

Die N-Oxidation - ein Zwischenschritt bei der Biosynthese von Lactamen aus tertiären Cycloalkylaminen***)

Herbert Oelschläger* und Wolfgang Schmidt**)

Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M., Georg-Voigt-Str. 14, D-6000 Frankfurt a.M.

Eingegangen am 5. Dezember 1990

Arzneistoffe vom Typ *N*-substituierter Cycloalkylamine, z.B. Pyrrolidin- und Piperidin-Derivate, werden im Stoffwechsel häufig in ihre 2-Oxoderivate, d.h. in Lactame übergeführt. Als anerkannter Mechanismus galt bisher, daß durch Cytochrom P-450 und Luft-O₂ zuerst das entspr. Halbaminale gebildet wird, das durch anschließende, schnell verlaufende Dehydrierung das 2-Oxo-derivat gibt und daher nicht einer C-N-Spaltung zu Aldehyd und Amin unterliegt.

Versuche mit einem tertiären ¹⁸O-Aminoxid (*N*-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin-¹⁸O-*N*-oxid) brachten erstmalig den Nachweis einer konkurrierenden Reaktion, die direkt von den Aminoxiden zu den entspr. 2-Oxoderivaten führt. Ein Mechanismus für diesen "Frankfurt Shift" wird diskutiert.

N-Oxidation - an Intermediary Step Occuring during Biotransformation of Cycloalkylamines with Subsequent Formation of their 2-Oxo-Derivatives

Drugs being *N*-substituted secondary cycloalkylamines, e.g. derivatives of pyrrolidine and piperidine, are often metabolized to the corresponding 2-oxo-derivatives (lactames). The accepted mechanism of this reaction may be postulated as follows: 1) formation of the semiaminal by cytochrom P-450, 2) rapid oxidation and subsequent formation of the 2-oxo-derivative. This reaction is fast, so that no cleavage of the semiaminal to the corresponding aldehyde and amine occurs.- Using an ¹⁸O-amineoxide (*N*-(4-fluorobenzyl)-pyrrolidine-¹⁸O-*N*-oxide) an *O*-shift with the formation of its 2-oxo-derivative without a semiaminal as an intermediate has been proved. The mechanism of this novel *O*-shift, which is named "Frankfurt shift", is discussed.

1. Einleitung

Sekundäre cycloaliphatische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Piperazin oder auch Morpholin, haben sich vielfach als Bausteine bei der Synthese von Arzneistoffen, z.B. von Psychopharmaka, bewährt. Die resultierenden tertiären Amine werden bei der Biotransformation in der basischen Komponente unterschiedlich entweder durch Angriff am N oder am benachbarten C verändert. Durch Angriff am N entstehen, abhängig von Basizität und Nucleophilie des Substrats, durch Cytochrom P-450-bzw. FMN-abhängige Enzymsysteme *N*-Oxide, die aufgrund ihrer erhöhten Polarität und besseren Wasserlöslichkeit durchweg zur renalen Elimination prädestiniert sind¹⁾. Der Angriff am α-C-Atom führt letztlich zu mehreren molekularen Variationen des betreffenden Arzneistoffes. Die primär gebildeten Halbaminale sind nahezu ausnahmslos instabil und zerfallen nicht-enzymatisch unter Lösung der N-C-Bindung zu einem sek. Amin und einem Aldehyd. Dieser Aldehyd wird durch Aldehydoxidasen zur Carbonsäure oxidiert, so daß als Endprodukt eine unphysiologische Aminosäure entsteht. Seltener erfolgt Reduktion zum Alkohol. Auf diesem Wege wird aus der Pyrrolidinkomponente des Analeptikums Prolintan²⁾ bevorzugt eine Aminosäure, ebenso aus der Piperidinkomponente des Phencyclidin³⁾. Allerdings werden Ringöffnungen dieser Art relativ selten beobachtet, weil im allgemeinen die Oxidation des Halbaminals zum entspr. Lactam wesentlich schneller verläuft. Die beim Prolintan²⁾ ebenfalls eintretende Lactambildung (< 1.6%) erfolgt unter quantitativen Aspekten ebenso wie bei der Piperidinkomponente des Diuretikums Etozolol⁴⁾ (3-4%) in geringerem Umfang als die break-down-reaction. Das bei diesen Halbaminalexidationen beteiligte Enzym ist bisher nicht näher charakterisiert worden, gehört aber wahrscheinlich zu einem Cytochrom P-450-abhängigen Enzymsystem, da die Lactambildung z.B. beim nichtsteroidalen Antiphlogistikum Emorfazon⁵⁾ durch Vorinkubation mit Phenobarbital erhöht wird.

