

Zusammenfassung.

Es wird ein Zählrohr für die Bestimmung der Radioaktivität von ^{14}C -markiertem Kohlendioxyd beschrieben. Das Gerät zeichnet sich durch lange Lebensdauer und günstige physikalische Eigenschaften aus.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel.

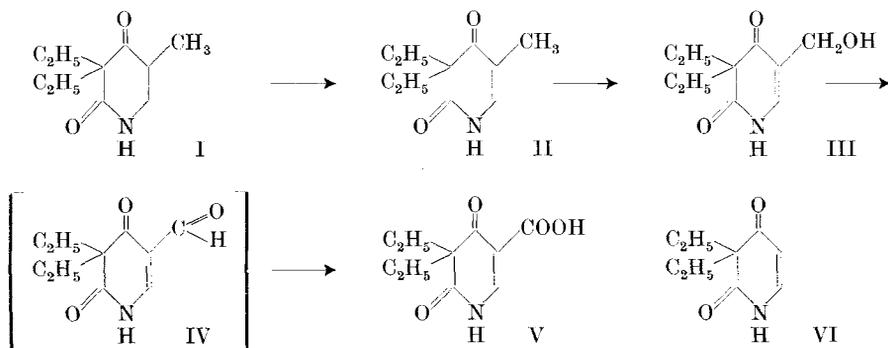
53. Über das Verhalten in 5-Stellung methylierter Dioxo-diäthyl-hydropyridine im Stoffwechsel

von Karl Bernhard, M. Just, A. H. Lutz und J. P. Vuilleumier.

(25. I. 57.)

Unter Heranziehung der Isotopentechnik hatten wir über Verteilung und Ausscheidung einiger Dioxo-diäthyl-hydropyridine bei der Ratte berichtet und nach etwa 48 Std. rund 90% der applizierten Aktivität nach nur geringfügigen chemischen Veränderungen im Harn wieder aufgefunden¹⁾. Im Hinblick auf die Identifizierung möglicher Abbauprodukte setzten wir unsere Versuche vornehmlich an Hunden fort.

Nach wiederholten Gaben von 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-piperidin (Noludar²⁾) (I) führte die Harnaufarbeitung unter anderem zur Isolierung und Identifizierung von 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin (II), 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin (III)³⁾ und 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure (V).



¹⁾ K. Bernhard, G. Brubacher & A. H. Lutz, *Helv.* **37**, 1839 (1954).

²⁾ Fabrikmarke.

³⁾ O. Schnider, H. Frick & A. H. Lutz, *Experientia* **10**, 135 (1954).

Durch Methyloxydation entstand somit eine Pyridincarbonsäure, wobei der nicht häufige Fall eintrat, dass auch die Intermediärprodukte auf dem Wege zu derselben, d. h. das Methyl-tetrahydro-pyridin II und das Hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin III im Harn ausgeschieden und gefasst werden konnten.

Wir haben in der Folge ein papierchromatographisches Nachweis- und Trennungsverfahren für diese Verbindungen ausgearbeitet, das auch die Auffindung des 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinaldehyds (IV) erlaubte, konnten denselben aber im Harn nie nachweisen. Seine Entstehung ist aber nicht auszuschliessen, denn er gelangt als sehr leicht oxydable Verbindung sehr wahrscheinlich gar nicht zur Ausscheidung.

Im weiteren ergab sich, dass diese Intermediärprodukte auch als Glucuronide im Harn vorlagen und als basische Bleisalze nach *Williams*⁴⁾ abtrennbar waren. Leider gelang uns ihre Reindarstellung nicht, aber auf papierchromatographischem Wege in befriedigender Weise ihr Nachweis. Nach Verseifung konnten dann, wieder papierchromatographisch, die einzelnen Aglycone identifiziert werden. Die Verwendung ¹⁴C-signierter Verbindungen ermöglichte schliesslich durch die Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Flecken auf dem Papier eine weitgehend quantitative Verfolgung der Ausscheidung dieser Stoffwechsel- und Paarungsprodukte im Harn und in der Galle. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem 2 Glucuronide, nämlich dasjenige des 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridins (III) und der Tetrahydro-nicotinsäure V vorlagen. Im ersteren Falle darf auf ein Ätherglucuronid, im letzteren Falle auf ein Esterglucuronid geschlossen werden.

