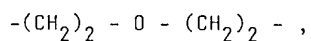
kde

R_3 znamená atom vodíku nebo alkyl, o 1 až 4 atomech uhlíku, a
n a m znamená celé číslo 1 až 4,

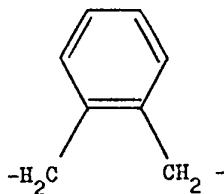
b) alkenylový zbytek obecného vzorce



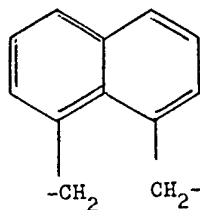
c) oxaalkylový zbytek obecného vzorce



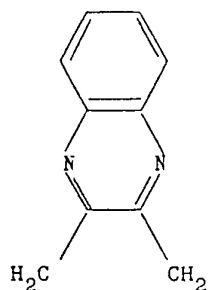
d) o-fenylenový zbytek vzorce



e) perinaftylenový zbytek vzorce



h) 2,3-chinoxalinový zbytek vzorce

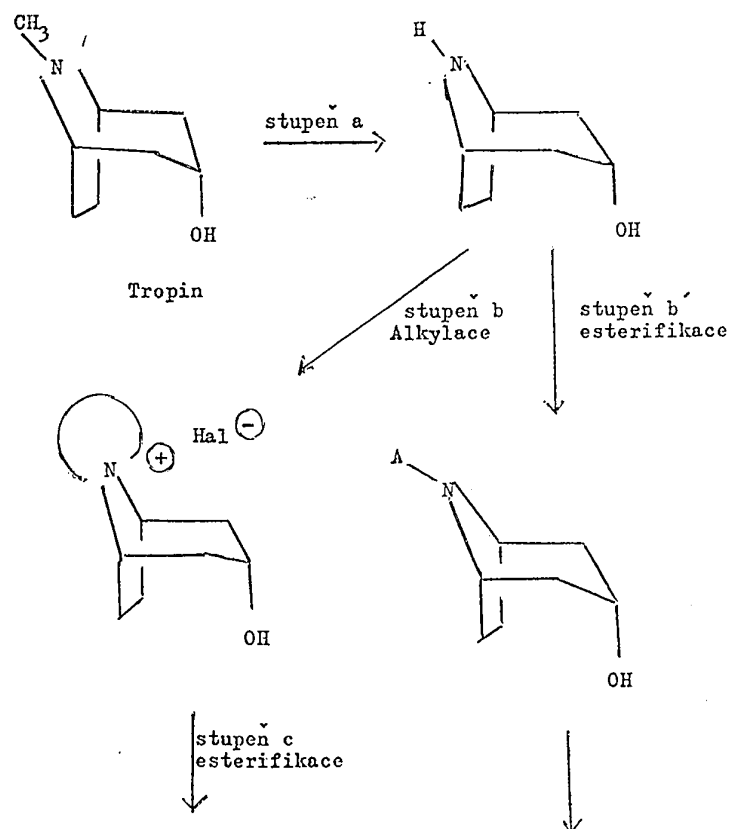


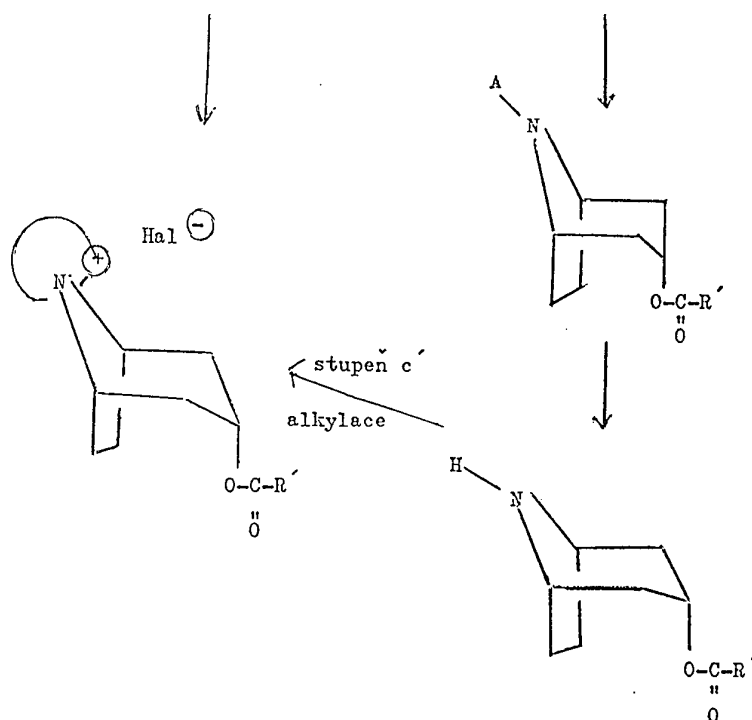
kde

R_1 a R_2 , stejné nebo různé, znamenají fenyl, alkylfenyl, alkoxyfenyl nebo halogenfenyl, přičemž alkokyskupina a alkylová skupina v těchto zbytcích má přímý nebo rozvětvený řetězec a obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku,

A^- znamená anion jednosytné až trojsytné anorganické kyseliny,

Způsob výroby nových svrchu uvedených derivátů azoniaspironortropanu je možno vyjádřit následujícím reakčním schématem:





Ve svrchu uvedeném schematu znamená R' zbytek karboxylové kyseliny a A ochrannou skupinu na aminoskupině.

Oxidativní demethylace tropinu na nortropin ve stupni A byla popsána S. P. Findleyem v J. Am. Chem. Soc. 75, 3204 (1953). Tento postup, který se provádí v přesyceném roztoku tropinu při teplotě 15 °C a probíhá 4 až 7 dnů, není proveditelný v technickém měřítku, protože za těchto reakčních podmínek není možno udržet koncentraci tropinu, nutnou k průběhu reakce na stálé hodnotě, protože se tropin samovolně sráží, čímž je bržděna další reakce. Žádného podstatného zlepšení nebylo dosaženo ani homogenizací vysráženého tropinu v homogenizátoru.

Je také známo, že demethylace je možno dosáhnout výměnou methylové skupiny za N-alkoxykarbonylovou skupinu s následnou hydrolýzou získaného alkoxykarbamátu, jak bylo popsáno v publikaci J. C. Kirn, Org. Prep. Proc. Int., 2, 1 - 4 (1977). Pro 8-ethoxykarbonylnortropin byl v literatuře popsán nejlepší výtěžek nortropinu 16 %, vztaženo na tropin, jak bylo popsáno v publikaci G. Kraiss, K. Nador, Tetr. Lett., str. 7, 8 1971. Později se dokonce vyskytlo tvrzení, že štěpení 8-ethoxykarbonylnortropinu v kyselém nebo alkalickém prostředí je neproveditelné, jak bylo uvedeno v publikaci I. A. Monzka, J. D. Matiskella, R. A. Partyka, Tetr. Lett., 1974, str. 1325 až 1327.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že je možno získat azoniaspironortropanolester v dobrém výtěžku tak, že se demethylace propinu uskutečňuje za přítomnosti chloralkanu o 1 až 3 atomech uhlíku s obsahem skupiny CCl₃-, takto získaný nortropin se alkyluje působením dihalogenidů za přítomnosti aminu a odpovídající azoniaspirosloučenina se esterifikuje reakcí s imidazolidem kyseliny za přítomnosti katalyzátoru.

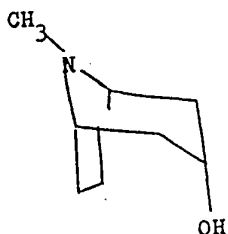
Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby esterů azoniaspironortropanolu obecného vzorce I, v němž R, R₁, R₂ a A⁻ mají svrchu uvedený význam,

- demethylací tropinu na nortropin,
- reakcí nortropinu s dihalogenidy na odpovídající azoniasloučeniny a

c) tyto sloučeniny se esterifikují,

vyznačující se tím, že se

A) demethylace tropinu vzorce II

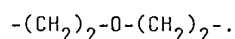
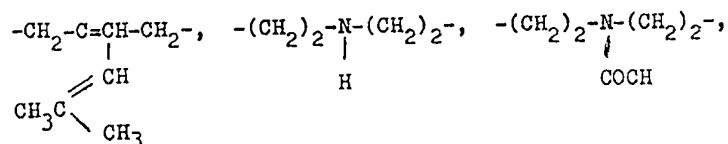
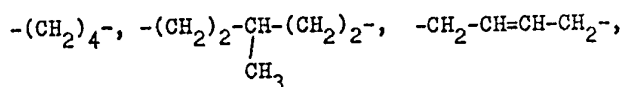


(II)

na nortropin provádí tak, že se na tropin působí chloralkanem o 1 až 3 atomech uhlíku s obsahem alespoň jedné skupiny CCl_3 za přítomnosti oxidačního činidla v alkalickém vodném roztoku, nebo se tropin uvede do reakce s esterem kyseliny chlormravenčí za přítomnosti činidla, které váže kyselinu za vzniku 8-alkoxykarbonylnortropinu a tato látka se hydrolyzuje působením zásady ve vodném roztoku.

Anion A^- je s výhodou halogenidový ion, například chloridový, bromidový nebo jodidový, dále fosforečnanový, síranový nebo dusičnanový ion.

Příkladem pro zbytek R mohou být následující řetězce:



Alkylové zbytky a alkylové části jiných zbytků mohou mít přímý nebo rozvětvený řetězec a obsahují 1 až 18 atomů uhlíku, s výhodou 1 až 6 a zvláště 1 až 4 atomy uhlíku. Vhodnými zbytky jsou například methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, hexyl, lauryl a stearyl.

Výhodnými acylovými zbytky jsou acetyl nebo benzoyl.

D) V případě, že zbytek R obsahuje jednu nebo větší počet dvojných vazeb v azoniovém kruhu po provedení stupňů B a/nebo C, je možno tyto nenasycené sloučeniny hydrogenovat v polárním rozpouštědle pomocí katalyzátoru na bazi ušlechtilých kovů na odpovídající nasycené sloučeniny, čímž se získají sloučeniny obecného vzorce I, v nichž R má význam, uvedený za a).

Stupeň A

Tento stupeň umožňuje demethylaci tropinu i v technickém měřítku a poskytuje nortropin ve vyšším výtěžku ve srovnání se známým stavem techniky. Způsob je možno provést ve dvou provedeních, z nichž jedním provedením je oxidativní demethylace a druhým je karbamá-

tový způsob.

Výhody oxidativní metody spočívají v použití chloralkanu o 1 až 3 atomech uhlíku s obsahem alespoň jedné skupiny CCl_3 -, tato látka je jemně dispergována ve vodné fázi.

Vhodným chloralkanem je například 1,1,1-trichlorethan a 1,1,1-trichloropropan, s výhodou chloroform. Množství chloralkanu se pohybuje v rozmezí 1 až 10 % objemových, s výhodou 1 až 5 % objemových a zvláště 2 až 4 % objemová.

Při demethylaci je možno užít jakékoliv oxidační činidlo, vhodné pro tento účel, s výhodou však se užívá hexakynoželesitan draselný.

Postup je možno provádět v širokém teplotním rozmezí, například v rozmezí 0 až 100 °C, s výhodou se však postup provádí při teplotě 20 až 30 °C. Po ukončené reakci se produkt extrahuje v protiproudu, s výhodou při použití rozpouštědla, použitého pro demethylační reakci.

Oxidativní metoda přináší podstatnou úsporu času ve srovnání se známými postupy, což dále zvyšuje hospodárnost způsobu podle vynálezu.

Postup se však s výhodou provádí karbamátovou metodou. K tomuto účelu se uvede do reakce tropin v inertním rozpouštědle se čtyřnásobným až šestnásobným přebytkem esteru kyseliny chlormravenčí, obvykle ethylesteru kyseliny chlormravenčí. Jako rozpouštědlo se s výhodou použije chlorovaný uhlovodík, zvláště chloroform. Reakce se provádí za přítomnosti činidla, které váže kyselinu, s výhodou za přítomnosti uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu alkalického kovu. S výhodou se udržuje reakční směs na vyšší teplotě 40 až 80 °C.