Komplizierter sind die Biotransformationsreaktionen bei Morpholinderivaten. Auch sie können in *N*-Oxide bei der Körperpassage übergeführt werden. So wird z.B. das von Oelschläger et al. entwickelte Analgetikum 3-(β-Morpholinoethoxy)-1*H*-indazol (O/Ma 35)⁶⁾ bei 3 Species (Ratte, Hund, Mensch) ebenso wie das Lokalanästhetikum Fomocain⁷⁾ (Ratte, Hund) am N oxidiert. Da zwei Heteroatome im Morpholinring enthalten sind, entstehen 2- und/oder 3-Oxoderivate. Als Zwischenprodukte fallen entweder ein instabiles basisches Halbacetal oder ein instabiles Halbaminale an, die weiterreagieren. Das Halbacetal kann sich entweder durch *O*-Dealkylierung oder durch enzymatische Oxidation zum entspr. basischen Lacton stabilisieren. Das beteiligte Enzym ist eindeutig Cytochrom P-450-abhängig, da die Lactonbildung durch 3-Methylcholanthren induzierbar ist⁵⁾. Ein solcher Ablauf der Biotransformation ist beim β-Blocker Timolol⁸⁾ beobachtet worden. Beim Analeptikum Doxapram⁹⁾ erfolgt dagegen die Oxidation am C-3 unter nachfolgender Öffnung der Morpholinkomponente.

2. Problemstellung

Aufgrund ihres großen Dipolmomentes und der dadurch bedingten Solvation werden tert. *N*-Oxide im allgemeinen rasch renal ausgeschieden und nicht weiter metabolisiert. Allerdings gibt es auch mehrere Beispiele dafür, daß sie im Organismus zu den Ausgangsverbindungen rückreduziert werden können¹⁰⁾. Ferner wurde in einigen Fällen eine manchmal bereits bei Körpertemp. verlaufende *Cope*-Elimination beobachtet, bei der das intermediär entstehende Alken sehr rasch weiter metabolisiert wird. Ein solcher Reaktionsverlauf ist z.B. vom Antihistaminikum Promethazin¹¹⁾ und vom Antidepressivum Equilibrin¹²⁾ bekannt geworden. Ausnahmen von diesen allgemeinen Erfahrungen sind belegt: So ist das *N*-Oxid des 3-Diethanolamino-1-(4-phenoxymethylphenyl)propan sehr wenig wasserlöslich aufgrund der Bildung von Mizellen. Der c_x-Wert wurde mit 3,0 × 10⁻⁷ M ermittelt¹³⁾.

***) Über den *O*-Shift vom N zum C wurde von W. Sch. zuerst in München am 20.9.1989 im Rahmen des "4th International Symposium on the Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules" vorgetragen.

****) Herrn Prof. Dr. Dr. E. Mutschler, Frankfurt a.M., mit den besten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet.

Bisher sind aber u.W. kaum Beispiele dafür publiziert worden, daß *N*-Oxide von tertiären cycloaliphatischen Aminen Substrate für weitere metabolische Umsetzungen sein können. Lediglich von *Oelschläger* und *Houshyar*¹⁴⁾ wurden bei der *i.v.*-Injektion von *N*-Oxiden aus der Fomocain-Reihe an Ratten sowohl Reduktion als auch *p*-Hydroxylierung in der Phenolkomponente gefunden, während Ringöffnungen nicht beobachtet wurden.

Vor kurzem fanden wir nun, daß bei der Inkubation von *N*-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin-*N*-oxid (1) mit dem 10000 x g-Überstand des Rattenleberhomogenats als einziger Metabolit das entspr. Lactam *N*-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidon-2 (3) auftrat¹⁵⁾ (s. Abb. 1):

