

Frankfurt Shift, 2. Mitt.<sup>1)</sup>:Weitere Beiträge zur intramolekularen Umlagerung von *N*-Oxiden  
tertiärer Cycloalkylamine zu Lactamen (Frankfurt Shift)<sup>1)</sup>

Herbert Oelschläger und Wolfgang Schmidt

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

Eingegangen am 5. Oktober 1992, in überarbeiteter Form am 8. März 1993

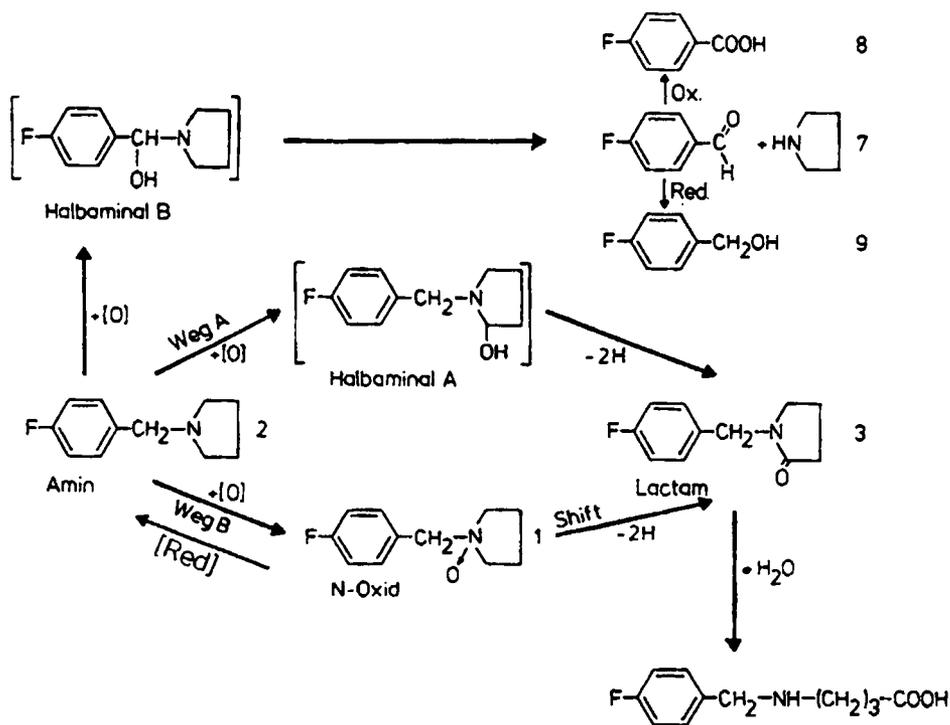
Frankfurt Shift, II: Further Contributions on the Intramolecular  
Shift of *N*-Oxides of Tertiary Cycloalkylamines to Lactams (Frankfurt  
Shift)

Die grundlegenden Kenntnisse über den Frankfurt Shift<sup>1)</sup> wurden erweitert durch Untersuchungen über den kinetischen Isotopieeffekt, ein Kontrollexperiment mit <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre und einen Shift-Versuch mit 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidin-*N*-oxid (4). Außerdem konnte der Shift erstmalig auch im Ganztiersversuch (Ratte) nachgewiesen werden.

The basis knowledge of the Frankfurt shift<sup>1)</sup> could be extended by experiments on the kinetic isotopic effect, an experiment with incubation in <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-atmosphere and a shift with 1-(4-fluorobenzyl)-piperidine-*N*-oxide (4). Furthermore the shift was established in a whole animal experiment (rat).

Vor kurzem gelang uns der Nachweis, daß die Bildung von Lactamen aus *N*-substituierten Cycloalkylaminen nicht nur über das entspr. Halbaminal verläuft, das infolge anschließender schnell verlaufender Dehydrierung das 2-Oxo-

derivat gibt, sondern auch dadurch, daß daneben das gleiche Produkt in einer konkurrierenden intramolekularen Reaktion über das *N*-Oxid im Zuge einer oxidativen Umlagerung entsteht. Als Substrat diente <sup>18</sup>O-markiertes 1-(4-



Schema 1: Wege der Bildung von 1-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidon-2 (3) durch Biotransformation des Benzylamins 2. Durch konkurrierende Oxidation zum Halbamina B entstehen die Spaltprodukte 7-9.