Wir haben zur weiteren Bestätigung der obengenannten Reaktionsfolgen, also der Umwandlung der Methylgruppe in Stellung 5 des Dioxo-diäthyl-methyl-piperidins in eine Carboxylgruppe, die einzelnen Intermediärprodukte an Hunde verfüttert. Dabei trat II teilweise unverändert auf. Aber es erschienen wieder gepaart und ungepaart auch die Hydroxy-Verbindung III und die Säure V. Auch III wurde nach Verabreichung unverändert und als Glucuronid ausgeschieden, lieferte aber zudem beträchtliche Mengen der Säure V. Dieselbe konnten wir nach Verfütterung zu rund 70% unverändert aus dem Harn isolieren, der daneben noch weitere 25% als Glucuronid enthielt.

In den meisten Harnen war stets eine sehr geringe Menge 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin (VI) nachweisbar. Offenbar findet in geringem Ausmasse eine spontan verlaufende Decarboxylierung der Tetrahydro-nicotinsäure V beim Stehen oder Aufarbeiten der Harnproben statt.

⁴⁾ I. A. Kamil, J. N. Smith & R. T. Williams, *Biochem. J.* **50**, 235 (1952).

Die Auffindung von Glucuronsäure-Paarungsprodukten liess an deren Entstehung in der Leber und Ausscheidung mit der Galle denken. Zweifellos handelt es sich um leicht verseifbare Verbindungen, so dass das Verhältnis Glucuronide und Aglycone im Harn wahrscheinlich leicht zu Gunsten der letzteren verschoben wird. Es schien uns daher wünschenswert, nach Verabreichung radioaktiver Verbindungen die Galle unmittelbar nach ihrem Austritt aus der Leber zu untersuchen. Wir haben daher ^{14}C -signiertes 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin hergestellt und nach sorgfältigster Reinigung an Gallenfistelratten, welche durch ein Donator-Tier vermittelt eines Magendrains zur Kompensation abfliessender Galle wieder mit solcher versehen wurden, peroral verabreicht. In der abgeleiteten Galle wurde nun durch Aktivitätsbestimmungen und auf Grund der chromatographischen Trennungsmöglichkeiten der zeitliche Verlauf der Detoxication, d. h. der Überführung von Verbindung II in unwirksame Glucuronide verfolgt. Aus der Tab. 1 gehen für zwei derartige Ver-

Tabelle 1.

Gallenmengen und Gallenaktivitäten nach Gaben der ^{14}C -signierten Verbindung II an Fistelratten.

Zeit in Std.	Gallenmengen in g		Aktivitäten in % der appl. Akt.		Zeit in Std.	Gallenmengen in g		Aktivitäten in % der appl. Akt.	
	Tier 1	Tier 2	Tier 1	Tier 2		Tier 1	Tier 2	Tier 1	Tier 2
0—1	1,341	0,556	3,65	2,96	22—23	0,747	0,812	0,08	0,06
1—2	0,888	0,883	6,47	4,25	23—24	0,763	0,896	0,09	0,04
2—3	0,902	0,746	4,59	3,41	24—25	0,774	0,858	0,08	0,03
3—4	1,084	0,922	5,96	4,10	25—26	0,604	0,719	0,05	0,03
4—5	0,823	0,826	5,17	3,87	26—27	0,823	0,742	0,06	0,03
5—6	1,241	1,119	3,73	4,90	27—28	0,677	0,686	0,05	0,03
6—7	0,750	0,786	3,08	4,30	28—29	0,750	0,786	0,04	0,01
7—8	1,123	0,857	3,33	3,90	29—30	0,727	0,735	0,03	0,02
8—9	1,055	0,888	2,43	3,31	30—31	0,753	0,759	0,04	0,02
9—10	0,934	0,809	2,26	2,96	31—32	0,626	0,685	0,02	0,02
10—11	0,811	0,957	2,90	2,96	32—33	0,597	0,657	0,02	0,01
11—12	1,107	1,047	1,81	2,92	33—34	0,671	0,750	0,01	0,01
12—13	0,951	0,922	0,95	2,49	34—35	0,540	0,654	0,01	0,01
13—14	0,841	0,915	0,32	1,38	35—36	0,547	0,735	0,01	0,02
14—15	0,904	0,787	0,35	1,00	36—37	0,611	0,856	0,03	0,02
15—16	0,809	0,697	0,28	0,64	37—38	0,455	0,598	0,02	0,03
16—17	0,973	0,917	0,28	0,22	38—39	0,527	0,541	0,02	0,04
17—18	0,904	0,866	0,28	0,18	39—40	0,476	0,624	0,02	0,02
18—19	0,893	0,790	0,16	0,18	40—41	0,563	0,549	0,02	0,02
19—20	1,010	0,745	0,15	0,05	41—42	0,476	0,516	0,02	0,02
20—21	0,925	0,888	0,16	0,05	42—43	0,444	0,232	0,03	0,01
21—22	0,831	0,923	0,13	0,06	43—44	0,491	—	0,01	—

