

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 851–857 (1977)

Johannes Reisch und Ulrich Seeger

## Über den Metabolismus 7-alkynylsubstituierter Theophylline\*)\*\*)

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster  
(Eingegangen am 15. November 1976)

Die Synthesen der 7-(Propin-(2')yl)- und des 7-Äthynyl-theophyllins werden beschrieben. Der Metabolismus der beiden Alkynylpurine wurde in Wistar-Ratten untersucht.

### Metabolism of 7-Alkynyltheophyllines

The syntheses of 7-(2-propynyl)theophylline and 7-ethynyltheophylline are described. The metabolism of both compounds in Wistar rats was studied.

Es ist wenig bekannt darüber, ob und in welcher Weise eine Dreifachbindung als Partialstruktur eines Arzneistoffes im Säuretierorganismus metabolisiert wird. Die Schwierigkeit des experimentellen Nachweises liegt darin, daß einfach gebaute Acetylderivate häufig gänzlich verstoffwechselt werden<sup>1)</sup>, größere Moleküle dagegen in der Regel einem unübersichtlichen – meist von der Dreifachbindung unabhängigen – Metabolismus unterliegen.

So ergaben die Untersuchungen am 1-Äthynyl-cyclohexylallophanat-(1)<sup>2)</sup> lediglich eine Oxidation des Cyclohexylringes und z. T. auch eine Abspaltung des Carbamoylrestes. Eine Metabolisierung der Acetylenbindung konnte aber nicht festgestellt werden. Bei Gabe von Methohexital (5-Allyl-1-methyl-5-(1'-methyl-2'-pentinyl)-barbitursäure) an Ratten und Hunde findet neben einer N-Demethylierung vor allem eine Hydroxylierung der zur Dreifachbindung benachbarten Methylengruppe statt<sup>3)</sup>. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Stoffwechselstudien an äthynylierten Steroidhormonen. Nach oraler Verabreichung von Norethisteron und Norgestrel an Menschen konnten einige hydroxylierte Metabolite nachgewiesen werden, die jedoch alle noch eine intakte Acetylenbindung besaßen<sup>4)</sup>. Auch die Versuche mit dem 4-<sup>14</sup>C-Äthynyl-

\* 13. Mitt.: Zur Synthese und Wirkung potentieller Arzneistoffe; 12. Mitt. J. Reisch und H. Labitzke, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 840 (1977).

\*\* Teilergebnisse der Dissertation U. Seeger, Münster 1973.

1 J. Reisch, Pharmazie 20, 121, 194, 271 (1965) (Übersichten).

2 F. R. Preuss und C. S. Ebenezer, Naturwissenschaften 52, 430 (1965).

3 J. D. Welles, R. E. McMahon und W. J. Doran, J. Pharmacol. Exp. Ther. 139, 166 (1963).

4 E. Gerhards, W. Hecker, H. Hitze, B. Nieuweboer und O. Bellmann, Acta Endocrinol. (Copenhagen) 68, 219 (1971).

östradiol trugen wenig zur Klärung des Problems bei: Bei diesem Molekül wurde die Äthynylgruppe zwar zu einem sehr geringen Teil umgewandelt, das Folgeprodukt konnte aber nicht ermittelt werden<sup>5)</sup>.

Die vorliegenden Studien gingen von der Überlegung aus, die Alkynylgruppe mit einer Grundstruktur zu verknüpfen, die übersichtlich metabolisiert wird<sup>6)</sup> und sich gut analytisch erfassen läßt. In Anknüpfung an frühere synthetische Studien<sup>7)</sup> boten sich 7-alkynylsubstituierte Theophylline als Modellsubstanzen an.

7-(Propin-(2'-)yl)-theophyllin<sup>2)</sup>, das in einem Patent<sup>8)</sup> als kardiotonisch wirksam beschrieben wird, ist in guten Ausbeuten durch Umsetzung von Theophyllin (1)-Kalium mit 3-Brompropin-(1) in absol. Äthanol zugänglich<sup>7)</sup>. DC können 1 und 2 auf Kieselgelschichten mit dem Fließmittel Chloroform/Essigester/Methanol/Eisessig (40/40/5/2) sauber voneinander getrennt werden (hRf: 1 = 25; hRf: 2 = 47). 1 und 2 sind auch durch folgende Färbetechnik voneinander zu differenzieren. Aufgrund seiner endständigen Acetylenbindung läßt sich 2 mit einem Mischindikator aus Methylrot und Methyleneblau nachweisen. Dieser Mischindikator hat sich schon beim Titrieren endständiger Acetylenverbindungen bewährt<sup>9)</sup>. Beim Nachsprühen mit 10 proz. Silbernitratlösung färbt sich 1 rot und 2 rot-violett an. Stellt man nun das DC in eine Jod-Atmosphäre, so entfärbt sich innerhalb 20–30 Sek. 1, nicht aber 2. Diese Färbemethode erwies sich auch bei weiteren Versuchen als hilfreich.