Takto získaný 8-alkoxykarbonylnortropin se po oddestilování převážné části rozpouštědla hydrolyzuje působením zásady ve vodném roztoku. Použitou zásadou je s výhodou hydroxid draselný nebo sodný, který se s výhodou užije v šestnáctinásobném až dvacetinásobném přebytku.

Nortropin se extrahuje z vodné reakční směsi způsobem, který byl popsán svrchu pro oxidativní demethylaci.

Ve stupni A je možno získat nortropin v téměř kvantitativním výtěžku, zejména karbamátovou metodou.

Stupeň B

Surový nortropin, získaný ve stupni A je možno užít ve stupni B bez předchozího čištění, které by bylo možné provést podle současného stavu techniky 48 hodinovou kontinuální extrakcí a krystalizací z diethyletheru. Bylo neočekávaně zjištěno, že tropin, který je stále ještě přítomen v surovém nortropinu jako nečistota, není kvarternisován za reakčních podmínek stupně B.

Rozpouštědlo, které je vhodné pro kvarternizaci nortropinu je například N,N-dimethylformamid, chloroform nebo směs chloroformu a acetonitrilu. Při použití dihalogenidů za přítomnosti sekundárních nebo terciárních aminů se vysráží po jednodenní nebo vícedenní reakční době při teplotě místnosti odpovídající azoniaspirosloučenina v čisté formě a ve vysokém výtěžku. Pracuje se s výhodou v bezvodém roztoku, přičemž se užije nortropin, amin a dihalogenid v molárním poměru 1 : 2 : 4. Jak již bylo uvedeno, je produkt, který se získá ve vysokém výtěžku velmi čistý, takže není nutno jej dále čistit.

Sekundárními aminy, vhodnými pro tuto reakci jsou například dimethylamin, diethylamin, diisopropylamin, dicyklohexylamin a podobně. Vhodnými terciárními aminy jsou trimethylamin, triethylamin, pyridin, chinolin a podobně, nejvýhodnějším aminem je diethylamin.

Stupeň C

Azoniaspirosloučeniny, získané ve stupni B a také imidazolidy karboxylových kyselin jsou velmi těžce rozpustné v rozpouštědlech, která se běžně užívají pro reakce tohoto

typu, jako jsou bezvodá dipolární aprotická rozpouštědla, například aceton, acetonitril, dimethylformamid, tetrahydrofuran a podobně. V případě, že se problémy, vznikající tímto způsobem překonávají jako obvykle, zvýšením reakční teploty, je vznikající výsledný produkt znečištěn vysokým podílem vedlejších produktů. Zvláště dochází k tomu, že imidazolidy karboxylových kyselin, jejichž hydroxyskupina není chráněna, reagují vzájemně při zvýšené teplotě.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že reakci sloučeniny obecného vzorce IV s imidazolidem karboxylové kyseliny obecného vzorce V je možno provádět za přítomnosti vhodného katalyzátoru také ve svrhu uvedeném bezvodém dipolárním aprotickém rozpouštědle v případě, že se v něm reakční složky uvedou do suspenze. Výhoda tohoto postupu spočívá v tom, že není zapotřebí chránit volnou hydroxyskupinu v imidazolidu karboxylové kyseliny a reakční produkt se ze svrhu uvedeného rozpouštědla vysráží a je tedy možno jej izolovat jednoduchým způsobem. Reakční produkt není znečištěn výchozími látkami, jak by bylo nutno očekávat při použití výchozích látek v pevné formě. Mimo to probíhá reakce za tak mírných podmínek, že nedojde k žádné fragmentační a eliminační reakci, při níž by opět vznikala amoniová skupina. Proto také nevznikají žádné odpovídající vedlejší produkty.

Výhodným katalyzátorem pro tento postup je 4-(dimethylamino)-pyridin. Tato sloučenina se užíje v množství 1 až 30 mol %, vztaženo na imidazolid kyseliny benzoové, s výhodou v množství 5 až 10 mol %.

Jako rozpouštědlo se užití svrhu uvedená bezvodá dipolární aprotická rozpouštědla. Postup se provádí při vyšší teplotě, s výhodou při teplotě 60 až 80 °C.

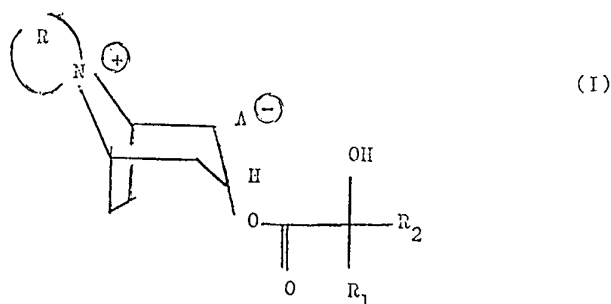
Imidazolidy karboxylových kyselin, užití při této reakci se získávají známým způsobem reakcí N,N-karbonyldiimidazolu s odpovídající karboxylovou kyselinou v bezvodém dichlormethanu.

Stupeň D

Protože při kvarternizaci podle stupně B) s dihalogenidy, substituovanými na dvojné vazbě, například s cis-1,4-dichlorbutanem dochází ke zvýšené reakční rychlosti, například ke zkrácení reakce z 18 dnů na 1 hodinu, může být výhodné při výrobě sloučeniny obecného vzorce I, v němž R má význam, uvedený v odstavci a), například při výrobě benzoyloxynorpropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniových solí volit cestu přes odpovídající nenasycené sloučeniny s koncovou katalytickou hydrogenací po dovršení stupně B) nebo stupňů B) a C).

Hydrogenace nenasycených sloučenin se provádí v polárním rozpouštědle, například ve vodě s případnou příměsí alkoholu s 1 až 4 atomy uhlíku, zejména s příměsí methanolu za přítomnosti katalyzátoru ze skupiny ušlechtilých kovů jako jsou oxid platiničitý nebo palladium na aktivním uhlí. Při použití nenasycených halogenidů se při kvarternizaci užíje podstatně menší přebytek těchto sloučenin. Výhodný molární poměr nortropinu, aminu a dihalogenidu je 1 : 2 : 4, je však možno jej ve stupni B) upravit až na 1 : 2 : 2.

Sloučeniny obecného vzorce I



kde R , R_6 , R_7 a A^- mají svrchu uvedený význam, mají výrazné spasmolytické vlastnosti. Tyto látky je možno zpracovat na farmaceutické prostředky, které je možno užít k léčbě astmatu a křečí průdušek. Sloučeniny mají parasympatickolytický účinek bez systemických vedlejších účinků, zejména bez ovlivnění krevního oběhu, sloučeniny jsou přitom v organismu snadno dostupné.

Jako příklad výhodných sloučenin podle vynálezu je možno uvést následující látky:

1. Trospiumchlorid, tj. (3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidinium)-chlorid, teplota tání 258 - 263 °C za rozkladu, hmotové spektrum: $m/e = 392$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném spektru v KBr má maxima při 3150, 1735, 1498, 1452, 747 cm^{-1} .
2. 2 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)-chlorid, teplota tání 267 °C, hmotové spektrum $m/e = 390$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle v KBr má maxima při 1722, 1595, 1490, 1445, 741 cm^{-1} .
3. 3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-2'-isoindoliniumchlorid, teplota tání 263 - 265 °C, hmotové spektrum $m/e = 440$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle v KBr má maxima při 1740, 757, 745, 703 cm^{-1} .
4. 3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchlorid, teplota tání 225 °C (za rozkladu), hmotové spektrum $m/e = 408$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle v KBr má maxima při 3410, 3183, 1731, 1492, 703 cm^{-1} .
5. 3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidino [3',4'-b]-chinoxaliniumbromid, teplota tání 205 °C (za rozkladu), hmotové spektrum $m/e = 492$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 3375, 1730, 1504, 763 cm^{-1} .
6. 3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-2'-(2'-aza-3H-fenalenium)bromid, teplota tání 322 °C (za rozkladu), hmotové spektrum $m/e = 490$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 3428, 3240, 1738, 1603, 1497 cm^{-1} .
7. 3 $\mathcal{L}$ -benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-(4'-methyl)piperidiniumchlorid, teplota tání 256 - 259 °C, hmotové spektrum $m/e = 420$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 1735 cm^{-1} .
8. 3 $\mathcal{L}$ -(4,4'-difluor)-benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid, teplota tání 242 - 245 °C, hmotové spektrum $m/e = 428$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 1508, 1603, 1733 cm^{-1} .
9. 3 $\mathcal{L}$ -(4,4'-dimethyl)-benzoyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid, teplota tání 275 °C, hmotové spektrum $m/e = 420$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 1508, 1612, 1718 cm^{-1} .
10. 3 $\mathcal{L}$ -(4,4'-di-n-butyloxybenzoyloxy)nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid, hmotové spektrum $m/e = 536$ (molekulární kation), spektrum v infračerveném světle KBr má maxima při 1508, 1580, 1608, 1734 cm^{-1} .

Příklad 1

3 $\mathcal{L}$ -Benzoyloxy-nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

Stupeň A: Demethylace tropinu na nortropin

V nádobě o objemu 300 litrů, opatřené míchadlem a zpětným chladičem se rozpustí 1,9 kg propinu o koncentraci 97 %, což odpovídá 1,843 kg čisté látky, tj. 13 molů, ve 240 litrech chloroformu, načež se za míchání přidá 5,7 kg práškovaného hydrogenuhličitanu sodného a 5,3 litry ethylchloromravenčanu o koncentraci vyšší než 98 %, což odpovídá 6,0 kg, 55,7 mol čisté látky. Pak se reakční směs zahřívá k teplotě varu a pak se 2 hodiny vaří pod zpětným chladičem. Průběh reakce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě silikage-lu (Kieselgel 60) při použití směsi dimethylformamidu, diethylaminu, ethanolu a ethylacetátu v objemovém poměru 5 : 10 : 30 : 60. Horká reakční směs se zfiltruje a chloroform se oddestiluje. K odparku se přidá roztok 18 kg hydroxidu draselného v 90 litrech vody, kon-

centrace užitého hydroxidu je 85 %. Pak se směs znovu zahřeje na teplotu varu, načež se vaří ještě 9 hodin pod zpětným chladičem. Zchlazený roztok se pak extrahuje chloroformem při použití Karrovy kolony. Extrakční podmínky jsou následující: stacionární fází je lehká fáze, tj. roztok hydroxidu draselného, který se přivádí rychlostí přibližně 14 litrů za hodinu. Dispergovanou fází je těžká chloroformová fáze, která se přivádí rychlostí 35 až 40 litrů za hodinu. Reakční směs se míchá při frekvenci 20 min^{-1} při teplotě 28 až 28 °C.

Tímto způsobem je možno získat nortropin, který se pak kvantitativně extrahuje z roztoku hydroxidu draselného. Po odpaření rozpouštědla se surový produkt použije bez dalšího čištění v následujícím stupni B.

Získá se celkem 1,876 kg nortropinu o koncentraci 87 %, jak je možno prokázat vysokotlakou kapalinovou chromatografií na sloupci u-Bondapak C_{18} při použití směsi methanolu a vody v objemovém poměru 1 : 9 (s PIC-B7). Toto množství odpovídá 1,632 kg čistého nortropinu a výtěžku 98 %.

Stupeň B: 3*α*-hydroxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid.

Složení reakční směsi se vztahuje na čistý nortropin. Molární poměr nortropinu, dimethylaminu a 1,4-dichlorbutanu je zapotřebí udržovat přesně na hodnotě 1 : 2 : 4.

1,186 kg surového nortropinu, získaného ve stupni A (odpovídá 1,632 kg čisté látky, tj. 12,85 mol) se rozpustí v 52 litrech N,N-dimethylformamidu, načež se přidá 2,665 litrů dimethylaminu (1,876 kg, 25,7 mol) a 5,736 litrů 1,4-dichlorbutanu (6,528 kg, 51,4 mol). Reakční směs se nechá stát 18 dnů při teplotě místnosti. Vyloučí se krystalky, které se oddělí filtrací za odsávání, promyjí se malým množstvím bezvodého acetonitrilu a suší se ve vakuu při teplotě 50 °C. Tímto způsobem se získá 2,25 kg (80 %, vztaženo na propin, použitý v I. stupni) čistého produktu s teplotou tání 250 °C.