suche von 44- und 43-stündiger Dauer die mit der Galle stündlich ausgeschiedenen Aktivitäten hervor. Insgesamt wurden 49,2 und 50,6% der applizierten Aktivität auf diesem Wege eliminiert, und es lässt sich aus den Kurven (Fig. 1) ablesen, dass die Hälfte dieser Anteile bereits

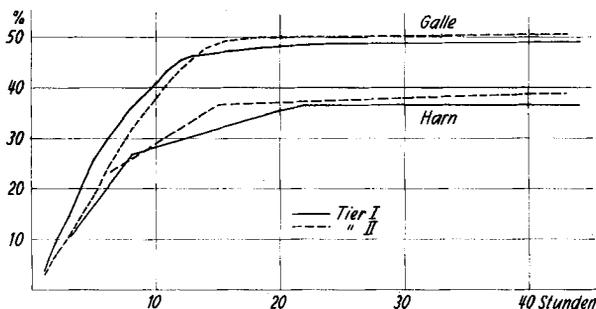


Fig. 1.

Aktivitäts-Ausscheidung durch Galle und Harn nach Gaben der signierten Verbindung II an Gallenfestelratten.

im Verlaufe von 5–6 Std. zur Ausscheidung gelangt. Die einzelnen Proben wurden in der Folge chromatographisch aufgetrennt und durch Ausmessung der Aktivität der erhaltenen Flecken auf dem Papier eine weitgehend quantitative Bestimmung der Paarungsprodukte einerseits und der nicht gepaarten aktiven Produkte andererseits möglich. Aus der Tab. 2 ist ersichtlich, dass mit grosser Regelmässigkeit in der Hauptsache immer das Paarungsprodukt in Erscheinung tritt.

Tabelle 2.

Papierchromatographische Untersuchung einzelner Gallenproben.

Tier Nr.	Frakt. Nr.	Zeit Std.	Totale Stosszahl aller Flecken c/min	Glucuronide in % Rf 0	Verbindung III in % Rf 0,11	Verbindung V in % Rf 0,34	Verbindung II in % Rf 0,72
1	1	0–1	203,8	95,8	1,6	0,5	2,1
1	2	1–2	289,0	95,8	1,8	0,9	1,5
1	4	3–4	338,5	96,6	1,6	0,6	1,2
1	7	6–7	376,5	98,1	1,2	0,4	0,3
Mittelwerte Tier 1				96,6	1,5	0,6	1,3
2	1	0–1	227,6	94,0	1,6	0,6	3,8
2	2	1–2	263,2	94,5	2,1	0,8	2,6
2	4	3–4	252,6	94,9	2,4	0,8	1,9
2	7	6–7	233,2	95,0	3,3	0,2	1,5
Mittelwerte Tier 2				94,6	2,4	0,6	2,4
Mittel beider Tiere				95,6	2,0	0,6	1,8

Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig auch die Harnausscheidung in Berücksichtigung gezogen (vgl. Tab. 3) und auch hier papierchromatographisch eine Prüfung auf die vorliegenden aktiven Bestand-

Tabelle 3.

Aktivitäten des Harnes von Gallenfestelratten nach Gaben der signierten Verbindung II.

Tier 1		Tier 2	
Zeit Std.	Aktivität in % der appl. Akt.	Zeit Std.	Aktivität in % der appl. Akt.
0—8	24,79	0—6	23,10
8—20	8,74	6—15	13,78
20—22	1,05	15—32	1,35
22—30	0,02	32—42	0,64
30—44	0	42—43	0,11

teile vorgenommen (Tab. 4). Der Harn enthielt 36,6 bzw. 39% der Aktivität, zeigte aber im Vergleich zur Galle deutliche Verschiebungen im Verhältnis der Glucuronide und Aglycone.