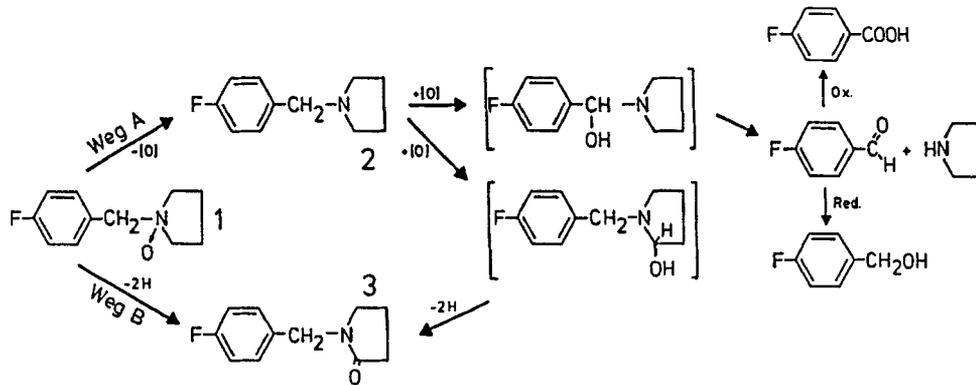


Abb. 1: Biotransformationswege von 1 zu 3

Dieser Befund konfrontierte uns mit der interessanten Frage, ob die Bildung dieses Metaboliten auf dem Weg A über die Rückreduktion des *N*-Oxids 1 zu dem entspr. Amin 2 mit anschließender Hydroxylierung am C-2 und Oxidation dieses Halbaminals zum Lactam oder durch einen vorher unbekannt, von uns aber vermuteten direkten Shift (Weg B) des *N*-Oxid-Sauerstoffs zum C-2 erfolgen könnte, wobei 2 \ominus und 2 H^+ eliminiert werden.

Um diese Frage experimentell zu klären, planten wir Versuche mit *N*-(4-Fluorbenzyl)pyrrolidin-¹⁸O-*N*-oxid. Da die Inkubation in einer Atmosphäre mit dem mengenmäßig dominierenden ¹⁶O₂ stattfindet, kann das ¹⁸O markierte Lactam durch die Inkubation eines ¹⁸O-*N*-Oxides nur dann entstehen, wenn eine intramolekulare Verschiebung des *N*-Oxid-Sauerstoffs zur benachbarten Methylengruppe stattfindet. 1 wurde auch deswegen als Modellsubstanz gewählt, weil das ringständige Fluoratom die als Nebenreaktion verlaufende Hydroxylierung des Aromaten blockiert. Als Parallelreaktion zu dem postulierten Shift verblieb somit lediglich die Möglichkeit der Oxidation am benzylichen C-Atom unter Bildung des entspr. Halbaminals mit nachfolgender Trennung der N-C-Bindung, wobei 4-Fluorbenzoesäure bzw. 4-Fluorbenzylalkohol über den intermediär gebildeten Aldehyd neben Pyrrolidin entstehen können (s. Abb. 1).

3. Lösung des Problems

1 wurde aus *N*-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin (2) und ¹⁸O₂ synthetisiert. Hilfreich war eine von *Schmidt*¹⁶⁾ 1972 beschriebene Methode der Synthese ¹⁸O-markierter *N*-Oxide.

Das erforderliche H₂¹⁸O₂ wurde nach *Anbar et al.*¹⁷⁾ hergestellt, wobei Bariumhydroxid mit Hydroxylamin und ¹⁸O₂ (¹⁸O-Anteil 50%) in Wasser in einer geschlossenen Apparatur unter Rühren bei Raumtemp. reagiert. Nach 24 h fällt markiertes, in H₂O unlösliches Bariumperoxid an, das durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Mit Perchlorsäure wird H₂¹⁸O₂ freigesetzt, durch Vakuumdestillation gereinigt und bis auf 0.3% (permanganometrische Titration) konzentriert. 2 reagiert mit so geringen Konzentrationen von H₂¹⁸O₂ nur dann in befriedigenden Ausbeuten zum markierten 1, wenn dem Ansatz Natriumhydrogencarbonat/Natriumpyrophosphat als Katalysator zugesetzt werden¹⁸⁾. Das markierte *N*-Oxid wurde sc gereinigt, sein Markierungsgrad betrug 27.7%.

Die Inkubation wurde bei 37°C mit dem 10000 x g-Überstand homogener Rattenleber als Enzymlösung, markiertem 1 sowie NADP, Glucose-6-phosphat, MgCl₂ und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als Cofaktoren durchgeführt¹⁹⁾. Anschließend wurde mit destilliertem Diethylether extrahiert. Die Etherextrakte wurden dc neben den Referenzsubstanzen 1 und 3 auf Kieselgel untersucht. Die bei 265 nm detektierbare Bande von 3 wurde eluiert und ms analysiert.