Stupeň C: Trospiumchlorid [(3*α*-benziloyloxy-nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidinium)chlorid]

a) Imidazolid kyseliny benzoové

Na nepřístupnu vzdušné vlhkosti se rozpustí 1,944 kg (12 molu) N,N-karbonyldiimidazolu v 19,2 litrech bezvodého dichlormethanu. Pak se za míchání přidá při teplotě 15 až 20 °C v průběhu 6 minut 2,736 kg 12 mol bezvodé kyseliny benzoové. Směs se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti. Na počátku míchání přejde kyselina benzoová do roztoku a záhy potom se počne vylučovat v pevné formě její imidazolid. Pevná látka se oddělí filtrací za odsávání a promyje se 0,8 litry bezvodého dichlormethanu. Tímto způsobem se získá 2,4 kg imidazolidu kyseliny benzoové.

b) Výroba výsledné látky

Do nádoby s objemem 300 litrů s možností míchání se uvede do suspenze 1,3 kg sloučeniny, získané ve stupni B ve 230 litrech absolutního acetonitrilu a roztok se zahřeje na 78 °C. Pak se přidá roztok 74,0 g 4-(dimethylamino)pyridin ve 2 litrech absolutního acetonitrilu. Pak se ve 3 podílech vždy v odstupu 30 minut při teplotě 78 °C přidá suspenze 2,086 kg imidazolidu kyseliny benzoové v 9,0 litrech absolutního acetonitrilu. Vzniklá směs se míchá při teplotě 78 °C tak dlouho, až se dosáhne doby 4 hodin od prvního přidání imidazolidu kyseliny benzoové. Směs se zchladí na teplotu 20 °C a pak se míchá přes noc. Vzniklá pevná látka se oddělí filtrací za odsávání a promyje se malým množstvím acetonitrilu. Odparek spolu s dalším produktem, získaným odpařením matečného louhu, tj. celkem 2,14 kg produktu se nechá překrystalovat z isopropanolu. Tímto způsobem se ve výtěžku 70 % získá 1,78 kg čistého produktu s teplotou tání 258 až 263 °C za rozkladu.

Hmotové spektrum: $m/e = 392$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při $\tilde{\nu} = 3150, 1735, 1498, 1452, 747$.

Příklad 2

3*ℳ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chloridStupeň B: 3*ℳ*-hydroxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chlorid

Do roztoku 635 mg 5 mmol nortropinu v 9,5 ml N,N-dimethylformamidu se vmíchá 1,05 ml, 10 mmol diethylaminu a 1,05 ml, 10 mmol cis-1,4-dichlor-2-buteny. Po 1 hodině se oddělí čistý krystalický produkt filtrací za odsávání. Matečný louh se smísí s ethylacetátem až do zakalení, čímž se získá další podíl výsledného produktu. Krystaly se oddělí filtrací za odsávání a pak se promyjí malým množstvím acetonu. Výtěžek 984 mg (91 %). Teplota tání: 204 °C. Hmotové spektrum: m/e = 180 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3250 a 1621 cm⁻¹. Spektrum při nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (90 MHz, D₂O, hodnoty δ vztaženy na TSP=0): δ = 1,7 - 2,7 (8H, H-2, H-4, H-6, H-7), 3,92 (2H, H-1, H-5), 4,05 (1H, H-3), 4,14 a 4,31 (vždy 2H, H-2' a H-5'), 5,90 (2H, H-3', H-4').

Stupeň C: 3*ℳ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chlorid

530 mg, 2,4 mmol 3*ℳ*-hydroxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chloridu se uvede do suspenze ve 353 ml absolutního acetonu a pak se směs míchá v autoklávu se 14 mg 0,12 mmol 4-dimethylaminopyridinu a 678 mg, 2,4 mmol imidazolidu kyseliny benzoové 23 hodin při teplotě 70 °C. Produkt po zchlazení krystalizuje při teplotě místnosti. Produkt se oddělí filtrací za odsávání, načež se promyje malým množstvím acetonu.

Výtěžek je 650 mg (62 %). Teplota tání: 267 °C. Hmotové spektrum: m/e = 390 (molekulární kation). Spektrum v ultračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 1722, 1595, 1490, 1445 a 741 cm⁻¹. Spektrum v nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (90 MHz, D₂O, δ hodnoty vztaženy na TSP=0): 1,3 - 2,8 (8H, H-2, H-4, H-6, H-7), 3,85 (2H, H-1, H-5), 4,09 a 4,37 (vždy 2H, H-2' a H-5'), 5,24 (1H, H-3), 5,95 (2H, H-3', H-4'), 7,44 (10H, aromatické protony kyseliny benzoové).

Stupeň D: Převedení 3*ℳ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chloridu na 3*ℳ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

500 mg 3*ℳ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chloridu se rozpustí v 15 ml methanolu a po přidání oxidu platičitého na špičku nože se směs hydrogenuje při teplotě 25 °C tak dlouho, až přestane přijímat vodík. Hydrogenace se provádí ve standardním zařízení, tak, jak je popsáno například v publikaci Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 4. vydání, svazek IV/lc, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1980, str. 33 - 39. Po odfiltrování platiny se směs odpaří do sucha ve vakuu. Reakce je kvantitativní, jak je možno prokázat NMR-spektrém. Pak se výsledný produkt nechá překrystalovat stejným způsobem jako v příkladu 1, stupeň C.

Příklad 3

3*ℳ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-isoindoliniumchlorid1) 3*ℳ*-hydroxynortropan-8-spiro-2'-isoindoliniumchlorid

1,27 g, 10 mmol nortropinu se rozpustí v 7 ml chloroformu a pak se přidá ještě 1,46 g, 20 mmol diethylaminu a 7 g 40 mmol, 1,2-bis-(chlormethyl)benzenu. Čirý reakční roztok se nechá stát 24 hodin při teplotě místnosti pod uzavřením, načež se odpaří na polovinu svého objemu a k zahájení krystalizace se přidá ethylacetát. Získané krystaly se oddělí filtrací za odsávání a nechají se překrystalovat ze směsi isopropanolu a ethylacetátu.

Výtěžek: 1 g (38 %). Teplota tání: 245 - 247 °C. Hmotové spektrum: m/e = 230 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3168, 757 a 742 cm⁻¹. NMR spektrum ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ jsou vztaženy na TSP=0): 2,09 (2H, H-6a, H-7a), 2,40 - 2,67 (4H, H-2, H-4), 2,59 (2H, H-6b, H-7b), 4,03 (2H, H-1, H-5), 4,24 (1H, H-3), 4,82 a 4,99 (4H, H-1' a H-3'), 7,47 (4H, H-4' až H-7').

2) 3*Δ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-isoindoliniumchlorid

1,33 g, 5 mmol 3*Δ*-hydroxanortropan-8-spiro-1'-isoindoliniumchlorid se uvede do suspenze ve 210 ml absolutního acetonitrilu a suspenze se zahřeje na teplotu 78 °C. Pak se za míchání přidá nejprve 62 mg, 0,5 mmol 4-dimethylaminopyridinu a pak v průběhu 2,5 hodiny ještě po částech 3,2 g 11,5 mmol imidazolidu kyseliny benzoové. Směs se míchá ještě 5,5 hodiny při teplotě 78 °C, pak se zchladí na 22 °C a míchá se ještě přes noc. Pak se roztok odpaří na jednu čtvrtinu svého objemu a krystalizace produktu se navodí přidáním ethylacetátu.

Výtěžek: 1,3 g (54 %). Teplota tání: 263 - 265 °C. Hmotové spektrum: m/e = 440 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 1740, 757, 745 a 703 cm⁻¹. Spektrum v nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ vztaženy na TSP=0): 1,57 (2H, H-6a, H-7a), 2,03 (2H, H-2a, H-4a), 2,07 (2H, H-6b, H-7b), 2,70 (2H, H-2b, H-4b), 3,86 (2H, H-1, H-5), 4,69 a 4,96 (4H, H-1' a H-3'), 5,32 (1H, H-3), 7,40 - 7,51 (14H, H-4' až H-7' a aromatické protony kyseliny benzoové).

Příklad 4

3*Δ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchlorid1) 3*Δ*-hydroxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchlorid

Do roztoku 7,2 g, 46,6 mmol nortropinu v 70 ml chloroformu se vmíchá 11,8 ml, 113,2 mmol diethylaminu a 26,6 ml, 226,5 mmol 2,2'-dichlordiethyletheru. Čirý reakční roztok se nechá stát v uzavřeném stavu 3 dny při teplotě místnosti. Vyloučí se směs olejovité kapaliny a krystalů, která se homogenizuje a nechá se krystalizovat přes noc při teplotě 0 °C. Krystaly se oddělí filtrací za odsávání, promyjí se malým množstvím chloroformu a pak se suší 2 hodiny ve vakuu při teplotě 40 °C. Odpařením matečného louhu a přidáním ethylacetátu se získá další podíl výsledného produktu.

Výtěžek: 12,5 g (95 %). Teplota tání: 274 - 276 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: m/e = 198 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3320 a 892 cm⁻¹. Spektrum nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ vztaženy na TSP=0): 2,00 (2H, H-6a, H-7a), 2,22 - 2,62 (6H, H-2, H-4, H-6b, H-7b), 3,50 a 3,65 (4H, H-2' a H-6'), 4,01 a 4,08 (4H, H-2' a H-6'), 4,18 (1H, H-3), 4,22 (2H, H-1 a H-5).

2) 3*Δ*-benziloyloxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchlorid

7,5 g, 32 mmol 3*Δ*-hydroxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchloridu se uvede do suspenze v 650 ml absolutního acetonitrilu a přidá se 0,587 g, 4,8 mmol 4-(dimethylamino)pyridinu. Pak se při teplotě 79 °C za míchání v průběhu 3 hodin po částech přidá 26 g, 92,8 mmol imidazolidu kyseliny benzoové. Pak se reakční směs nechá stát 7 dní při teplotě místnosti, načež se čistý krystalický produkt oddělí filtrací za odsávání. Získané krystaly se ještě 2 hodiny suší při teplotě 40 °C.

Výtěžek je 8,4 g (60 %). Teplota tání: 225 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: m/e = 408 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3410, 3183, 1731, 1492 a 703 cm⁻¹. Spektrum při nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ vztaženy na TSP=0): 1,51 (2H, H-6a, H-7a), 2,00 (4H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b), 2,63 (2H, H-2b, H-4b), 3,38 a 3,64 (4H, H-2' a H-6'), 3,99 a 4,04 (4H, H-3' a H-5'), 4,09 (2H, H-1, H-5), 5,30 (1H, H-3), 7,46 (10H, aromatické protony kyseliny benzoové).

Příklad 5

3*Δ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidin-[3',4'-b]chinoxaliniumbromid1) 3*Δ*-hydroxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidin-[3',4'-b]chinoxaliniumbromid

Do roztoku 5,57 g, 43,6 mmol nortropinu a 100 ml chloroformu se za míchání přidá 4,58 ml 43,6 mmol diethylaminu a 13,85 g, 43,6 mmol 2,3-bis(brommethyl)chinoxalinu. Reakční směs zteplá, zchladí se na 20 °C, čímž se počne vylučovat krystalický produkt. Tento produkt se odfiltruje za odsávání, promyje se chloroformem a pak se suší 22 hodin ve vakuu při teplotě 55 °C.

Výtěžek: 11,1 g (71 %). Teplota tání: 283 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: $m/e = 282$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3345, 1504 a 773 cm^{-1} . Spektrum v magnetické nukleární resonanci $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O , hodnoty δ vztaženy na TSP=0): 2,21 (2H, H-6a, H-7a), 2,53 - 2,89 (6H, H-2, H-4, H-6b, H-7b), 4,29 (2H, H-1 a H-5), 4,31 (1H, H-3), 5,21 a 5,41 (vždy 2H, H-2' a H-5'), 7,94 - 8,05 (2H, chinoxalin-o-protony), 8,11 - 8,22 (2H, chinoxalin-m-protony).