Tabelle 4.

Papierchromatographische Untersuchung einzelner Harnproben.

Tier Nr.	Frakt. Nr.	Zeit Std.	Totale Stosszahl aller Flecken	Glucuronide in % Rf 0	Verbindung III in % Rf 0,11	Verbindung V in % Rf 0,34	Verbindung II in % Rf 0,72
1	1	0—6	197,3	66,7	24,5	6,6	2,2
1	2	6—15	170,0	84,5	6,4	8,0	1,1
2	1	0—8	162,9	53,8	33,1	10,5	2,6
2	2	8—20	233,9	69,0	21,1	7,2	2,7

Tabelle 5.

Versuche von ¹⁴C-signiertem 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin an einem Hund. Harmmengen- und -Aktivitäten.

Harnproben			Akt. in % der appl. Aktivität	Harnproben			Akt. in % der appl. Aktivität
Nr.	Std. nach Applik.	Menge ml		Nr.	Std. nach Applik.	Menge ml	
1	3,5	240	2,81	9	47,5	400	0,56
2	8,0	515	38,0	10	53,5	120	0,14
3	11,5	130	9,21	11	71,5	915	0,68
4	15,5	325	18,6	12	83,5	465	0,20
5	23,5	110	4,24	13	95,5	590	0,17
6	27,5	205	3,19	14	119,5	1370	0,47
7	31,5	705	3,21	15	144,5	840	0,44
8	39,5	125	0,40				

Wir haben schliesslich die zeitliche Ausscheidung von Glucuroniden und Aglyconen nach oraler Verabreichung der signierten Verbindung II mit dem Harn bei einer Hündin ermittelt, welche, wie aus Tab. 5 hervorgeht, im Verlaufe von 144 Std. 82,4% der applizierten Aktivität mit dem Harne und 10,3% mit den Faeces eliminierte. Die Harnproben wurden dabei durch Katheterisierung erhalten, in der Hoffnung die Hydrolyse gebildeter Glucuronide durch akzessorische Faktoren eliminieren zu können. Die untersuchten Harnproben enthielten laut chromatographischer Analyse folgende auf Glucuronide entfallende Aktivitäten:

Probe Nr.	1	2	3	4
Glucuronidanteil in %	52,8	51,1	52,8	52,2

Experimenteller Teil.

Herstellung der Verbindungen. A. Radioaktives, am Ringkohlenstoffatom 6 ¹⁴C-signiertes 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin (II). Als Ausgangsmaterial diente radioaktives Natriumformiat, welches wie angegeben¹⁾ in 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin (III) übergeführt wurde. Letzteres haben wir in Methanol mit vorhydrierter Palladiumkohle in Gegenwart von wenig Salzsäure hydriert. Smp. 142—143°.

B. 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure (V). In einem Rundkolben wurden 75 g der Verbindung III in 60 ml Wasser suspendiert und mit 150 ml 65-proz. Salpetersäure übergossen. Die Substanz löste sich beim Rühren und Erwärmen auf 35—40° unter Bildung nitroser Gase, die wir absaugten. Nach dem Abklingen der Oxydation, welche zum Aldehyd führte, wurde im Wasserstrahlvakuum bei 70° Badtemperatur unter Rühren bis zu stark viskoser Konsistenz eingedampft. Beim Erwärmen auf 90—100° unter atmosphärischem Druck entwickelten sich nitrose Gase. Die Temperatur im Inneren überstieg dabei 105° nicht. Wurden die nitrosen Gase durch Evakuieren völlig entfernt, so kristallisierte der Rückstand spontan, konnte in Essigester aufgenommen mit 10-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt und abgetrennt werden. Durch vorsichtiges, langsames Fällen der wässrigen Lösung mit konz. Salzsäure kristallisierte die gesuchte Verbindung in gelblichen Kristallen, welche mit Essigester extrahiert wurden. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser schmolz die farblose Säure bei 165°. Ausbeute ca. 75% d. Th.

C. 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinaldehyd (IV). In einem Rundkolben wurden 75 g der Verbindung III mit 200 ml 49-proz. Salpetersäure zuzumengebracht und durch Erwärmen auf 35—40° gelöst. Eliminierung der nitrosen Gase durch Absaugen. Nach Zugabe von 300 ml Wasser zum stark viskosen Rückstand fiel der Aldehyd kristallinisch aus und schmolz nach Umlösen in Benzol bei 145°. Ausbeute 80%.