<sup>1)</sup> Herrn Prof. Dr. Felix Zymalowski, Bonn, zum 80. Geburtstag in freundschaftlicher Verbundenheit gewidmet.

Fluorbenzyl)-pyrrolidin-*N*-oxid (1), vgl. Abb. 1. Ein Mechanismus für diesen sog. Frankfurt Shift wurde zur Diskussion gestellt<sup>1)</sup>.

Ob diesem Shift generelle pharmakokinetische-pharmakologische Bedeutung zukommt, kann zwangsläufig nur durch umfassende Studien geklärt werden. Zunächst sind wir der Frage nachgegangen, ob sich die intramolekulare Umlagerung durch den kinetischen Isotopieeffekt stützen läßt.

Ein solcher Isotopieeffekt wurde erstmalig 1986 bei einer durch Cytochrom P 450 verursachten Biotransformationsreaktion, nämlich bei der *N*-Demethylierung von Diazepam zu Nordazepam beobachtet<sup>2)</sup>. Die Autoren fanden u.a., daß bei Mäusen nach *i.v.* Gabe das *N*-trisdeuterierte Diazepam langsamer *N*-dealkyliert wurde als das nicht deuterierte Diazepam. Die üblichen pharmakokinetischen Parameter (Plasmakonzentrations-Zeitverläufe, AUC und Plasmahalbwertszeit) waren dagegen für deuteriertes und nicht deuteriertes Diazepam gleich. - Abb. 1 zeigt nun, daß das nicht markierte *N*-Oxid 1 im Inkubationsversuch relativ langsam

zu 2 und 3 abgebaut wird, wobei infolge Denaturierung der Enzyme der Versuch praktisch nach 80 min zum Stillstand kommt. Das *N*-Oxid ist zu diesem Zeitpunkt praktisch nicht mehr präsent. Entgegen den theoretischen Erwartungen, die sich auf Befunde hinsichtlich der erschwerten und daher langsamer verlaufenden Lösung von C-D-Bindungen in der trisdeuterierten *N*-Methylgruppe des Diazepam stützen, beobachteten wir, daß das markierte *N*-Oxid 1 (Abb. 2) unter den gleichen Bedingungen wesentlich schneller als das nicht markierte *N*-Oxid (Abb. 1) zum Amin 2 und Lactam 3 transformiert wird. Bereits nach 40 min ist das <sup>18</sup>O-*N*-Oxid nur noch in Spuren nachweisbar. Die Punkte in den Kurven der Abb. 2 und 3 ergeben sich als Durchschnitt von zwei unabhängigen Meßwerten, die eng miteinander korrelierten.

Eine exakte quantitative Zuweisung auf den Weg 1 → 2 → Halbaminal A → 3 (Schema 1) bzw. den kürzeren Weg 1 → 3 (Frankfurt Shift) ist nicht möglich, weil die Menge des entstandenen Lactams nicht gemessen wurde. Wir gehen

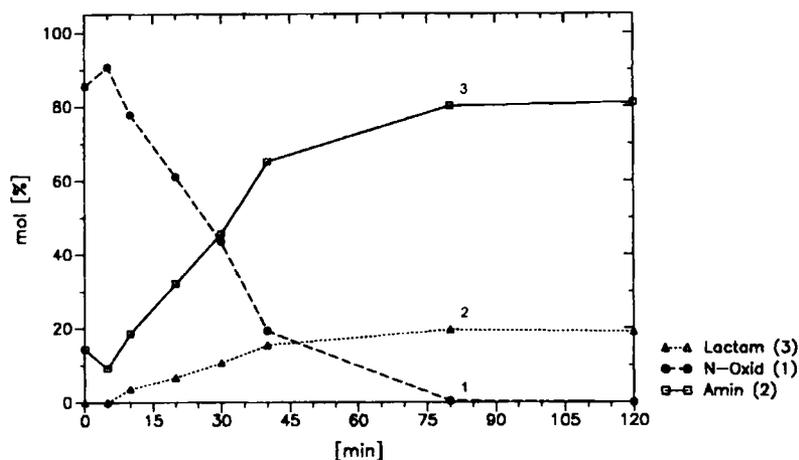


Abb. 1: Kinetik der Inkubation von 100 ppm 1 in den 10000 x g-Überstand von Rattenleberhomogenat