2) 3 $\mathcal{L}$ -benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidin-[3',4'-b]chinoxaliniumbromid

5 g, 1,39 mmol 3 $\mathcal{L}$ -hydroxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidin[3'4'-b]chinoxaliniumbromidu se uvede do suspenze ve 130 ml bezvodého dimethylsulfoxidu a 100 ml bezvodého acetonitrilu. Pak se přidá ještě 0,26 g, 2,09 mmol 4-dimethylaminopyridinu a směs se zahřeje na teplotu 78 °C. Pak se za energického míchání v odstupu 30 minut přidá ve třech podílech celkem 7,74 g, 27,8 mmol imidazolidu kyseliny benzoové. Směs se míchá ještě 2,5 hodiny při teplotě 78 °C, načež se reakční směs zchladí na 20 °C a zfiltruje. Zbytek na filtru se odloží a filtrát se odpaří do sucha při tlaku přibližně 0,1 kPa. Odparek se extrahuje 500 ml vroucího isopropanolu a pak se směs za horka zfiltruje. Zbytek na filtru se odloží. Filtrát se odpaří na objem 200 ml. Produkt krystalizuje přes noc při teplotě místnosti. Tento produkt se odfiltruje za odsávání, promyje se chladným isopropanolem a pak se suší ve vakuu 2 hodiny při teplotě 55 °C.

Výtěžek: 3,5 g (44 %). Teplota tání: 205 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: $m/e = 492$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3375, 1730, 1504 a 763 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci (250 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} - 3 : 1$, hodnoty δ vztaženy na TMS=0): 1,78 (2H, H-6a, H-7a), 2,08 (2H, H-2a, H-4a), 2,20 (2H, H-6b, H-7b), 2,85 (2H, H-2b, H-4b), 4,23 (2H, H-1, H-5), 4,62 (4H, H-2', H-5'), 5,35 (1H, H-3), 7,30 - 7,48 (10H, protony kyseliny benzoové), 7,84 - 7,97 (2H, chinoxalin-o-protony), 8,07 - 8,22 (2H, chinoxalin-m-protony).

Příklad 6

3 $\mathcal{L}$ -Benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-(2'-aza-3H-fenolenium)bromid

1) Do roztoku 1,62 g, 12,7 mmol nortropinu a 75 ml N,N-dimethylformamidu se za míchání přidá 1,33 ml, 12,7 mmol diethylaminu a 4 g, 12,7 mmol 1,8-bis-(brommethyl)naftalonu. Reakční směs mírně zteplá a v průběhu 2 hodin počne krystalizovat výsledný produkt, který se oddělí filtrací za odsávání, promyje se malým množstvím N,N-dimethylformamidu a pak se 2 hodiny suší ve vakuu při teplotě 55 °C.

Výtěžek: 3,5 g (76 %). Teplota tání: 330 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: $m/e = 280$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3410, 1604 a 1512 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} - 3 : 1$, hodnoty δ vztaženy na TMS=0): 2,02 (2H, H-6a, H-7a), 2,39 - 2,85 (6H, H-2, H-4, H-6b, H-7b), 3,92 (2H, H-1, H-5), 4,28 (1H, H-3), 5,01 a 5,16 (4H, H-1' a H-3'), 7,51 - 7,64 (4H, H-5', H-6', H-7', H-8'), 7,93 (2H, H-4', H-9').

2) 3 $\mathcal{L}$ -benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-(2'-aza-3H-fenolenium)bromid

2,95 g, 8,2 mmol 3 $\mathcal{L}$ -hydroxynortropan-8-spiro-2'-(2'-aza-3H-fenolenium)bromidu se uvede do suspenze v 1660 ml bezvodého acetonitrilu a 160 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. Pak se přidá ještě 152 mg 1,2 mmol 4-dimethylaminopyridinu a směs se zahřeje na teplotu 78 °C. Pak se za energického míchání v odstupu 30 minut přidá 4,56 g, 16,4 mmol imidazolidu kyseliny benzoové ve třech podílech. Směs se míchá ještě 2,5 hodiny při teplotě

78 °C a pak se reakční směs odpaří na polovinu svého objemu. Vysrážený surový produkt se při teplotě 20 °C oddělí filtrací za odsávání a uvede se do suspenze v methanolu. Podíl, nerozpustný v methanolu se odfiltruje a odloží. Filtrát se odpařuje tak dlouho, až počne produkt krystalizovat. Po krystalizaci přes noc při teplotě místnosti se výsledný produkt odfiltruje za odsávání a pak se 2 hodiny suší při teplotě 55 °C ve vakuu.

Výtěžek: 2,1 g (42 %). Teplota tání: 322 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: $m/e = 490$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3428, 3240, 1738, 1603 a 1497 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 3 : 1$, hodnoty δ vztaheny na TMS=0): 1,75 (2H, H-6a, H-7a), 1,94 (2H, H-2a, H-4a), 2,20 (2H, H-6b, H-7b), 2,80 (2H, H-2b, H-4b), 3,85 (2H, H-1, H-5), 4,93 a 5,19 (vždy 2H, H-1' a H-3'), 5,45 (1H, H-3), 7,31 - 7,46 (10H, protony kyseliny benzoové), 7,47 - 7,67 (4H, H-5', H-6', H-7', H-8'), 7,93 (2H, H-4', H-9').

Analogickým způsobem je možno získat další sloučeniny obecného vzorce I.

Příklad 7

3*ℳ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(4'-methyl)-piperidiniumchlorid

1) 3*ℳ*-hydroxy-nortropan-8-spiro-1'-(4'-methyl)-piperidiniumchlorid

7,62 g, 0,06 mol nortropinu se rozpustí ve 200 ml absolutního N,N-dimethylformamidu. Pak se za míchání přidá 8,76 g, 0,12 mol diethylaminu a 37,18 g, 0,24 mol 1,5-dichlor-3-methylpentanu, načež se reakční směs uzavře a nechá se stát 18 dnů při teplotě místnosti. Vyloučené krystaly se odfiltrují za odsávání, promyjí se malým množstvím bezvodého acetonitrilu a pak se suší ve vakuu při teplotě 50 °C. Tímto způsobem se ve výtěžku 53 % získá 7,84 g čistého výsledného produktu.

Teplota tání: 290 °C (za rozkladu). Hmotové spektrum: $m/e = 210$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 3190 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O , hodnoty δ v ppm, vztaheno na TSP = 0): 1,01 (m, 3H, CH_3), 1,37 - 2,02 (m, 7H, H-6a, H-7a, H-3', H-4', H-5'), 2,20 - 2,52 (m, 5H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, OH), 2,60 a 2,67 (2 x t, 2H, H-2b a H-4b), 3,10, 3,20, 3,63 a 3,74 (4 x m, 4H, H-2' a H-6'), 2,76 a 4,24 (2 x m, 2H, H-1 a H-5), 4,19 (t, 1H, H-3).

2) 3*ℳ*-Benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(4'-methyl)piperidiniumchlorid

7,37 g, 30 mmol 3*ℳ*-hydroxynortropan-8-spiro-1'-(4'-methyl)piperidiniumchloridu se uvede do suspenze v 650 ml absolutního acetonitrilu a za stálého míchání se suspenze zahřeje na teplotu 78 °C. Při této teplotě za míchání se přidá nejprve 587 mg, 4,8 mmol 4-(dimethylaminu)pyridinu a pak v průběhu 2 hodin ještě 13,35 g, 48 mmol imidazolidu kyseliny benzoové ve čtyřech přibližně stejných dílech. Pak se směs ještě 1,5 hodiny míchá při teplotě 78 °C, načež se nechá bez míchání přes noc zchladnout na teplotu místnosti. Vykrytalizovaný produkt se odfiltruje za odsávání a promyje se malým množstvím acetonu. Surový krystalický produkt se nechá překrystalovat z bezvodého isopropanolu. Čistě krystaly se suší 2 hodiny ve vakuu při teplotě 40 °C.

Tímto způsobem se ve výtěžku 70 % získá 9,56 g výsledného produktu jako směsný krystalizační produkt s isopropanolem v poměru 1 : 1.

Teplota tání: 256 - 259 °C. Hmotové spektrum: $m/e = 420$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maximum při 1735 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O , hodnoty δ v ppm, vztaheno na TSP = 0): 0,98 (m, 3H, CH_3), 1,30 - 1,65 (m, 4H, H-6a, H-7a, H-3'a, H-5'a), 1,65 - 2,03 (m, 7H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, H-3'b, H-4', H-5'b), 2,52 a 2,72 (m, 2H, H-2b, H-4b), 3,02, 3,19, 3,47, 3,72 (t, t, d, d, 4H, H-2' a H-6'), 3,62 a 4,10 (m, m, 2H, H-1 a H-5), 5,30 (t, 1H, H-3), 7,40 - 7,50 (m, 10H, aromatické protony).

Příklad 8

3*ℓ*-(4,4'-Difluor)benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

2,17 g, 0,1 mol **3*ℓ***-hydroxynortropan-8-spiro-1-pyrrolidiniumchloridu se uvede do roztoku s 2,02 g, 0,01 mol sodné soli kyseliny heptan-1-sulfonové za zahřátí v 500 ml absolutního acetonitrilu. Pak se směs zchladí na teplotu 25 až 27 °C a vzniklá sraženina chloridu sodného se odfiltruje za odsávání za nepřístupu vody. Roztok se smísí s 0,125 g 4-(dimethylamino)pyridinu a přenesení se do reakční nádoby, umožňující míchání, v níž byl vyroben imidazolid kyseliny 4,4'-difluorbenzilové. Baňka je opatřena dvěma nálevkami pro přikapávání dalších reakčních složek. V jedné nálevce se uloží 2,64 g, 0,01 mol kyseliny 4,4'-difluorbenzilové, získané podle DE - OS 2 034 943 ze dne 14.7.1970 (W. Rothweiler), rozpuštěný ve 100 ml absolutního acetonitrilu. Do druhé nálevky se uloží roztok 2,43 g, 0,015 mol N,N-karbonyldiimidazolu ve 150 ml absolutního acetonitrilu. Pak se současně přidává z obou nálevek za stálého míchání přibližně 1/4 objemu materiálu v nálevce, směs se 15 minut míchá a vzniklý roztok imidazolidu se převede za vyloučení přístupu vody do reakční nádoby, v níž se míchá roztok **3*ℓ***-hydroxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumheptansulfonátu při teplotě místnosti. Tento postup je ještě třikrát opakován až do smísení veškerého množství reakčních složek. Pak se výsledná směs zahřívá 2 hodiny na teplotu varu pod zpětným chladičem, načež se chladí přes noc na teplotu místnosti.

Pak se reakční směs odpaří ve vakuu do sucha na rotačním odpařovači. Získaný odparek se čistí chromatografií na sloupci silikagelu (například Kieselgel 60 s rozměrem částic 0,063 - 0,200 mm, Merck č. 7734). Jako mobilní fáze se užije směs 1,2-dichlorethanu, kyseliny octové, methanolu a vody v objemovém poměru 57 : 23 : 13 : 7. Tímto způsobem se ve výtěžku 14 % získá 870 mg **3*ℓ*-(4,4'-difluor)neziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumheptansulfonátu**. Po průchodu sloupcem, naplněným silně zásaditým iontoměničem v chloridové formě (například Lewatit MP500) se získá výsledná látka. Tento surový produkt se nechá překrystalovat z isopropanolu, promyje se ethylacetátem a pak se suší ve vakuu při teplotě 40 °C až do dosažení stálé hmotnosti.

Výtěžek: 470 mg produktu ve formě směsného krystalizátoru s isopropanolem v poměru 1 : 1. Teplota tání: 242 - 245 °C. Hmotové spektrum: m/e = 428 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 1508, 1603 a 1733 cm⁻¹. Spektrum v nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ v ppm, vztaženo na TSP = 0): 1,44 - 1,57 (m, 2H, H-6a, H-7a), 2,00 - 2,20 (m, 8H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, H-3', H-4'), 2,57 a 2,64 (2 x m, 2H, H-2b a H-4b), 3,38 a 3,60 (2 x m, 4H, H-2', H-5'), 3,73 (m, 2H, H-1, H-5), 5,27 (t, 1H, H-3), 3,19 a 7,42 (2 x m, 8H, aromatické protony).

Příklad 9

3*ℓ*-(4,4'-Dimethyl)-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

Postupuje se obdobným způsobem jako v příkladu 8, avšak místo kyseliny 4,4'-difluorbenzilové se jako výchozí látka užije kyselina 4,4'-dimethylbenzilová, získaná způsobem podle publikace J. G. Cannon, J. Org. Chem. 25, 959 - 962 (1960).