Papierchromatographische Trennung. 10 Vol. Teile Dibutyläther, 1 Vol. Teil Isopropyläther, 1 Vol. Teil Methylcellosolve und 1 Vol. Teil 5-proz. Essigsäure wurden 30 Min. auf der Schüttelmaschine geschüttelt; dann wurde im Scheidetrichter die zu verwendende organische Phase abgetrennt. Wir chromatographierten absteigend bei Zimmertemperatur mit einer Laufzeit von 3½ Std. auf *Whatman*-Papier Nr. 1, wobei die Substanzen in Mengen von 0,005 ml bzw. 30—40 γ aufgetragen wurden. Unmittelbar nachher haben wir das Papier 12 Std. in eine mit 5-proz. Essigsäure und anschliessend in eine mit dem oben genannten Lösungsmittelgemisch gesättigte Wanne gehängt. Nach 3 Std. wurde das Chromatogramm durch Zugabe von 15 ml Lösungsmittelgemisch entwickelt. Das Sicht-

barmachen der Flecken erfolgte durch Besprühen mit einer Lösung aus 20 ml 5-n. KOH und 100 ml Äthanol. Nach dieser Behandlung erschienen die Verbindungen als hellblau bis grün fluoreszierende Flecken. Zur Sichtbarmachung von I wurde das Chromatogramm mit 1,6-proz. Kaliumferrieyanidlösung und 2-n. KOH besprüht. Unter der UV.-Lampe trat dann weisslich-blaue Fluoreszenz auf. Es ergaben sich folgende Rf-Werte:

	Rf
I 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-piperidin	0,50
II 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin	0,72
III 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin.	0,11
IV 2,4-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinaldehyd	0,63
V 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure	0,34
VI 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin	0,54

Tierversuche und Harnaufarbeitung. Die zu prüfenden Verbindungen haben wir gesunden, jüngeren Hunden einem normalen Futter beigemischt oder in eine Gelatine-Kapsel eingeschlossen verabreicht. Letzteres Verfahren wurde insbesondere bei den radioaktiven Verbindungen geübt, um eine vollständige Aufnahme zu sichern. Die Tiere befanden sich in Stoffwechselkäfigen, so dass der Harn weitgehend quantitativ gesammelt werden konnte. Wir haben ihn zur Isolierung der Metaboliten zuerst bei leicht alkalischer Reaktion mit Äther ausgeschüttelt, anschliessend auf ein kleines Volumen eingengt und nach Ansäuern mit Essigsäure erneut mit Äther ausgezogen. Zur Isolierung der Glucuronide hielten wir uns an die Angaben von Williams⁴), nahmen aber den Austausch der Cl-Ionen im Filtrate der Bleisulfidfällung mit Amberlite IR 45 in Carbonatform vor. Die letzte Phase des Eindampfens im N-Strom erfolgte bei einer Badtemperatur von nur 40°.

Verfütterung von 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-piperidin (I). Eine 23 kg schwere Hündin erhielt im Verlaufe von 6 Tagen peroral insgesamt 15 g. Die Harnmenge von 8 Tagen, 6,22 l von leicht alkalischer Reaktion, extrahierten wir dreimal 8 Std. auf einer Schüttelmaschine mit Äther, welcher nach Eindampfen 3,705 g braunen Rückstand ergab, aus dem nach wiederholtem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther und Sublimation im Vakuum 1,25 g 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin isoliert wurden. Smp. 143—144°.

$C_{10}H_{15}O_2N$ (181,2) Ber. C 66,27 H 8,34% Gef. C 66,39 H 8,24%

Durch chromatographische Trennung konnte ferner 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin erhalten werden. Smp. 140—141°.

$C_{10}H_{15}O_3N$ Ber. C 60,89 H 7,67 N 7,10%
(197,2) Gef. .. 60,73 .. 7,60 .. 7,41%

Im weiteren gelang die Isolierung einer geringen Menge Ausgangsmaterial durch Auswaschen des in Äther gelösten Mutterlauerückstandes mit wenig starker Lauge und Kristallisation der im Äther verbleibenden Anteile. Nach Ansäuern des alkalisch ausgeätherten Harnes mit Essigsäure ergab die erschöpfende ätherische Extraktion schliesslich 4,506 g Rückstand, aus dem wir durch Umkristallisierung aus Benzol und Benzol-Petroläther 616 mg 4,6-Dioxo-5,5-diäthyl-1,4,5,6-tetrahydro-nicotinsäure erhielten. Reini- gung durch Hochvakuumsublimation. Smp. 165°.