Dieses Massenspektrum entspricht dem von 3, mit Ausnahme von zwei zusätzlichen Signalen bei *m/z* 195 und 196. Diese ¹⁸O-bedingten Signale im MS*) des durch Inkubation des ¹⁸O-*N*-Oxids gewonnenen Lactams beweisen eindeutig den postulierten Shift des *N*-Oxid-Sauerstoffs vom *tert.* Stickstoff auf die α -Methylengruppe mit nachfolgender Deprotonierung, also mit dem Gesamteffekt einer Oxidation.

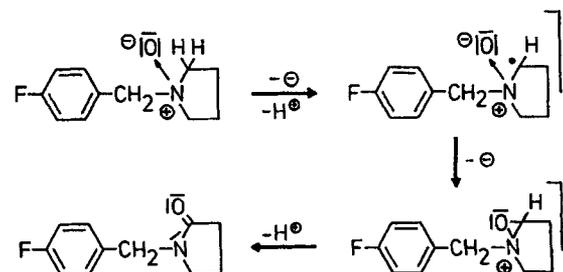


Abb. 2: Möglicher Mechanismus des "Frankfurt Shift"

*) Herrn Dr. *Fehlhaber*, Hoechst AG, danken wir für einige Messungen.

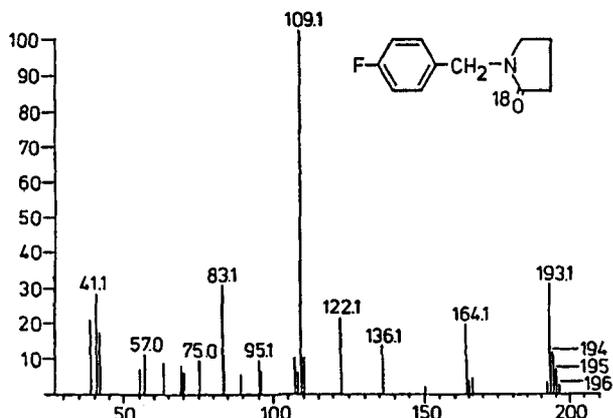
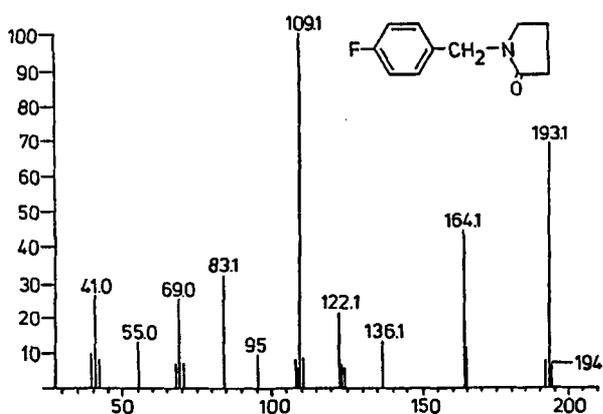
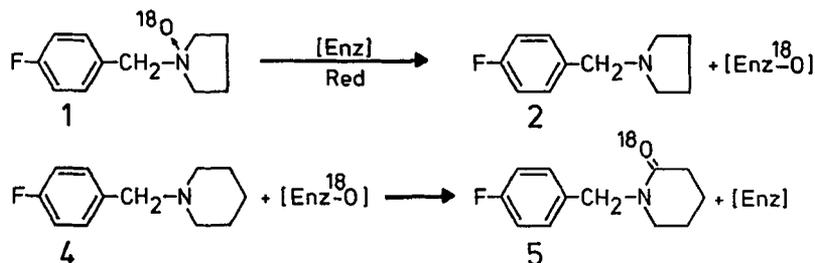


Abb. 3: EI-MS der Pyrrolidone

Da die Signale (s. Abb. 3) bei m/z 195 und 196 nur ca. 20% bzw. 10% der Intensität des Signals bei m/z 193 aufweisen, stellt der gefundene Shift, für den wir die Bezeichnung "Frankfurt-Shift" vorschlagen, unter quantitativen Aspekten einen sekundären Biotransformationsweg dar. Die Hauptmenge des *N*-Oxids (ca. 60-70%) wird, wie wir durch HPLC-Messungen beweisen konnten, zum Amin rückreduziert, das z.T. durch ein Cytochrom P-450-abhängiges En-

Abb. 4: Nebenreaktion des ^{18}O

zymsystem mit $^{16}\text{O}_2$ zum Halbaminal und weiter zum Lactam oxidiert wird. Ein weiterer Teil unterliegt der C-N-Spaltung zum Pyrrolidin und 4-Fluorbenzaldehyd. Die HPLC-Untersuchungen zeigten ferner, daß innerhalb der ersten 15 min nach Inkubationsbeginn die Bildungsgeschwindigkeit für das Amin (Weg A) größer war als für das Lactam aus dem *N*-Oxid (Weg B).