Výtěžek: 1,68 g. Teplota tání: 275 °C. Hmotové spektrum: m/e = 420 (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 1508, 1612 (slabě) a 1718 cm⁻¹. Spektrum v nukleární magnetické resonanci ¹H-NMR (250 MHz, D₂O, hodnoty δ ppm, vztaženo na TSP = 0): 1,47 - 1,51 (m, 2H, H-6a, H-7a), 1,79 - 2,21 (m, 8H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, H-3', H-4'), 2,33 (s, 6H, 2 x CH₃), 2,48 - 2,66 (m, 2H, H-2b, H-5b), 3,34 a 3,58 (2 x m, 4H, H-2' a H-5'), 3,67 (m, 2H, H-1, H-5), 5,23 (t, 1H, H-3), 7,20 - 7,31 (m, 8H, aromatické protony).

Příklad 10

3-(4,4'-Di-n-butyloxybenziloyloxy)nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

Postupuje se způsobem podle příkladu 8, avšak místo kyseliny 4,4'-difluorbenzilové se jako výchozí látky užije kyselina 4,4'-di-n-butyloxybenzilová, získaná způsobem podle publikace J. G. Cannon, J. Org. Chem. 25, 959 - 962 (1960).

Výtěžek = 240 mg krystalů, které se při teplotě místnosti rozpouštějí.

Hmotové spektrum: $m/e = 536$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle v bromidu draselném má maxima při 1508, 1580 (slabé), 1608, 1734 cm^{-1} . Spektrum v nukleární magnetické resonanci (250 MHz, CDCl_3 , hodnoty δ v ppm, vztaženo na TMS = 0): 0,96 (t, 6H, 2 x CH_3 n-butyloxyskupiny), 1,47 (t, q, 4H, 2 x CH_2 n-butyloxyskupiny), 1,53 - 1,63 (m, 2H, H-6a, H-7a), 1,76 (t, t, 4H, 2 x CH_2 n-butyloxyskupiny), 1,80 - 2,30 (m, 8H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, H-3', H-4'), 2,62 - 2,77 (m, 2H, H-2b, H-4b), 3,65 a 3,99 (2 x m, 4H, H-2' a H-5'), 3,94 (t, 4H, 2 x CH_2 n-butyloxyskupiny), 4,16 (m, 2H, H-1, H-5), 5,28 (t, 1H, H-3), 6,84 a 7,25 (2 x d, 8H, aromatické protony).

Příklad 11

3-(4-n-Butyloxybenziloyloxy)nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

Postupuje se způsobem podle příkladu 8, avšak místo kyseliny 4,4'-difluorbenzilové se jako výchozí látka užije kyselina 4-n-butyloxybenzilová, získaná způsobem podle publikace C. D. Shacklett a H. A. Smith, J. Am. Chem. Soc. 75, 2654 - 2657 (1953).

Výtěžek: 250 mg. Teplota tání: 206 $^{\circ}\text{C}$. Hmotové spektrum: $m/e = 464$ (molekulární kation). Spektrum v infračerveném světle má maxima při 1512, 1609 a 1742 cm^{-1} (bromid draselný). Spektrum v NMR resonanci ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , hodnoty δ v ppm, vztaženo na TMS = 0): 0,97 (t, 3H, CH_3 n-butyloxyskupiny), 1,50 (t, q, 2H, CH_2 n-butyloxyskupiny), 1,56 - 1,64 (m, 2H, H-6a, H-7a), 1,77 (t, t, 2H, CH_2 n-butyloxyskupiny), 1,84 - 2,45 (m, 8H, H-2a, H-4a, H-6b, H-7b, H-3', H-4'), 2,65 - 2,85 (m, 2H, H-2b, H-4b), 3,58 a 3,95 (2 x m, 4H, H-2' a H-5'), 3,95 (t, 2H, CH_2 n-butyloxyskupiny), 4,08 (m, 2H, H-1 a H-5), 5,30 (t, 1H, H-3), 6,84 (d) a 7,26 - 7,37 (m, 9H, aromatické protony).

Příklady galenických forem

1. Tablety

40 mg	azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
20 mg	laktosy
30 mg	škrobu
0,5 mg	stearanu hořečnatého
74,5 mg	mikrokrystalické celulózy.

2. Čípky

120 mg	azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
2 mg	prostředku Aerosil 200 (oxid křemičitý)
2278 mg	prostředku Witepsol (modifikované triglyceridy nasycených alifatických kyselin rostlinného původu).

3. Roztok pro nitrožilní podání

20 mg	azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
4,6 mg	kyseliny citronové
14,8 mg	2-hydrátu citranonu sodného
ad 2 ml.	

4. Roztok k nitrožilní infuzi

500 mg azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
 130 mg monohydrátu kyseliny citronové
 370 mg 2-hydrátu citranonu sodného
 ad 50 ml.

5. Retardovaná forma: Pelety, určené k uložení do kapslí z tvrdé želatiny

Příklad uvádí dva typy směsí, určených k uložení do kapslí z tvrdé želatiny, a to směs s počáteční dávkou účinné látky a bez této počáteční dávky.

	bez počáteční dávky	s počáteční dávkou
kuličky cukru	150 mg	150 mg
azoniaspironortropanolester podle jednotlivých příkladů	80 mg	WS 60 mg
hydroxypropylcelulóza (Klucel)	10 mg	8 mg
ester kyseliny akrylové nebo methakrylové:		
Eudragit RL	2 mg	2 mg
Eudragit RS	8 mg	8 mg
polyethylenglykol 8000	1 mg	1 mg
mastek	5 mg	5 mg
		WS 20 mg
		Klucel 2 mg

6. Retardovaná forma: tablety s matricí

80 mg azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
 120 mg laktózy
 15 mg ethylcelulózy
 20 mg škrobu
 2 mg stearanu hořečnatého
 3 mg polyethylenglykol 8000.

7. Retardovaná forma: dvouvrstevní tablety s počáteční dávkou

	1. vrstva retardovaná tableta	2. vrstva počáteční dávka
azoniaspironortropanolester	60 mg	20 mg
laktóza	90 mg	10 mg
ethylcelulóza	12 mg	-
škrob	15 mg	15 mg
stearan hořečnatý	1,5 mg	0,3 mg
polyethylenglykol 8000	2 mg	-
mikrokrytalická celulóza	-	37,2 mg

8. Prostředek k inhalaci

0,1 mg azoniaspironortropanolesteru podle jednotlivých příkladů
 0,02 mg Span 85 (zbytky kyselin sorbitanmono- a -trialifatických, na základě kyseliny olejové)
 10 µl Frigen 11 (trichlorfluormethan)
 40 µl Frigen 12 (dichlordifluormethan).

9. Dávkovaný roztok pro nosní podání

2 mg azoniaspironortropanonesteru podle jednotlivých příkladů
 90 µl fyziologického roztoku chloridu sodného.

10. Inhalační roztok

Trospiumchlorid	0,100 g
1-hydrát kyseliny citronové	0,470 g
2-hydrát citronanu sodného	0,530 g
chlorid sodný	0,645 g
voda pro injekční účely	100,0 ml

Výroba

Uvedené látky se jedna po druhé rozpustí ve vodě. Pak se směs sterilizuje a plní do nádobek, které ji chrání před světlem. Roztok má mít pH 4,2.

11. Dávkovaný aerosol

Trospiumchlorid	0,030 g
směs trichlorfluormethanu a dichlordifluor- methanu	ad 15,0 ml

Výroba

Trospiumchlorid, jemně umletý na velikost částic nižší než 5 µm se uvede do homogenní suspenze ve zchlazeném, kapalném hnacím plynu a pak se plní při teplotě 45 až 50 °C do aerosolových nádobek. Ventil se volí tak, aby se na jedno stlačení uvolnilo 0,1 mg trospiumchloridu.

Dále budou uvedeny testy, prokazující účinnost sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu na zvířatech při různých dávkách a různých způsobech podání.

Metoda

Živočišný materiál

Druh zvířete:	Morče
Kmen:	Pirbright white
Původ:	Dodává Lippische Versuchstierzucht Hagemann GmbH Co., 4923 Extertal 1
Pohlaví:	samci
Hmotnost:	přibližně 500 - 700 g
Pobyt před pokusem:	> 8 dní

Podmínky

Klece:	Běžné masivní klece
Teplota:	22 ± 2 °C
Relativní vlhkost:	50 až 60 %
Osvětlení:	Umělý 12 hodinový rytmus
Podmínky v kleci:	Makrolonová spodní část, překrytá drátěnou sítkou, na ní je uloženo krmivo a nádobka s vodou, jako podestýlka byl užit ssniff ^R (Fa. ssniff-Versuchstierdiäten GmbH, 4770 Soest Altromin ^R -MS (Altrogge Spezialfutterwerk), Lippe ssniff ^R - -MS-krmivo a seno
Krmivo:	
Pitná voda:	Voda z vodovodu podle libosti.

Zkoumané látky

Trospiumchlorid = MP 194 = 3*β*-benziloyloxy-nortropan-8-spiro-1'-pyrrolidiniumchlorid

Dehydrotrospiumchlorid = WG 71 = 3*β*-benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)-chlorid

Dávky a způsob podání účinných látek

Zkoumané látky

Označení: Trospiumchlorid MP 194 (MG = 428)

Šarže: 9045

Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹

Způsob podávání: intraperitoneálně

Označení: Dehydrotrospiumchlorid WG 71 (MG = 426)

Šarže: 840720

Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹

Způsob podání: intraperitoneálně

Referenční látka:

Označení: Atropin HCl (Serva; MG = 325,8)

Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹

Způsob podávání: intraperitoneálně

Označení: Isoproterenol (Fluka, MG = 247,72)

Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹

Způsob podání: intraperitoneálně

Kontrolní látka:

Označení: Fyziologický roztok chloridu sodného

Dávka: 1 ml kg⁻¹

Způsob podání: intraperitoneálně

Další sloučeniny:

Označení: Acetyl-β-methylcholinchlorid (Sigma; MG = 195,7)

Koncentrace: 0,0316 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

0,0562 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

0,1 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

0,178 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

0,316 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

0,562 g x 100 ml⁻¹ Aqua bidest.

Způsob podání: 0,5 ml min⁻¹ inhalací.

Rozdělení na skupinu

Klíč k dělení náhodný

Počet zvířat ve skupině: 10

Provedení pokusu: Podle možnosti se provádí pokus téhož dne na pokusné i na kontrolní skupiny.

Provedení pokusu

Morčata, určená k pokusu se po počátečním pobytu v klecích alespoň 8 dní vystaví dvakrát působení aerosolu 0,1% roztoku acetyl-β-methylcholinchloridu, aby bylo možno prokázat, zda zvířata reagují s velkými potížemi nebo zda dochází k určité adaptaci. V případě, že při obou inhalačních fázích je možno pozorovat necitlivost k expozici svrchu uvedené látky, to znamená, že se u zvířat žádné potíže nedostaví, vyřadí se tato zvířata z pokusu.

Aby bylo možno uskutečnit provokaci působením aerosolu, uloží se morčata jednotlivě do inhalační komory, v níž se rozpráší 0,5 ml roztoku za minutu při použití zvláštní trysky (Fa. Rhema, Hofheim) za vzniku aerosolu. V závislosti na koncentraci účinné látky a na případném předběžném ošetření zvířete vede vystavení aerosolu k méně nebo více vyjádřenému ztíženému dýchání, k záchvatům kašle a nakonec k dušení a ztrátě vědomí, současně se vyskytují různé silné tonickoklonické křeče. Pomocí stopek (Fa. Hanhart) se odečítá doba od počátku inhalace až do dušení. Zvířata se vyjmou z inhalační komory a obvykle po velmi krátké době, což je možno pozorovat návratem vědomí a normalizací dýchání, dojde u nich k úplnému zotavení. V případě, že se v době 180 sekund nedostaví ztížené dýchání, inhalace se přerušuje.

Aby bylo možno pozorovat ochranný účinek zkoumaných látek a popřípadě referenčních látek, ošetří se zvířata 15 minut před počátkem inhalace v závislosti na své tělesné hmotnosti uvedenými látkami, kontrolním zvířatům se podá isotonický roztok chloridu sodného, načež se zvíře vystaví vlivu logaritmicky odstupňované koncentrace aerosolu acetyl- β -methylcholinchloridu. V jednom dni se zkouší vždy pouze jedna koncentrace aerosolu, odstup mezi jednotlivými inhalacemi má být alespoň jeden týden.