$C_{10}H_{13}O_4N$ Ber. C 56,85 H 6,29 N 6,63%
(211) Gef. .. 56,92 .. 6,42 .. 6,87%

Durch Mikrotitration wurde ein Molekulargewicht von 207 ermittelt. Die sauer reagierende Substanz zeigte im Misch-Smp. mit synthetischer Tetrahydro-nicotinsäure keine Depression. IR.- und UV.-Spektrum stimmten mit den für das synthetisierte Produkt erhaltenen Werten überein.

Den extrahierten Harn haben wir im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt und erneut mit Äther extrahiert. Es liessen sich ausser Hippursäure keine definierbaren Fraktionen aus dem braunen Öl abtrennen. Schliesslich haben wir den völlig zur Trockne eingengten Harn mit Aceton und dann mit Alkohol extrahiert. Diese Auszüge liessen das

Vorhandensein von Glucuronsäure-Paarungsprodukten erkennen, deren Trennung über eine Cellulosesäule erfolglos blieb und die in der Folge im Sinne der Angaben von *Williams* abgetrennt wurden.

Verfütterung von 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin (II). Ein männlicher Hund von 16,5 kg Gewicht bekam auf 9 Tage verteilt 11,0 g der Verbindung II. Jede Harnprobe wurde sofort bei pH 8,4 und pH 2–3 mit Äther erschöpfend ausgezogen und anschließend zur Bleisalzfallung vereinigt. Aus den ersten ätherischen Extrakten erhielten wir 2,4 g Rohkristalliat, aus 50% Hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin III und 10% unverändertem Ausgangsmaterial II bestehend. Der saure Ätherextrakt wog 7,0 g und lieferte 0,91 g reine Tetrahydro-nicotinsäure V. Aus dem erhaltenen Rohglucuronid resultierten nach Verseifung gleichfalls die Verbindungen III und V, welche durch Papierchromatographie identifiziert wurden.

Verfütterung von 2,6-Dioxo-3,3-diäthyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridin (III). Ein männlicher Hund (17 kg) erhielt während 10 Tagen täglich 1 g dieser Verbindung. Von dem ausgeschiedenen Harn (total 13 l von 12 Tagen) wurde jeweils die Hälfte unmittelbar im Extraktionsapparat extrahiert, die andere Hälfte sofort eingefroren. Die direkte ätherische Extraktion bei pH 8,5 lieferte 0,831 g Rohkristalliat, das laut chromatographischer Analyse aus 60% Ausgangsmaterial III und sehr geringen Mengen der Carbonsäure V zusammengesetzt war. Durch saure Extraktion erhielten wir 1,433 g Kristalle, die sich nach weiterer Reinigung als Dioxo-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure V erwiesen. Nach völligem Eindampfen des ätherischen Extraktes verblieben 2,4 g nicht kristallisierendes braunes Öl, laut chromatographischer Analyse 30–40% oder ca. 0,84 g der Säure V enthaltend. Mit dem Gesamtharn wurden demnach rund 1 g oder 10% unverändertes Ausgangsmaterial und 4,6 g oder 46% Diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure ausgeschieden.

Bei der Aufarbeitung der zweiten Harnhälfte nach *Williams* wurden 2,40 g Rohglucuronid erhalten, dessen Kristallisation bis jetzt leider nicht gelang. Wir haben es nach Auftragung in methanolischer Lösung mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) absteigend chromatographiert. Die Laufzeit betrug 15–20 Std., die Klimatisierung mindestens 4 Std. Nach Besprühen zeigten sich hellviolett-gelbe bis graublau fluoreszenzen. Es konnten zwei Flecken mit den Rf-Werten 0,47–0,58 und 0,75–0,88 erhalten werden. Fleck 1 besteht aus Paarungsprodukten, Fleck 2 aus Ausgangsmaterial, Tetrahydro-nicotinsäure und Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin. Nach Eluierung und Verseifung liess sich Fleck 1 in Glucuronolacton und die Aglykone, die den Fleck 2 ergaben, aufteilen.