Um auszuschließen, daß es sich bei den Signalen m/z 195 und 196 um Artefakte der analytischen Aufarbeitung handelte, wurde der Inkubationsversuch so variiert, daß als

Substrat nichtmarkiertes *N*-Oxid eingesetzt wurde. Wären die beiden Zusatzsignale ein analytisches Artefakt gewesen, so hätten sie zwangsläufig auch in diesem Massenspektrum auftreten müssen.

Ein zweiter möglicher Einwand gegen die Enzymbeteiligung bei der Umwandlung von **1** könnte eine bislang nicht bekannte chemische Reaktion sein, die nicht-enzymatisch von *N*-Oxiden zu Lactamen führt. Durch Wiederholung des vorstehenden Versuches mit boiled microsomes, der negativ verlief, wurde dieser theoretische Einwand völlig entkräftet. Der Einfluß der Hitze-Denaturierung war schon bei der Auswertung der DC des Ethyletherextraktes erkennbar: Es fehlte die Lactam-Bande. Somit ist die Enzym-Beteiligung beim Frankfurt-shift bewiesen worden.

Um die evidente Frage, ob es sich wirklich um einen *Shift* handelt, zu entscheiden, wurde ein Kreuzexperiment durch gemeinsame Inkubation von **3** mit *N*-(4-Fluorbenzyl)-piperidin (**4**) durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben. Als Referenzsubstanz diente *N*-(4-Fluorbenzyl)-piperidon-2 (**5**). Durch Auswertung von 15 ms-Einzelmessungen der so erhaltenen Probe im Vergleich mit den MS der eingesetzten Substanzen: markiertes **1**, **3** und **5** konnte bei einem ^{18}O -Markierungsgrad der Ausgangssubstanz **1** von 27.7% festgestellt werden, daß in der Kreuzungsprobe 19.8 Mol% **3** mit einem ^{18}O -Markierungsgrad 25.3% und 64.7 Mol% **5** mit einem ^{18}O -Gehalt 8.5% enthalten waren. Daraus ergibt sich, daß von 13.9 Mol% ^{18}O , die bei der Inkubation eingesetzt wurden, 10.5 Mol% ^{18}O in der DC-Fraktion der Lactame wiedergefunden wurden. Aufgrund des ähnlichen Markierungsgrades von eingesetztem **1** (27.7%) und wiedergefundenem **3** (25.3%) ist die intramolekulare Umlagerung der wahrscheinlichste Mechanismus. Der schwere Sauerstoff zur enzymatischen Bildung von ^{18}O -**5** wird von dem **1**-Anteil geliefert, der zu **2** reduziert wird, wobei ^{18}O in z.Z. noch unbekannter Form am aktiven Zentrum des Cytochrom P-450-abhängigen Enzyms gebunden wird (s. Abb. 4).

Da die Meßgenauigkeit des benutzten Massenspektrometers (Varian MAT 212, 90 eV) lediglich ca. 1% der Signalgröße (Standardabweichung der Intensitätsverhältnisse bei den Einzelmessungen) betrug, sind alle vorstehenden Angaben hinsichtlich ihrer Genauigkeit korrekt.

4. Möglicher Mechanismus des O-Shifts

Als sehr wahrscheinlichen Mechanismus für die enzymatisch katalysierte Umwandlung von **1** in **3** schlagen wir ei-

nen überwiegend intramolekularen Shift vor, dessen erster Schritt in der Abstraktion von einem Proton und zwei Elektronen vom *N*-Oxid durch Cytochrom P-450 besteht (s. Abb. 2). Diese spezifische Reaktivität des Cytochroms P-450 wurde von *Galliani*²⁰⁾ durch eine multi-parameter lineare regression analysis für die *N*-Demethylierung von *N,N*-Dimethylanilinen nachgewiesen. Als kurzzeitiges Intermediat entsteht ein anelliertes Oxaziridinium-Ion, das sich durch Abspaltung eines H^+ zum Lactam stabilisiert. Somit kann eine intramolekulare Redoxreaktion (s. Abb. 2) formuliert werden, die vom tertiären *N*-Oxid zum Lactam führt. Gestützt wird der Shift durch den Befund einer japanischen Arbeitsgruppe²¹⁾ (1982), die bei der Untersuchung der *O*-Demethylierung von Anisolderivaten sowohl mit Mikrosomen als auch mit einem rekonstituierten Enzymsystem mit Cytochrom P-450 festgestellt hatte, daß die Demethylierung von Anisolen über die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom α -C-Atom durch den an das komplexierte Eisen des Cytochrom P-450 gebundenen "Oxenoid"-Sauerstoff erfolgt. Diese Abspaltung²¹⁾ ist dem einleitenden Schritt unseres shift von **1** zu **3** analog.