Analýza a zařízení

Jako inhalační komora se užíje komora z plexiskla, zvláště upravená k tomuto účelu, víko této komory je možno uzavřít pomocí pryžového těsnění. Vnitřní rozměry komory jsou 285 x 190 x 180 mm, což odpovídá objemu 9,75 litrů. Zvláštní tryska (č. 504104, Fa. Rhema, Hofheim) se uloží do vybrání víka a umožňuje stejnoměrný přívod aerosolu do komory. Roztok se do trysky přivádí infuzním čerpadlem (Fa. Braun, Melsungen) rychlostí 0,5 ml/min a rozprašuje se při přetlaku 180 kPa z připojené tlakové nádoby se syntetickým vzduchem. Inhalace aerosolu je z bezpečnostních důvodů zapotřebí odvádět za současného odvodu vzduchu z místnosti.

Vyhodnocení

Pro každou zkoumanou látku, a to i referenční a kontrolní se určuje koncentrace účinné látky, která snižuje na polovinu procentuální podíl zvířat, u kterých dojde ke ztíženému dýchání. Tímto způsobem se získá hodnota EC_{50} .

Hodnota EC_{50} se spolu s příslušnými mezemi spolehlivosti ($p > 95 \%$) vyjádří na základě analýzy probitů způsobem, zaručujícím maximální náhodnost. (10 prvků). Mimoto se takto získané přímky ještě dále podrobují přezkoumání pomocí testu χ^2 . K vyhodnocení může sloužit i běžně dodávaný program (Fa. Olivetti).

Uchovávání údajů

Protokoly o pokusech zůstávají v laboratoři a jsou uchovávány v pořadačích, označených číslem pokusu.

Výsledky

Zkoumané látky trospiumchlorid a dehydrotrospiumchlorid mají po intraperitoneálním podání vyjádřený broncholytický účinek při cholinergně indukovaných bronchiálních křečích u morčat v bdělém stavu. Střední účinná koncentrace EC_{50} acetyl- β -methylcholinchloridu v roztoku, zpracovávaném na aerosolu je u kontrolních zvířat $w = 0,00054$, jak je zřejmé z tabulky 1. Po předběžném ošetření trospiumchloridem a dehydrotrospiumchloridem jsou odpovídající hodnoty EC_{50} $w = 0,00286$ a $w = 0,00173$, jak je zřejmé z následujících tabulek 2 a 3.

Jako referenční látky byly užity atropin a isoproterenol.

V případě atropinu a isoproterenu byly střední účinné koncentrace $w = 0,00138$ a $w = 0,00145$, jak je zřejmé z následujících tabulek 4 a 5.

Tabulka 1

Kontrolní látka: NaCl ($w = 0,009$)
 Způsob podání: intraperitoneálně
 Dávka: 1 ml g^{-1}
 Účinná látka: acetyl- β -methylcholinchlorid
 Způsob podání: inhalací (aerosol)
 Koncentrace: podle tabulky
 Test na linearitu: $\chi^2 = 1,2629$ (FG = 3)

Linearitu je možno považovat za prokázanou ($\alpha \geq 0,05$)

Výsledky analýzy probitů

Střední účinná koncentrace účinné látky EC_{50} : $w = 0,000539$

Meze spolehlivosti ($P = 0,95$): $0,000339$ – $0,000855$

Datum pokusu	koncentrace účinné látky w	Počet zvířat		Analýza probitů (%)	
		zkoumaných	reagujících	vypočteno	nalezeno
19.04.85	0,000316	10	2	20,00	22,79
27.03.85	0,000562	10	5	50,00	52,35
26.04.85	0,000750	10	7	70,00	67,81
03.04.85	0,001000	10	9	90,00	80,64
03.05.85	0,001780	10	9	90,00	95,26

Tabulka 2

Zkoumaná látka: trospiumchlorid
 Způsob podání: intraperitoneálně
 Dávka: $3 \times 10^{-7} \text{ mol ml}^{-1} \text{ kg}^{-1}$
 Účinná látka: acetyl- β -methylcholinchlorid
 Způsob podání: inhalací (aerosol)
 Koncentrace: podle tabulky
 Test na linearitu: $\chi^2 = 2,0313$ (FG = 3)

Linearitu je možno považovat za prokázanou ($\alpha \geq 0,05$)

Výsledky analýzy probitů

Střední účinná koncentrace účinné látky EC_{50} : $w = 0,00286$

Meze spolehlivosti ($P = 0,95$): $0,00147$ – $0,00557$.

Datum pokusu	Koncentrace účinné látky w	Počet zvířat		Analýza probitů (%)	
		zkoumaných	reagujících	vypočteno	nalezeno
27.03.85	0,000562	10	0	2,50 ^x	5,46
03.04.85	0,001000	10	1	10,00	15,03
03.05.85	0,001780	10	5	50,00	32,00
19.04.85	0,003160	10	5	50,00	53,87
26.04.85	0,005620	10	7	70,00	74,66

x

Oprava (BLISS)

Tabulka 3

Zkoumaná látka: dehydrotrospiumchlorid
 Způsob podání: intraperitoneálně
 Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹
 Účinná látka: acetyl-β-methylcholinchlorid
 Způsob podání: inhalací (aerosol)
 Koncentrace: podle tabulky
 Test na linearitu: $\chi^2 = 1,3234$ (FG = 2)
 Linearitu je možno považovat za prokázanou ($\alpha \geq 0,05$)

Výsledek analýzy probitů

Střední účinná koncentrace účinné látky EC₅₀ = w = 0,00173

Meze spolehlivosti (P = 0,95): 0,00031-0,00972

Datum pokusu	Koncentrace účinné látky w	Počet zvířat		Analýza probitů (%)	
		zkoumaných	reagujících	vypočteno	nalezeno
10.05.85	0,001000	10	5	30,00	38,74
03.05.85	0,001780	9	6	66,67	50,60
19.04.85	0,003160	10	6	60,00	62,35
26.04.85	0,005620	10	7	70,00	73,08

Tabulka 4

Referenční látka: Atropinchlorid
 Způsob podání: intraperitoneálně
 Dávka: 3×10^{-7} mol ml⁻¹ kg⁻¹
 Účinná látka: Acetyl-β-methylcholinchlorid
 Způsob podání: inhalací (aerosol)
 Koncentrace: podle tabulky
 Testa na linearitu: $\chi^2 = 1,6245$ (FG = 3)
 Linearitu je možno považovat za prokázanou ($\alpha \geq 0,05$)

Výsledky analýzy probitů

Střední účinná koncentrace účinné látky EC₅₀: w = 0,00138

Meze spolehlivosti (P = 0,95): 0,00022-0,00888

Datum pokusu	Koncentrace účinné látky w	Počet zvířat		Analýza probitů (%)	
		zkoumaných	reagujících	vypočteno	nalezeno
27.03.85	0,000562	10	3	30,00	38,93
03.04.85	0,001000	10	6	60,00	45,98
03.05.85	0,001780	9	5	55,56	53,16
19.04.85	0,003160	10	5	50,00	60,20
26.04.85	0,005620	10	7	70,00	66,95

Tabulka 5

Referenční látka:	isoproterenol
Způsob podání:	intraperitoneálně
Dávka:	3×10^{-7} mol ml ⁻¹ kg ⁻¹
Účinná látka:	acetyl- β -methylcholinchlorid
Způsob podání:	inhalací (aerosol)
Koncentrace:	podle tabulky
Test na linearitu:	$\chi^2 = 0,1240$ (FG = 2)
Linearitu je možno považovat za prokázanou ($\mathcal{L} \geq 0,05$)	

Výsledek analýzy probitů

Střední účinná koncentrace účinné látky EC₅₀: w = 0,00145

Meze spolehlivosti (P = 0,95): 0,00050-0,00426

Datum pokusu	Koncentrace účinné látky w	Počet zvířat		Analýza probitů (%)	
		zkoumaných	reagujících	vypočteno	nalezeno
10.05.85	0,001000	9	3	33,33	36,21
03.05.85	0,001780	8	5	62,50	57,88
19.04.85	0,003160	9	7	77,78	77,28
26.04.85	0,005620	9	8	88,89	90,30

Závěry

Zkoumané látky trospiumchlorid a dehydrotrospiumchlorid jsou při podání intraperitoneálně po 15 minutách lepší nebo srovnatelné vzhledem ke své broncholytické účinnosti s klasickými parasimpatikolytickými látkami atropinem a β -sympatikomimetikem isoproterenolem, jak je zřejmé z obr. 1. Z vypočítaných středních účinných koncentrací acetyl- β -methylcholinchloridu, jichž je zapotřebí k vyvolání ztíženého dýchání, je možno usoudit na silnější účinnost zkoumaných látek, zejména trospiumchloridu ve srovnání s referenčními látkami.

Aby bylo možno zkoumat specifickou sloučenin, získaných způsobem podle vynálezu na receptory, je nutno pokus uspořádat tak, aby bylo možno zajistit specifickou cholinergní antagonizaci.

Znáмым modelem pro toto použití je měření anticholinergní účinnosti na izolovaných tracheálních proužcích (morče).

Jako zkoumané látky bylo užito 3 $\mathcal{L}$ -benziloxyloxynortropan- β -spiro-1'-pyrrolidiniumchloridu, tj. trospiumchloridu (= MP 194). Srovnávací látkou byl Ipatrotiumbromid.

1. Základní údaje

MP 194 je na izolovaných tracheálních spirálách morčat vzhledem k acetyl- β -methylcholinchloridu kompatitivně antagonisticky účinný. Přitom je jeho účinnost vyšší nebo stejně veliká jako účinnost ipratropiumbromidu, přičemž obvykle vedlejší účinky při podání této látky jsou nižší nebo se nedostávají.

2. Účel pokusu

Je zapotřebí prokázat anticholinerní účinnost MP 194 ve srovnání s účinností referenční sloučeniny ipratropiumbromidu na izolovaných tracheálních spirálách morčat.

3. Metoda

3.1. Živočišný materiál:

- 3.1.1. Druh zvířete: morče
- 3.1.2. Kmen: Pirbright White
- 3.1.3. Původ: Fa. Hagemann GmbH Co., 4923, Extertal 1
- 3.1.4. Pohlaví: samci
- 3.1.5. Hmotnost: přibližně 500 g
- 3.1.6. Doba před pokusem: alespoň 8 dní.
- 3.2. Uskladnění zvířat
- 3.2.1. Klece: běžné masivní klece
- 3.2.2. Teplota: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 3.2.3. Relativní vlhkost: $50 \pm 15\%$
- 3.2.4. Osvětlení: Umělé střídání světla a tmy v intervalu 12 hodin.
- 3.2.5. Vybavení klece: Makrolonová spodní část překrytá drátěnou sítkou s nádobkou na krmivo a vodu, ssniff^R bedding (Versuchstierdiäten GmbH 4770 Soest)
- 3.2.6. Krmivo: ssniff^R, krmivo pro morčata
- 3.2.7. Pitná voda: voda z vodovodu podle libosti.
- 3.3. Sloučeniny, dávkování, způsob podání
- 3.3.1. Zkoumaná látka (antagonista)
- Označení: MP 194 (trospiumchlorid)
MG 428
- Šarže: 9045
- Rozpouštědlo: Tyrodův roztok
- Koncentrace v lázničce: 1×10^{-9} M/ml
 $3,16 \times 10^{-9}$ M/ml
 1×10^{-8} M/ml
 1×10^{-7} M/ml
- Aplikační objem: 50 μl /28 ml lázně
- 3.3.2. Referenční látka (antagonista)
- Označení: Ipratropiumbromid (MG 412,4)
- Rozpouštědlo: Tyrodův roztok
- Koncentrace v lázničce: 1×10^{-9} M/ml
 $3,16 \times 10^{-9}$ M/ml
 1×10^{-8} M/ml
 1×10^{-7} M/ml
- Aplikační objem: 50 μl /28 ml lázně
- 3.3.3. Další látky
- 3.3.3.1. Označení: Acetyl- β -methylcholinchlorid (MG 195,7)
- Rozpouštědlo: Tyrodův roztok
- Koncentrace v lázničce: 1×10^{-7} M/ml
 1×10^{-6} M/ml
 1×10^{-5} M/mol
 1×10^{-4} M/mol
 1×10^{-3} M/mol
 1×10^{-2} M/mol
 $3,16 \times 10^{-2}$ M/mol
- Aplikační objem: 50 μl /28 ml lázně, kumulativně.
- 3.3.3.2. Tyrodův roztok jako živné prostředí
- Složení tohoto roztoku bude uvedeno v následující tabulce:

Složka	č.	mMol/l	zásobní roztok	ml zásobního roztoku/ /l Tyrodova roztoku
NaCl	6404	139,2	58,00 g/l (1 mol)	139,2 ml
KCl	4936	2,7	74,56 g/l (1 mol)	2,7 ml
CaCl ₂ × 2H ₂ O	2382	1,8	147,00 g/l (1 mol)	1,8 ml
MgCl ₂ × 6H ₂ O	5833	0,245	99,62 g/l (0,49 mol)	0,49 ml
NaHCO ₃	6329	11,9	21,00 g/l (0,25 mol)	47,6 ml
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	6346	0,4	4,00 g/l (0,03 mol)	15,6 ml
C ₆ H ₁₂ O ₆	8342	5,5	-	1,0 g

Všechny použité látky byly běžně dodány (Fa. Merck, Darmstadt). Uváděná čísla odpovídají číslům v katalogu.