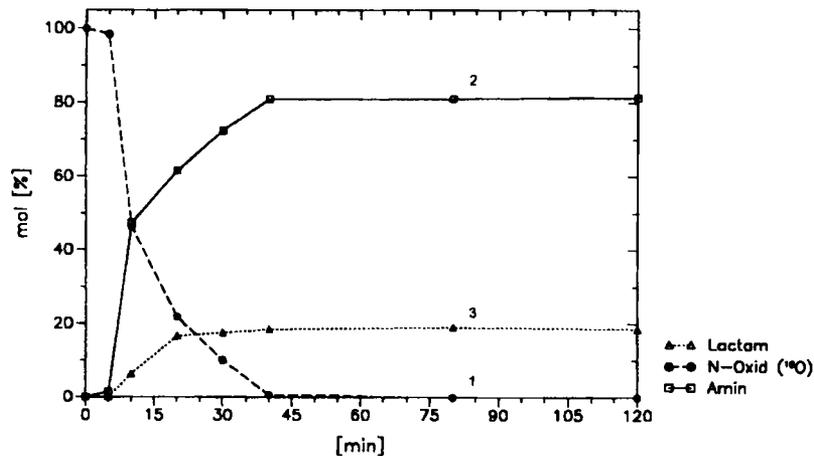


Abb. 2: Kinetik der Inkubation von 100 ppm <sup>18</sup>O-markiertem 1 in den 10000 x g-Überstand von Rattenleberhomogenat

aber davon aus, daß etwa die gleichen Zahlenwerte vorliegen wie bei den früheren Experimenten (vgl. <sup>1)</sup>).

Abgesichert wurde der Frankfurt Shift ferner durch ein Kontrollexperiment, bei dem das nicht markierte **1** in einer <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert wurde. Die MS-Analyse ergab einen Markierungsgrad von 0% für das erhaltene Lactam **3**. Der Hintergrund dieses Kontrollexperimentes war die Absicht nachzuweisen, daß die am Shift beteiligten Enzyme des Rattenleberhomogenats ausschließlich auf den Sauerstoff des *N*-Oxids zurückgreifen und nicht den Sauerstoff aus der Gasphase für die Lactambildung heranziehen.

In weiteren Experimenten wurde als zweites Substrat 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidin-*N*-oxid (**4**) unter den gleichen Bedingungen <sup>1)</sup> wie 1-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin-*N*-oxid (**1**) inkubiert. Dabei konnte eine Umlagerung von **4** zu 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidon-2 (**5**) in der Größenordnung von 15 bis 25% gemessen werden. Es dominierte also auch in diesen Shift-Versuchen der reduktive Schritt zu **6**, wobei wir schon früher gezeigt hatten, daß der dabei abgespaltene <sup>18</sup>O in z.Zt. noch unbekannter Form am aktiven Zentrum des Cytochrom P-450-abhängigen Enzyms gebunden wird und von diesem auf andere Substrate übertragen werden kann.