Um den shift weiter abzusichern, soll in geplanten Experimenten das nicht markierte *N*-Oxid in einer Atmosphäre mit ^{18}O -Sauerstoffgas inkubiert sowie der in anderen Arbeiten^{22,23)} beschriebene kinetische Isotopieeffekt zum Nachweis der Umlagerung herangezogen werden. Erfolgt die Lactambildung ausschließlich durch die beschriebene Umlagerung, so müßte bei dem Experiment mit nicht markiertem *N*-Oxid in $^{18}O_2$ der höchste MS-Peak bei *m/z* 194 auftreten. Ist dagegen die Umlagerung vom *N*-Oxid zum Lactam nur einer von mindestens zwei möglichen Biotransformationswegen, so könnte zwar auch ein Signal beim *m/z*-Wert 196 auftreten, das aber bei diesem Experiment relativ zum Signal mit der höchsten Intensität kleiner sein müßte als bei der Inkubation von ^{18}O -*N*-Oxid in Normal-Luftsaauerstoff-Atmosphäre. Der kinetische Isotopieeffekt würde sich dadurch zu erkennen geben, daß bei sonst identischen Inkubationsbedingungen aus dem nicht markierten *N*-Oxid das Lactam etwas schneller gebildet wird als aus dem markierten *N*-Oxid^{22,23)}. Über die Ergebnisse dieser beiden Kontrollexperimente wird demnächst berichtet werden.

Die pharmakokinetisch-pharmakologische Bedeutung des neuen *O*-Shift kann erst nach Vorliegen von Berichten über weitere Substanzen, die auch dem shift unterliegen, näher beurteilt werden. Auf jeden Fall repräsentiert das vorstehende Beispiel einen neuen wichtigen Beitrag zum Verhalten von *N*-Oxiden im Stoffwechsel. Es sichert erstmals im Analogieverständnis die schon früh von *Bickel*¹⁰⁾ ausgesprochene Vermutung, daß die oxidative Entalkylierung von tertiären Aminen z.T. auch über deren *N*-Oxide verlaufen kann (*Bickel's triangle*).

Experimenteller Teil

1. Darstellung des $H_2^{18}O_2$ aus markierten $^{18}O_2$ nach¹⁷⁾

In drei 250 ml-Erlenmeyerkolben wurden a) 36.89 g (109.7 mmol) Bariumperchlorat in 59.3 ml Wasser; b) 1.70 g (10.4 mmol) Hydroxylaminsulfat in 51.7 ml Wasser und c) 7.96 g (199.0 mmol) NaOH in 102.0 ml Wasser ge-

löst. Der Inhalt der Kolben a und b wurde gleichmäßig auf 12 Sovirelgläser verteilt, die gut geschüttelt und dann 5 min bei 2000 x g zentrifugiert wurden. Der $BaSO_4$ -Niederschlag wurde verworfen und der Überstand mit Hydroxylaminperchlorat und Bariumperchlorat in einem 250 ml-Rundkolben mit dem Inhalt von Kolben c versetzt, wobei erneut eine Trübung durch $Ba(OH)_2$ auftrat. Diese Suspension wurde unter Rühren 15 min im Wasserstrahlvak. entgast. Dann zerstiess man mit einem Glasrohr und einem Metallspatel den inneren Verschluss der ^{18}O -Gasampulle und brachte die entgaste Suspension in die Gasampulle zusammen mit einem dünnen Magnetkern ein, wobei das der Suspension entsprechende ^{18}O -Gasvolumen verloren ging. Anschließend wurde die mit einem Überdruckventil versehene Gasampulle gasdicht verschlossen und 34 h bei RT gerührt. Danach wurde der Reaktionsansatz bei möglichst quantitativer Entfernung aller Niederschläge zentrifugiert und der schwach milchig-trübe Überstand verworfen. Als Niederschlag verblieben 15.8 g einer silbrig glänzenden Substanz, bei der es sich hauptsächlich um ein Gemisch von markiertem Bariumperoxid und Bariumperchlorat handelt. Der auf 8 Sovirelgläser aufgeteilte Niederschlag konnte in einer Mischung aus 10.0 g konz. $HClO_4$ und 20.1 g Wasser gelöst werden. Die Lösung wurde anschließend im Wasserstrahlvak. bei 20 bis 80°C so lange destilliert (ca. 3 h), bis eine sirupöse, weiße Masse zurückblieb. Im Destillat (29 ml) wurde H_2O_2 -Gehalt permanganometrisch zu 0.05 M bestimmt. Geht man von einem primär zur Reaktion gebrachten Sauerstoffvolumen von 300 ml unter Normalbedingungen aus, so beträgt die Ausb. bis zu diesem Punkt 10.8%.