Chlorid vápenatý je hygrokopický, takže je nutno zásobní roztok vždy titrovat při použití chloridového iontu (Marius-Chlor-o-Counter, Fa. Kipp a Zonen, 6242 Schönberg/Taunus).

Při mísení různých zásobních roztoků je nutno brát ohled na to, že se vápník s hydrogenuhlíčitanem nebo fosfátem sráží v případě, že roztok má vyšší koncentraci. Tomu je možno zabránit tak, že se nejprve 1,8 ml zásobního roztoku chloridu vápenatého smísí s přibližně 100 ml bidestilované vody, další zásobní roztoky se doplňují bidestilovanou vodou v odměrné baňce a teprve pak se přidá roztok chloridu vápenatého.

3.4. Skupiny

3.4.1. Dělení do skupin:

náhodné

3.4.2. Počet přípravků

- pokusná skupina:

n = 4 (1×10^{-9} M)
n = 2 ($3,16 \times 10^{-9}$ M)
n = 2 (1×10^{-8} M)
n = 4 (1×10^{-7} M)

- referenční skupina:

n = 4 (1×10^{-9} M)
n = 2 ($3,16 \times 10^{-9}$ M)
n = 2 (1×10^{-8} M)
n = 4 (1×10^{-7} M)

3.5. Provedení pokusu

Morčata byla usmrcena úderem do šíje. Pak byla vyjmuta celá trachea od hrtanu až po bifurcatio tracheae a byla přenesena do Tyrodova roztoku o teplotě 37 °C, probublávané kyslíkem s oxidem uhličitým (Carbogen). Pak bylo poживo co možná nejdokonaleji odděleno, načež byl preparát jemnými nůžkami spirálně rozstřižen v úhlu přibližně 45° a byly vystřiženy dva stejně velké úseky. Po zvážení byly oba preparáty na obou stranách opatřeny hedvábným vláknem. Jedno vlákno sloužilo k fixaci preparátu na dno lázníčky, druhé vlákno bylo vedeno na háček převaděče nad lázníčkou.

Pak bylo na preparáty vloženo předpětí přibližně 80 mN podle cejchovací křivky a preparáty byly ponechány v rovnovážném stavu 50 až 100 minut. V průběhu této fáze byl živný roztok v lázníčkách vyměňován v intervalech 15 minut. Jakmile bylo stabilizováno klidové svalové napětí preparátu, byly kumulativně přidávány účinné látky, přičemž přidávání další vyšší koncentrace bylo uskutečněno až v tom okamžiku, kdy již nebylo možno pozorovat žádné další zvýšení stavů (Plateau). Jakmile je dosaženo maximální výšky koncentrace preparátu, preparát se několikrát propláchně. Po další ekvilibrační fázi se v tomto případě opakuje kumulativní přidávání účinné látky, v tomto případě za současné přítomnosti zkoumaných látek nebo referenčních antagonistů.

3.6. Analýza a přístroje

3.6.1. Promývací část sestává z lázničky tvaru L, v jejímž dutém prostoru v delším rameni se nachází dvojitá skleněná spirála, kterou se přivádí do lázničky živný roztok (obsah 28 ml, kratší rameno). Tato láznička je rozdělena na dvě komory, které jsou však spolu spojeny příčnými spojkami. Tímto způsobem je možno dosáhnout zásobování orgánu prostředkem Carbogen (složení: 95 % kyslíku, 5 % oxidu uhličitého) nepřímo z kratší zadní komory, takže orgán nevisí přímo pod přívodem plynu, což dovoluje mimo jiné dokonalejší registraci reakce orgánu. Komory a skleněná spirála jsou temperovány odděleným oběhem kapaliny zevně na teplotu 37 °C. Toto temperování lázničky se uskutečňuje termostatem ("Colora"-Ultra-Thermostat typ K, Colora Messtechnik GmbH, Düsseldorf), termostat slouží současně jako čerpadlo. Aby bylo vždy k dispozici dostatečné množství živného roztoku, nachází se nad lázničkou zásobník s dvojitou stěnou, v němž se živný roztok také temperuje a sytí kyslíkem s oxidem uhličitým. Přes skleněný kohout a polypropylenovou hadičku je tento zásobník spojen s dvojitou skleněnou spirálou uvnitř urganové lázničky.

3.6.2. K měřicímu a registračnímu zařízení patří převaděč (Statham-Universa-Zelle UC-2, Hugo Sachs, Elektronik KG, 7801 Hugstetten). Pomocí závažíčka je možno vložit na orgán předpětí 40 mN, což je možno převést jako elektrický signál přes spojovací kabel na zesilovač. Zesílení se stupňovitě řídí tak, aby předpětí mělo vždy určitou stálou hodnotu na škále, popřípadě analogickou hodnotu na milimetrovém papíru při použití pisátka (v závislosti na zesílení). Po upevnění orgánu se nejprve preparát zatíží dvojnásobně na 80 mN. Pisátko, spojené se zesilovačem (Fa. Hellige, Freiburg/Breisgau) registruje všechny analogické signály na termosensibilní papír s milimetrovým dělením. Pak se zesílení z pisátka řídí tak, aby zatížení 40 mN na převaděči odpovídalo výkyvu 4 cm (cejchování: zatížení vyvolá střední výchylku přibližně 4 cm).

3.7. Vyhodnocení

Kumulativní přidávání účinné látky vede na izolované spirále z tracheí ke zvýšení stahů, které je závislé na dávce a které je na analogovém pisátku proporcionálně zaznamenáváno. Z těchto protokolů je pak možno provádět kvantitativní vyhodnocení křivek po kumulativním přidávání dalších látek způsobem, popsáným v publikaci Van Rossum J. M.: Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters, Arch.int. Pharmacodyn. 143, 299 - 330 (1963). K tomuto účelu se absolutní měřicí údaje v milimetrech, získané při maximálním účinku E_{Am} nebo E_{AmB} převedou na procentuální údaje, které jsou v případě maximálního účinku 100 %. Pomocí nelineární regrese se z těchto údajů získá pro každý jednotlivý preparát poměr molární koncentrace účinné látky (quocient = x), který je zapotřebí k dosažení poloviny maximálního účinku za přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoumaných látek nebo referenčních antagonistů při molární koncentraci [B] ($-\log[B] = pA_x$) ze vzorce $pA_2 = pA_x + \log(x-1)$ se podle publikací Schild H. O.: pA , a new for measurement of drug antagonism. Brit. J. Pharmacol. 2, 189 (1947) a Ariens E. J., J. M. Van Rossum: pD_x , pA_x a pD_x values in the analysis of pharmacodynamics, Arch. int. Pharmacodyn. 110, 275 až 300 (1957) vypočítá negativní dekadický logaritmus (pA_2) molární koncentrace antagonisty, při níž x má hodnotu 2, to znamená, že při předběžném uvedení antagonisty v odpovídající molární koncentraci je třeba molární koncentraci účinné látky zdvojnásobit, aby se dosáhlo stejného účinku jako bez vlivu antagonisty. Kvalita antagonismu (kompetitivní/nekompetitivní) může být sledováno srovnáním maximálního účinku za nepřítomnosti (E_{Am}) a v přítomnosti (E_{AmB}) zkoumaných látek a referenčních antagonistů, a to statisticky párovým t-testem. Nakonec se přezkoumá rozdíl pA_2^+ s (zkoumaná látka a referenční antagonist) na statistickou významnost (t-test dvou nezávislých vzorků).

4. Výsledky

Sloučenina MP 194 a ipratropiumbromid vykazují na izolovaných spirálách průdušnice morčet srovnatelný, na dávce závislý antagonismus proti cholinergní účinné látce acetyl-

- β -methylcholinchloridu, jak je zřejmé z obr. 1. Hodnota $pA_2 \pm s$ pro MP 194 je $9,26 \pm 0,29$, což se statisticky významně neodlišuje od $pA_2 \pm s$ pro ipratropiumbromid, pro nějž je tato hodnota $9,31 \pm 0,39$ jak je zřejmé z tabulky.

Kvalita antagonismu je jak v případě MP 194, tak v případě ipratropiumbromidu na základě srovnání mezi maximálním účinkem za přítomnosti a nepřítomnosti těchto látek kompetitivní, jak je rovněž zřejmé z tabulky.

5. Závěry

Byla vyšetřována významná anticholinergní účinnost sloučeniny MP 194 na izolovaných spirálách průdušnice morčete, pokusy byly prováděny na doplnění dříve uskutečněných pokusů, provedených na bdících zvířatech.

Lepší kvantifikace výsledků in vitro vede k závěru, že účinnost sloučeniny MP 194 je srovnatelná s účinností referenční látky Ipratropiumbromidu, jak je zřejmé z hodnot pA_2 . Z tohoto důvodu je možno předpokládat kompetitivní polymergí antagonismus obou látek, jak je zřejmé z hodnot E_{AmB}/E_{Am} .

Tabulka

	MP 194	Ipratropiumbromid
$pA_2 \pm s$	$9,26 \pm 0,29$	$9,31 \pm 0,39$
$E_{AmB}/E_{Am} \pm s$	$1,09 \pm 0,22$	$1,10 \pm 0,24$

Spasmolytické účinky sloučenin, získaných způsobem podle vynálezu byly zkoumány při použití následujících látek:

Sloučenina z příkladu:

- 2 = 3 α -benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-(3'-pyrrolinium)chlorid
- 3 = 3 α -benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-isoindoliniumchlorid
- 4 = 3 α -benziloyloxynortropan-8-spiro-4'-morfoliniumchlorid
- 5 = 3 α -benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidino [3',4',b]chinoxaliniumbromid
- 6 = 3 α -benziloyloxynortropan-8-spiro-2'-(2'-aza-3H-fenalenium)bromid.

Jako srovnávací sloučenina byl užit trospiumchlorid (sloučenina z příkladu 1).

Pokusy byly prováděny na izolovaném tenkém střevu krysy.