Zur Abrundung der Inkubationsversuche mit Rattenleberhomogenat, die zwangsläufig nur beschränkte Aussagekraft haben, war es erforderlich, die gewonnenen Shift-Erkenntnisse auch auf ihre Bedeutung im Ganztierexperiment (Ratte) zu prüfen. Hierzu wurde **1** zwei männlichen White-Wistar-Ratten über 3 Tage durch Schlundsonde zugeführt. Nach Probenvorbereitung wurde der Harn sowohl durch GC als auch durch HPLC analysiert. Die Faeces wurden nur mittels HPLC untersucht. Die HPLC-Analyse von Urin und Faeces erfolgte lediglich nach der dritten Gabe. Berechnet auf diese Tagesdosis wurden 1.02 - 1.42% **3** und 0.83 - 5.68% **1** im Urin gefunden. Das 1-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin (**2**) trat in den Faeces lediglich in Spuren auf. Diese Befunde machen deutlich, daß das *N*-Oxid **1** trotz seiner Polarität offenbar nach Schlundsondierung gut resorbiert wird. Unter quantitativem Aspekt zeigen sie ferner, daß außer den erwähnten Verbindungen unbekannte Metabolite gebildet werden, auf die wir wegen des Fehlens von Referenzsubstanzen nicht prüfen konnten. Für die Problematik des Frankfurt Shift war aber die entscheidende Erkenntnis gewonnen worden, daß dieser auch im Ganztier-

versuch mit seinen vielfältigen metabolischen Reaktionen nachgewiesen werden konnte.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt a.M., für finanzielle Förderung.

## Experimenteller Teil

### 1. Kinetischer Isotopieeffekt

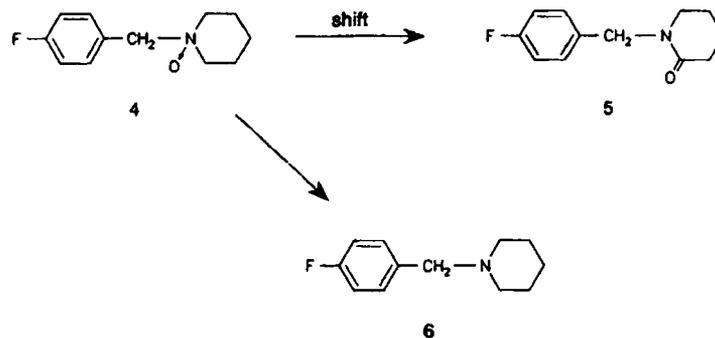
Mit dem 10000 x g-Überstand von induziertem Rattenleberhomogenat wurde ein Kontrollansatz mit 100 ppm (= 0.4 mg/4 ml) **1** inkubiert sowie ein weiterer Ansatz mit gleicher Konzentration an <sup>18</sup>O-markiertem **1**. Die enzymatische Präparation hatte einen Gehalt von 1.1 mmol Cytochrom b<sub>5</sub> / L 1.7 mmol Cytochrom P-450 / L und 9.9 g Protein / L. Aufarbeitung und Analyse erfolgten gemäß <sup>1)</sup>, nämlich indem zunächst Proben (Zeitwerte) der Inkubationslösung zu je 0.2 ml mit 0.8 ml Acetonitril versetzt wurden, anschließend von ausgefallenem Protein abzentrifugiert oder auch nach Kühlung abdekantiert und schließlich der so erhaltene klare bis leicht trübe Überstand durch HPLC gegen Referenzsubstanz analysiert wurde. Die folgenden Tab. zeigen das Ergebnis einmal in nmol absoluter Substanzmenge und dann auch in mol% der jeweils pro Analyse gefundenen Gesamtmetabolite (Retentionszeiten: **2**: 18.0 min, **1**: 19.0 min, **3**: 22.0 min):

Tab. 1: Kontrollansatz 100 ppm **1** inkubiert (vgl. Schema 1)

gefunden nach (min)	0	5	10	20	30	40	80	120
an								
<b>2</b> in nmol	0.699	0.140	0.779	1.388	2.064	2.951	3.667	3.003
in mol%	14	14	19	32	46	65	80	81
<b>1</b> in nmol	4.134	0.866	3.254	2.639	1.968	0.877	0.018	0
in mol%	86	86	78	61	44	19	1	0
<b>3</b> in nmol	0	0	0.150	0.289	0.481	0.704	0.895	0.706
in mol%	0	0	3	7	10	16	19	19

### 2. Inkubation von **1** im 10000 x g-Überstand von Rattenleberhomogenat unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre (Kontrollexperiment)