2. Synthese des ^{18}O -markierten **1** aus **2** und $H_2^{18}O_2$

In 2.24 g Methanol wurden 306.0 mg (1.42 mmol) *N*-(4-Fluorbenzyl)pyrrolidinderhydrochlorid (**2**) gelöst und mit 54 mg der Katalyse-Mischung aus 6.5 Teilen $NaHCO_3$ und einem Teil Natriumpyrophosphat¹⁸⁾ versetzt. Dieser Mischung wurde unter Rühren in einem 100 ml-Rundhalskolben das o.a. H_2O_2 -Destillat zugefügt, worauf innerhalb von 2 min eine Aufhellung des Reaktionsansatzes von gelb nach hell-zitronengelb eintrat und sich einige Gasbläschen bildeten. Bei RT wurde der Ansatz mit einem Schliffstopfen verschlossen und 12 h gerührt. Da lediglich eine Ausb. von 5 bis 10% *N*-Oxid festzustellen war, wurde der Ansatz (ohne Schliffstopf.) unter Rühren noch 2 h auf 55°C erwärmt. Die DC zeigte approximativ gegen Referenzsubstanz eine Ausb. von ca. 50% *N*-Oxid. Die Reinigung des markierten *N*-Oxids erfolgte sc (Säule 20 cm, $\varnothing = 1.6$ cm) an 20.8 g Kieselgel 60 (0.063 bis 0.200 mm) mit einer Mischung aus 80 Vol% ammoniakgesättigtem $CHCl_3$ und 20 Vol% Methanol (alle Fließmittel vorher destilliert) und ergab 110 mg markiertes reines *N*-Oxid (33%).

3. Synthese von **4** und **5**

In Anlehnung an Vorschriften in der Dissertation *M. Stanek*¹⁵⁾ wurde **4** durch *N*-Alkylierung von Piperidin mit 4-Fluorbenzylchlorid in Toluol unter Rückfluß dargestellt (Schmp. des Hydrochlorids 221°C; 92%), während die analoge Alkylierung von Piperidon-2 zu **5** unter sonst gleichen Bedingungen den Zusatz von Natriumamid und eine anschließende Reinigung durch SC erforderte (Schmp. 61°C, 17.5%).

4. HPLC-Parameter zur Untersuchung der Metabolite von markiertem **1**

HP 1080 B mit automatischer Probenaufnahme und Integration, UV-Detektor 218 nm.- Säule: LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 μ m) in LiChroCART[®]: 125 x 4 mm (Merck/Darmstadt).- Eluentien: A: CH_3CN (Merck/Darmstadt); B: Pic B7 0.005 M, pH 2.5, linearer Gradient: 6-30 min 10-28% B, Fluß 1 ml.

5. Inkubationsversuche

Aus der Leber einer mit 0.1% Phenobarbital im Trinkwasser induzierten männlichen, 350 g White Wistar Ratte wird auf konventionellem Weg¹⁹⁾ der 10000 x g-Überstand hergestellt. 8 ml dieses Überstandes (eisgekühlt,

beim Kontrollversuch durch 20-minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert werden mit 4 ml Cofaktorlösung (3.08 mg NADP, 6.2 mg Glucose-6-phosphat, 38.08 mg MgCl₂, 2 µl einer 0.1-proz. Lösung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 76.4 mg Na₂HPO₄ x 12 H₂O und 7.16 mg KH₂PO₄ mit destilliertem Wasser zu 4 ml aufgefüllt) sowie 4 ml Substratlösung, die 0.1% = 4 mg markiertes (bzw. in den beiden Kontrollversuchen nicht markiertes) **1** enthält, 120 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurden die 16 ml Inkubationslösung 4mal mit 5 ml destilliertem Et₂O extrahiert. Die vereinigten 20 ml Extrakte wurden durch einen N₂-Strom auf 1 ml eingeeengt und auf eine Empore-DC in einem Band von 4 mm x 70 mm aufgetragen. Gegen die Referenzsubstanzen **2** (hRf = 6.5), **3** (hRf = 32.5) und **1** (hRf = 0) wurde mit destilliertem Ethylacetat entwickelt, die Bande in Höhe des Lactams ausgeschnitten und mit 0.5 ml destilliertem Methanol in ein MS-Probenfläschchen eluiert. Das Methanol wurde im N₂-Strom entfernt und der Rückstand ms (EI 50 eV, Ionenquellentemp. 150°C, Massenspektrometer Kratos MS 80) untersucht.