Živočišný materiál

Druh zvířete:	krysa
Kmen:	Wistar
Původ:	Mus rattus AG, Brunnthal
Pohlaví:	samci i samice
Hmotnost:	150 - 250 g
Doba pobytu:	1 týden

Uskladnění zvířete

Klece:	uzavřené klece, neklimatizované
Teplota:	20 ± 2 °C
Relativní vlhkost:	50 ± 10 %
Osvětlení:	Denní světlo, navíc osvětlení neonovými zářivkami tak, aby denní světlo měla zvířata od 7,00 až 18,00 hodin

Vybavení klece: Makrolonová spodní část, klece typu 4, s 10 krysami, podestýlka z pilin

Krmivo: ssniff^R - standardní krmivo (Versuchstierdiäten-GmbH, 4770 Soest) podle libosti

Pitná voda: Voda z vodovodu z plastických lahví s rourkami z ušlechtilé oceli podle libosti

Účinné látky, dávky

Zkoumané látky: sloučeniny z příkladů 1 až 6

Rozpouštědlo: demineralizovaná voda

Koncentrace: $1,185 \times 10^{-8}$ g/ml obsah lázničky (proti Carbacholu)

Aplikační objem: 0,25 ml

Doba působení látky, vyvolávající křeče: 3 min

Celkové působení: 8 min

Další látka

Označení: Carbamoylcholin (Carbachol)-hydrochlorid (Fa. Merck, Darmstadt) č. katalogu 500 940

Sumární vzorec: $C_6H_{15}ClN_2O_2$

Rozpouštědlo: demineralizovaná voda

Aplikační objem: 0,25 ml

Doba působení: 5 min

Koncentrace/ml obsah lázničky:

- 4×10^{-9} g/ml
- 2×10^{-8} g
- 1×10^{-7} g
- 5×10^{-7} g
- $2,5 \times 10^{-6}$ g
- $1,25 \times 10^{-5}$ g
- $6,25 \times 10^{-5}$ g

Ringerův živný roztok má následující složení:

NaCl	= 9,000 g
KCl	= 0,210 g
NaHCO ₃	= 0,500 g
C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	= 0,500 g
CaCl ₂ x H ₂ O	= 0,318 g

Všechny sloučeniny byly dodány obchodně E. Merck, Darmstadt.

Provedení pokusu

Krasy byly usmrceny ranou do týla. Břicho bylo otevřeno ve střední čáře, byl vyňat 10 cm dlouhý úsek ilea, který byl ihned přenesen do fyziologicky temperovaného živného roztoku a pak byl dvakrát opatrně promyt injekční stříkačkou o objemu 10 ml živným roztokem k odstranění střevního obsahu. K pokusu se oddělí dva úseky střeva o délce 2 cm, zbývající úsek střeva se uloží do lednice. Oba úseky střeva se v živném roztoku ještě zbaví případné pojivové tkáně. Na jeden konec se naváže hedvábné vlákno pro fixaci střeva v lázničce, na druhý konec se upevní delší vlákno k upevnění na páčku pisátka. Úsek orgánu se pak pověsí do lázničky s živným roztokem, probublávané prostředkem Carbogen (95 % kyslíku

a 5 % oxidu uhličitého) a zatíží se 0,5 g. Po 30 minutách klidové fáze je možno provést pokus.

Nejprve se stanoví vztah dávky a účinku u látky, vyvolávající křeč. Zkoumaný roztok se vstříkne do lázničky pomocí tuberkulinové injekční stříkačky. Předem se bere ohled na objem lázničky a objem roztoku. Volí se koncentrace, které vyvolají účinek větší než 10 % až 100 % v geometrické řadě, přičemž 100% účinek je účinek, při němž již nelze dokázat vyšší efekt při dalším zvyšování reakce. Všechny účinky nižších koncentrací se počítají vztahují na tuto koncentraci, která se považuje za 100 %. Tímto způsobem je možno vytvořit křivku v závislosti účinku na koncentraci.

Látka, vyvolávající křeč (spasmodikum) se nechá působit 5 minut, pak se třikrát vymění obsah lázničky a úsek střeva se ponechá v klidovém stavu 30 minut.

Po stanovení stahu mezi koncentrací a účinkem spasmodika se zkoumá antagonistický účinek zkoumaných látek. K tomuto účelu se zkoumaná látka v určité koncentraci uvede do lázničky 3 minuty před dávkou spasmodika. Jinak probíhá pokus stejně. Látka, působící křeč, se použije ve stoupajících koncentracích, láznička se vždy třikrát promyje a následuje doba klidu 30 minut. V závislosti na účinku se mění koncentrace zkoumané látky, přičemž pro každou koncentraci se užije 10 pokusů.

Analýza a zařízení

Zařízení sestává z vodorovně fixovaného, přibližně 66 cm dlouhého válce s dvojitou stěnou, s přívodními a odvodními kohouty na koncích, s dvěma spirálami pro vyhřívání lázničky, které jsou opatřeny zevně vlastními kohouty, celkový objem lázničky je 25 ml. Z ultrathermostatu (Fa. Colora) se nechá obíhat pláštěm lázničky demineralizovaná voda, zahřívá na 39 °C, takže živný roztok se rovnoměrně zahřívá. Tento roztok se vede do lázničky z výše položeného zásobníku hadičkou do spirál. Na dně lázničky jsou otvory, které slouží ke kontinuálnímu probublávání živného roztoku prostředkem Carbogen, láznička je opatřena skleněnými háčky, na něž je možno pověsit úseky střeva, jejichž druhé konce s delším vláknem jsou spojeny s kovovou páčkou písátka pro zapisování stahů. Písátko se zatíží a hrot písátka se položí na MP-papír kymografického bubnu o průměru 200 mm. MP-papír se v průběhu pokusu odvíjí ze zásobního kotouče, upevněného na stole. Papír se pohybuje rychlostí 2,62 mm/min. Výška zápisu se řídí přes MP-generátor se zabudovaným potenciometrem. K lepšímu průchodu proudu se uloží na MP-papír kontaktní válec, který je spojen s uzemněním MP-generátoru.

Záznam na MP-papíru se po ukončení pokusu fixuje speciálním postříkem.

Všechny přístroje, potřebné k registraci byly dodány obchodně (Fa. Braun, Melsungen).

Vyhodnocení

Pro každou koncentraci v g/ml byl stanoven aritmetický průměr a standardní odchylka ($\bar{x} \% \pm s$) pro spamodický účinek.

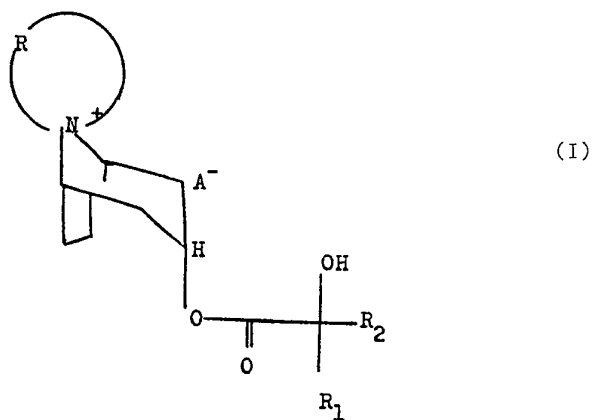
Výsledky

50% křečového účinku je možno dosáhnout samotným Carbacholem (slepý pokus) při koncentraci $4,4 \times 10^{-8}$ g/ml.

Při použití svrchu uvedených látek se spasmolytickým účinkem v koncentraci $1,18 \times 10^{-8}$ g/ml jsou k vyvolání 50% křečí nutné koncentrace Carbacholu přibližně 10^{-6} g/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

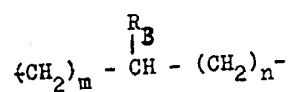
1. Způsob výroby azoniaspironortropanolových esterů obecného vzorce I



kde

R znamená

a) alkylenový zbytek obecného vzorce

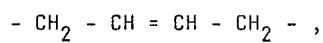


kde

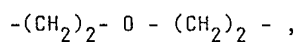
 R_3 znamená atom vodíku nebo alkyl o 1 až 4 atomech uhlíku a

n a m znamená celé číslo 1 až 4,

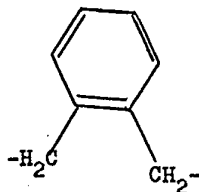
b) alkenylový zbytek obecného vzorce



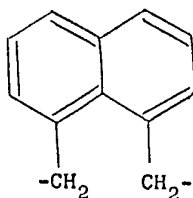
c) oxaalkylový zbytek obecného vzorce



d) o-fenylenový zbytek vzorce

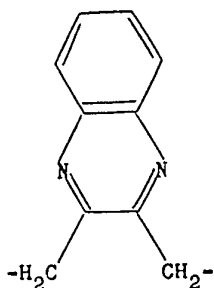


e) perinaftylenový zbytek vzorce



a

f) 2,3-chinoxylinový zbytek vzorce



kde

R_1 a R_2 , stejné nebo různé, znamenají fenyl alkylfenyl, alkoxyfenyl nebo halogenfenyl, přičemž alkoxy skupina a alkylová skupina v těchto zbytcích má přímý nebo rozvětvený řetězec a obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku a

A^- znamená anion jednosytné až trojsytné anorganické kyseliny,

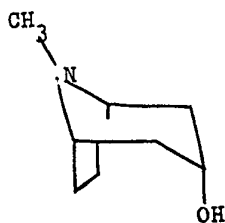
a) demethylací tropinu na nortropin,

b) reakcí nortropinu s dihalogenidy na odpovídající azoniasloučeniny a

c) tyto sloučeniny se esterifikují,

vyznačující se tím, že se

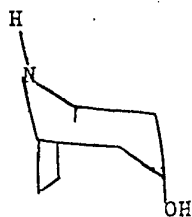
A) demethylace tropinu vzorce II



(II)

na nortropin provádí tak, že se na tropin působí chloralkanem o 1 až 3 atomech uhlíku s obsahem alespoň jedné skupiny CCl_3 za přítomnosti oxidačního činidla v alkalickém vodném roztoku nebo se tropin uvede do reakce s esterem kyseliny chlormravenčí za přítomnosti činidla, které váže kyselinu za vzniku 8-alkoxykarbonylnortropinu a tato látka se hydrolyzuje působením zásady ve vodném roztoku,

B) takto získaný nortropin vzorce III



(III)

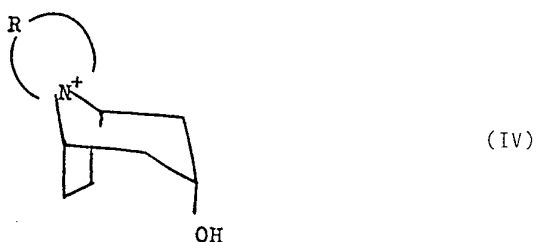
se uvede do reakce v dipolárním aprotickém rozpouštědle se sloučeninou obecného vzorce



kde A a R mají svrchu uvedený význam,

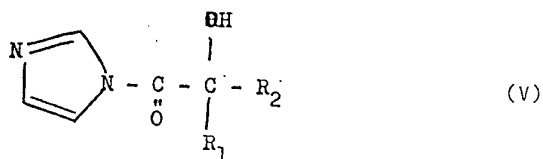
při teplotě místnosti po dobu jednoho nebo většího počtu dnů a

C) takto získaná sloučenina obecného vzorce IV



kde R a A⁻ mají svrchu uvedený význam,

se esterifikuje v bezvodém dipolárním aprotickém rozpouštědle imidazolidem obecného vzorce V



kde R₁ a R₂ mají svrchu uvedený význam,

za přítomnosti katalyzátoru,

D) v případě, že zbytek R obsahuje jednu nebo větší počet dvojných vazeb v azoniovém kruhu po provedení stupňů B a/nebo C, je možno tyto nenasyčené sloučeniny hydrogenovat v polárním rozpouštědle pomocí katalyzátoru na bázi ušlechtilých kovů na odpovídající nasycené sloučeniny, čímž se získají sloučeniny obecného vzorce I, v nichž R má význam, uvedený za a).

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se v prvním provedení stupně A) demethylace provádí hexakynoželezitanem draselným, chloroformem a hydroxidem sodným.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se v prvním provedení stupně A) užije až pětinasobku molárního množství chloralkanu, vztaženo na tropin.

4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se v prvním provedení stupně A) teplota pohybuje v rozmezí 20 až 30 °C.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se ve druhém provedení stupně A) postup provádí v chloroformu za přítomnosti hydrogenuhličitanu alkalického kovu.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že ve stupni B) je poměr nortropinu, aminu a dihalogenidu 1 : 2 : 4.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že katalyzátorem ve stupni C) je 4-N,N-dimethylaminopyridin.

8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako aminu ve stupni B) užije diethylaminu.

9. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se ve stupni C) jako dipolární aprotické rozpouštědlo užije acetonitril.

10. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se ve stupni B) jako dipolární aprotické rozpouštědlo užije dimethylformamid, nebo acetonitril a/nebo chloroform.

11. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se ve stupni D) hydrogenace provádí ve vodě nebo v alkoholu o 1 až 4 atomech uhlíku při použití dioxidu platiny nebo paladia na aktivním uhlí.

12. Způsob podle bodu 11, vyznačující se tím, že se jako polární rozpouštědlo užije methanol.