Auf eine Ampulle mit 500 ml <sup>18</sup>O<sub>2</sub> (Merck & Frost, Toronto/Kanada) wurde eine Dichtung mit einem Septum aufgeschmolzen. Nacheinander wurden in den Raum zwischen der Sollbruchstelle der Glasampulle und dem Septum ein Magnetkern, 8 ml 10000 x g-Überstand des Rattenleberhomogenates, 4 ml der Cofaktorklösung mit 4 ml Substratlösung (= Lösung von 1.6 mg nicht markiertem **1** in 4 ml Soerensen-Puffer pH 7.4) einge-



Schema 2: Biotransformation von 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidin-*N*-oxid (**4**)

**Tab. 2:** Überprüfung des Isotopieeffektes: Ansatz mit 100 ppm  $^{18}\text{O}$ -markiertem **1** (vgl. Abb. 1)

gefunden nach (min)	0	5	10	20	30	40	80	120
an								
<b>2</b> in nmol	0	0.050	2.586	2.085	2.659	4.491	0.927	2.226
in mol%	0	2	47	61	72	81	81	81
<b>1</b> in nmol	1.935	3.198	2.525	0.746	0.372	0.035	0	0
in mol%	100	98	46	22	10	1	0	0
<b>3</b> in nmol	0	0	0.347	0.566	0.645	1.024	0.217	0.508
in mol%	0	0	7	17	18	18	19	19

bracht, das Septum schnell verschlossen und die Glasbruchscheibe zwischen den 16 ml dieser Inkubationsmischung und den 500 ml  $^{18}\text{O}_2$  durch Schütteln mit dem Magnetkern zerstört. Die Inkubationsmischung wurde dann in einem Wasserbad von 37°C 120 min lang gerührt. Die Aufarbeitung zur MS-Analyse der gebildeten Metabolite erfolgte durch Extraktion mit Diethylether und anschließende Reinigung mit Empore-DC<sup>1)</sup>.

### 3. Synthese des 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidin-N-oxids (**4**) aus 1-(4-Fluorbenzyl)-piperidin (**6**) und $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$

Die Synthese von **6** wurde bereits beschrieben<sup>1)</sup>. In 45 ml einer 1.05proz Lösung von  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  (13.9 mmol) wurden 270 mg **6-HCl** (1.18 mmol) aufgelöst und mit 86.2 mg einer Mischung von 11.5 mg Natriumpyrophosphat (0.026 mmol) mit 74.7 mg Natriumhydrogencarbonat (= 0.889 mmol) versetzt. Die Lösung wurde anschließend 14 h unter Rückfluß gerührt. Die Reinigung des markierten N-Oxids erfolgte sc (Säule 20 cm, Durchmesser = 1.6 cm) an 20.2 g Kieselgel 60 (0.063 bis 0.200 mm) mit frisch destilliertem 2-Propanol und konz. wäßriger Ammoniaklösung (95+5, V:V) und ergab 145.6 mg markiertes reines N-Oxid **4** (50%) vom Schmp. 158°C.

### 4. Frankfurt Shift von **4**

Bei dem Inkubationsversuch wurden die Substanzen in Konzentrationen zwischen 200 und 600 ppm in den 10000 x g-Überstand von Rattenleberhomogenat inkubiert<sup>1)</sup>. Die Aufarbeitung der Inkubate erfolgte durch Extraktion mit Diethylether, de Reinigung und MS-Analyse. Die Inkubationslösung enthielt 2.092 nmol Cytochrom  $\text{b}_5$  und 0.911 nmol Cytochrom P-450 pro ml.