Literatur

- 1 Grundlagen der Biopharmazie - Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation, Hrsg. S. Pfeifer, P. Pflügel, H.-H. Borchert, S. 223, Verlag Chemie, Weinheim 1984.
Biological Oxidation of Nitrogen, Hrsg. J.W. Gorrod, Elsevier/North-Holland, S. 201, Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1978.
Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules - Chemistry, Toxicology and Pharmacology, Hrsg. J.W. Gorrod und L.A. Damani, S. 47, Verlag Chemie, Weinheim 1985.
- 2 S. Yoshihara und H. Yoshimura, *Xenobiotica* 4, 529 (1974).
- 3 J.K. Baker und T.L. Little, *J. Med. Chem.* 28, 46 (1985).
- 4 A.v. Hodenberg, K.-O. Vollmer, W. Klemisch und B. Liedtke, *Arzneim.-Forsch.* 27, 1776 (1977).
- 5 T. Hayashi, *Chem. Pharm. Bull.* 30, 3748 (1982).
- 6 Dissertation W. Möhrke, Universität Frankfurt 1979.
- 7 Dissertation W. Schatton, Universität Frankfurt 1977.
- 8 D.J. Tocco, A.E.W. Duncan, F.A. DeLuna, J.L. Smith, R.W. Walker und W.J.A. Vandenheuvel, *Drug Metab. Disp.* 8, 236 (1980); *C.A.* 93, 179300t (1980).
- 9 J.E. Pitts, R.B. Bruce, J.B. Forehand, *Xenobiotica* 3, 73 (1973).
- 10 M.H. Bickel, *Pharmacol. Rev.* 21, 325 (1969).
- 11 Grundlagen der Biopharmazie - Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation, Hrsg. S. Pfeifer, P. Pflügel, H.-H. Borchert, S. 223, Verlag Chemie, Weinheim 1984.
- 12 Persönliche Mitteilung der Fa. Nattermann & Cie, Köln.
- 13 H. Oelschläger und M. Al Shaik in: *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules - Chemistry, Toxicology and Pharmacology*, Hrsg. J.W. Gorrod und L.A. Damani, S. 60, Verlag Chemie, Weinheim 1985.
- 14 Dissertation G. Houshfar, Universität Frankfurt 1979.
- 15 Dissertation M. Stanek, Universität Frankfurt 1988.
- 16 H.L. Schmidt, C.R. Colloq. *Int. Isot. Oxygene* 1972 (Pub. 1975), 99, *Dep. Biol., Serv. Radioagron.: St.-Paul-lez-Durance, France; C.A.* 83, 203463q (1975).
- 17 M. Anbar, Z. Baruch und D. Meyerstein, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 17, 256 (1966); *C.A.* 65, 261g (1966).
- 18 Pennsalt Chemicals Corp. Neth., Neth. Appl. 6,506,312 (Cl C 07c), Nov. 26, 1965; U.S. Appl. May 25, 1964; 7 pp.; *C.A.* 64, 12548b (1966).
- 19 P. Mazel in: *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, Hrsg. B.N. La Du, H.G. Mandel und L.E. Way, The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1971; *Vorschriftensammlung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt a.M. (Praktikum Pharm. Chemie III Teil B)*.
- 20 G. Galliani, M. Nali, B. Rindone und S. Tollari, *Xenobiotica* 16, 511 (1986).
- 21 Y. Watanabe, S. Oae und T. Iyanagi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55, 188 (1982).
- 22 D. Staschewski, *Chem. Ztg.* 98, 77 (1974).
- 23 W.A. Garland, B.J. Miwa, C. Eliahou und W. Dairman in: *The metabolism in mice of two deuterated analogs of diazepam Synth. Appl. Isot. Labeled Compd. Proc. Int. Symp.* 2nd, 1985 (Pub. 1986), 271; *C.A.* 105, 54036w (1986). [Ph956]