Verfütterung von Dioxo-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure V. Ein männlicher Hund erhielt per os täglich 1–2 g, total 10,0 g der Säure als Na-Salz. Den Harn von 7 Tagen, insgesamt 5 l, haben wir wieder zur Hälfte direkt mit Äther extrahiert, zur Hälfte zur Gewinnung der Glucuronide der Pb-Salzfallung unterworfen.

Die ätherische Extraktion bei pH 8,5 lieferte 0,41 g Extrakt bestehend aus 0,16 g 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin und 20 mg Ausgangsmaterial. Die Extraktion bei pH 2–3 ergab insgesamt 2,86 g Rohkristalle, die sich praktisch als reine Dioxo-diäthyl-tetrahydro-nicotinsäure V erwiesen. Im völlig eingeeengten ätherischen Extrakt (3,20 g) liessen sich weitere 20% davon nachweisen. Es lässt sich somit berechnen, dass rund 7,0 g oder 70% der aufgenommenen Verbindung V im Harn unverändert vorlagen.

An Rohglucuronid wurden aus der anderen Harnhälfte 2,2 g erhalten. Das Chromatogramm zeigte bei Rf 0,53–0,55 den Hauptfleck. Die Verseifung dieses Bereiches ergab nach Chromatographie in Butanol-Eisessig einen Fleck von Glucuronolacton, Rf 0,30, und einen solchen für das Aglycon, Rf 0,85. Dieses bestand wieder aus Säure V und Spuren 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin, welches vermutlich unter den Verseifungsbedingungen der Glucuronide aus der Carbonsäure V entsteht. Es lag somit eine Glucuronsäure-Verbindung der Tetrahydro-nicotinsäure vor, welcher offenbar die Struktur eines Esterglucuronides zukommt. Ein Paarungsprodukt mit Glykokoll konnte nicht festgestellt werden. Die 2,2 g Glucuronid entsprechen 1,2 g bzw. 2,4 g Säure, womit sich die Ausbeute insgesamt auf etwa 95% beläuft.

Verabreichung von radioaktivem 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin (II). Die Verbindung wurde in wässriger Lösung von je 2 ml, enthaltend je 10,1 mg an die Gallenfesteltiere mit der Schlundsonde verabreicht. Total applizierte Aktivität $34,04 \cdot 10^6$ c/min. Gewicht der Tiere 360 und 350 g. Die operativen Einzelheiten und die Versuchsgestaltung entsprachen unseren früheren diesbezüglichen Angaben⁵⁾.

Fütterung von radioaktiven 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-tetrahydro-pyridin (II). Einer 18 kg schweren Hündin wurden 0,326 g Verbindung II mit einer Gesamtaktivität von $3,23 \cdot 10^8$ c/min. verfüttert (Dosis pro kg die 18,2 mg). Dauer 144 Std. Total ausgeschiedene Aktivität 92,7% der applizierten Aktivität.

SUMMARY.

The metabolism of 2,4-dioxo-3,3-diethyl-5-methyl-piperidine (I) was studied and its oxidation to 4,6-dioxo-5,5-diethyl-tetrahydro-nicotinic acid (V) demonstrated. In addition, as intermediary products in the transformation of the methyl group into the carboxyl group, 2,4-dioxo-3,3-diethyl-5-methyl-tetrahydro-pyridine (II) and 2,4-dioxo-3,3-diethyl-5-hydroxymethyl-tetrahydro-pyridine (III) were isolated from the urine of experimental animals. These products when fed to dogs were partially excreted unchanged, and partially transformed into V. Glucuronides of III and V were also found in the urine and especially in the bile.

A procedure has been developed for the paper-chromatographic determination of these substances and their conjugates, which enables to follow their excretion to a large extent quantitatively.

In rats with biliary fistulae which had been given ¹⁴C-labelled 2,4-dioxo-3,3-diethyl-5-methyl-tetrahydro-pyridine, the elimination of glucuronides and of unconjugated components could be followed for a considerable time by analysis of the bile excreted. About 95% of the biliary activity comprises glucuronides. In the course of 144 hours, a dog excreted 92,7% of the activity administered, about half of it as conjugate.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel
und Forschungsabteilung der Firma
F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel.

⁵⁾ K. Bernhard, M. Just & J. P. Vuilleumier, *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, im Druck.