**Tab. 3:** Übersicht über die Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit markiertem **1** und **4**

Inkubierte Substanz in ppm	Markierung in %	Markierung der Metabolite in %	<b>3</b>	<b>5</b>
281.25 <b>1</b>	27.65		2.44	
212.50 <b>4</b>	89.87			4.86
281.25 <b>1</b> + 537.50 <b>6</b>	27.65		1.14	1.06
518.80 <b>2</b> + 212.50 <b>4</b>	89.87		12.96	8.81

### 5. Ganztierexposition mit **1**

Bei diesem *in-vivo*-Versuch wurden 2 Ratten (männlich, White Wistar) von 480 g (Ratte 1) und 520 g (Ratte 2) Gewicht täglich 14.4 g bzw. 15.6 mg **1**/Tag über einen Zeitraum von 3 Tagen appliziert. Die Gabe erfolgte

durch Schlundsonde in einer 0.3proz Lösung von 1proz wäßriger Tragantlösung. Nach der 3. Applikation wurden die Ratten getrennt in Metabolismuskäfige gesetzt und für jeweils 24 h Urin und Faeces gesammelt. Von Ratte 1, die 68 g abgenommen hatte, wurde 28.75 ml Urin und 0.9 g Faeces erhalten, Ratte 2 (Gewichtsverlust 46 g) lieferte 23.8 ml Urin und 0.87 g Faeces. Die Aufarbeitung der Faeces erfolgte durch Aufschlammung in 5 ml Wasser und Zentrifugation der Suspension. Der Überstand wurde anschließend wie der Urin aufgearbeitet.

Der HPLC-Analyse ging eine Probenvorbereitung über eine Adsorbex-RP 18-Säule (400 mg) voraus. Diese wurde zunächst mit Methanol und Natriumcarbonatlösung aktiviert. Anschließend wurden 5 ml Ursprungsprobe, die mit Natriumcarbonatlösung auf pH 10.5 eingestellt worden war, über die Adsorbex-Säule gegeben. Man spülte zweimal mit je 0.5 ml einer 85/15-Mischung (V:V) von Natriumcarbonatlösung und Acetonitril und eluierte schließlich mit 2 mal 0.5 ml Methanol. Für die GC-Analyse wurden die auf gleiche Weise alkalisierten Proben mit 2 mal 10 ml Diethylether extrahiert. Als Referenz diente jeweils Leerurin, der mit 100 ppm jedes vermuteten Metaboliten versetzt worden war. Es wurden folgende Werte erhalten:

A. GC: im Urin der Ratte 1 wurden nach dem 1. Tag folgende Substanzen gefunden:

Substanz	in ppm	in µg	in % (m/m)	der appl. Tagesdosis
<b>3</b>	3.506	100.8	0.7	

**1** und **2** waren gc nicht detektierbar.

B. Mittels HPLC (UV 218 nm) konnten folgende Daten erhoben werden:

Tier	Matrix	Substanz	in ppm	in µg	in % der Tagesdosis
Ratte 1	Urin	<b>1</b>	28.45	817.9	5.68
		<b>3</b>	7.10	204.1	1.42
	Faeces	<b>2</b>	2.00	1.8	0.01
Ratte 2	Urin	<b>1</b>	5.44	129.5	0.83
		<b>3</b>	6.70	159.5	1.02
	Faeces	nichts detektierbar			

### 6. Analytik

#### 6.1 GC

Pye-Unicam-GCD-Gaschromatograph (FID) mit angeschlossenem Model 56 Recorder von Perkin-Elmer. Als stationäre Phase diente eine Säule 1.5 m x 4 mm, gefüllt mit 3% Apiezon L auf Chromosorb. Säulentemp. 200°C. - Fluß: a) Säule: 5 ml  $\text{N}_2/\text{s}$ ; b) FID: 8 ml synthetische Luft + 2 ml  $\text{H}_2$

#### 6.2 HPLC

Die an der Adsorbex-RP18-Säule gereinigten Proben wurden mit einer Lichrochart<sup>R</sup> 125-4 Lichrospher<sup>R</sup> 60 RP-select B (5 mm) HPLC-Kartusche (Merck) als stationärer und einer Mischung aus Acetonitril (=A) (10 bis 28% als Gradientensystem) mit verd. wäßriger Phosphorsäure (eingestellt auf pH 2.5) mit dem Ionenpaarreagenz Pic B7 (= Heptansulfonsäure) (=B) als mobiler Phase analysiert.

Fluß: 1 ml/min, dabei auftretender Säulendruck: 95-105 bar, Gradient: 0-10 min: 90% A und 10% B

10-28 min: 90 bis 72% A und 10 bis 28% B

Meßwellenlänge: 218 nm (Referenzwellenlänge 540 nm)

Die Analysen erfolgten auf einem HP 1080-HPLC-System.

Mit Hilfe dieses HPLC-Systems war eine Basislinientrennung aller wesentlichen Metabolite von **2** möglich (vgl. Abb. 3). Zur Injektion gelangte ein Gemisch von jeweils 100 ng der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **8**.

Aus dem intermediär gebildeten, aber analytisch nicht faßbarem Halbamin B entstehen durch spontane Spaltung 4-Fluorbenzaldehyd (7) und durch nachfolgende Oxidation 4-Fluorbenzoesäure (8), wobei das Intermediat 4-Fluorbenzaldehyd (9) nicht nachgewiesen werden konnte. Abb. 4 (a,b) varanschaulicht über den 20 min-Wert der Inkubation, daß das markierte N-Oxid wesentlich schneller zu 2 und 3 metabolisiert wird als das nicht-markierte. Außerdem fällt auf, daß 9 nur oxidativ weiter zu 8 umgewandelt wird, während 4-Fluorbenzylalkohol als reduktiver Sekundärmetabolit im Rahmen der Nachweismöglichkeit (ca. 40 ng) nicht erfaßt werden konnte.

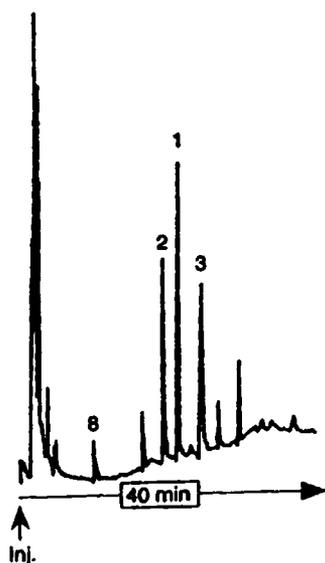


Abb. 3: Trennung von drei Metaboliten von 1 an einer RP-select B-Säule (Modellversuch)

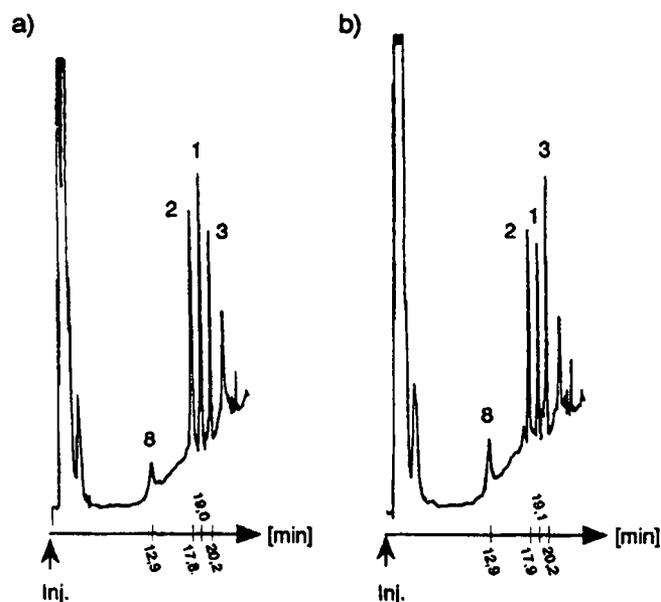


Abb. 4: Nachweis von 1 und drei identifizierten Metaboliten nach 20minütiger Inkubation an einer RP-select B-Säule (a nicht markiert, b  $^{18}\text{O}$ -markiert)

#### Literatur

1. Mitt.: H. Oelschläger, W. Schmidt, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 41-45.
2. W.A. Garland, B.J. Miwa, C. Eliahou, W. Dairman in R.R. Muccino: *Synth. Appl. Isot. Labeled Compd.*, Proc. Int. Symp. 2<sup>nd</sup> 1985, The metabolism in mice of two deuterated analogs of diazepam, Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 271-276.
3. D. Staschewski, *Chem. Ztg.* **1974**, 98, 77-84. [Ph146]