Der Metabolismus von 2 wurde an Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts untersucht. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 200 g, als Nahrung erhielten sie Altromin<sup>R</sup>-Standardkost<sup>\*\*\*)</sup>

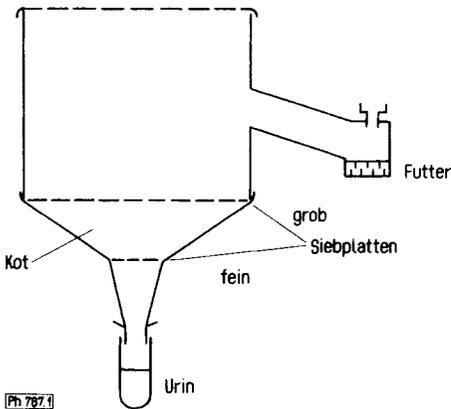


Abb. 1

5 S. Kamyab, K. Fotherby und S.J. Steele, *Nature (London)* 221, 360 (1969).

6 A. W. Burg und M. E. Stein, *Biochem. Pharmacol.* 21, 909 (1972).

7 J. Reisch, *Arzneim.-Forsch.* 18, 1485 (1968).

8 E. P. 750 588; ref: C. A. 1957, 2888.

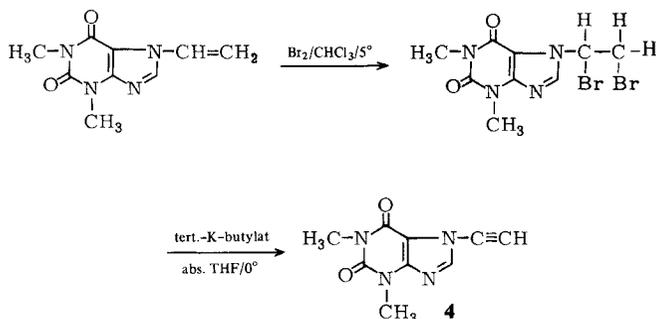
\*\*\* Fa. Altromin, Lage a. d. Lippë.

9 G. Eglinton und M. C. Whiting, *J. Chem. Soc.* 1953, 3055.



gelungen ist, sie auf dem Wege der Dehydratisierung herzustellen. Die umgekehrte Reaktion, die Wasseranlagerung verläuft glatt, wenn der Stickstoff des Inamins basischen Charakter besitzt. Derartige Amine eignen sich z. B. als Kondensationsmittel in der Peptidchemie.

Für die Synthese von **4** wurde 7-Vinyl-theophyllin<sup>12)</sup> durch Bromaddition in das 7-(1',2'-Dibromäthyl)-theophyllin überführt. Über eine Eliminierungsreaktion, die in Anlehnung an Gais u. Mitarb.<sup>13)</sup> durchgeführt wurde, ließ sich **4** in guten Ausbeuten gewinnen. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **4** entspricht hinsichtlich der beiden N-Methylsignale und des Singulets vom C-8-H dem des Coffeins. Das Singulett des Acetylenprotons erscheint auf Grund der Acidität des N-7-Stickstoffs und der damit verbundenen geringeren Abschirmung bei  $\delta = 3,25$  ppm, also bei höherer Frequenz als den üblichen  $\delta = 1,8-3,1$  ppm<sup>14)</sup>.



#### Syntheseweg des 7-Äthinytheophyllins

**4** ist recht stabil, was darin zum Ausdruck kommt, daß sein Mol-Peak eine relative Intensität von 100 % besitzt, die Ausbeuten der anderen Fragmentationen dagegen unter 50 % liegen. Untersuchungen am Theobromin und **1**<sup>15,16)</sup> ergaben die bevorzugte Eliminierung der N-1-Methylgruppe. Bei **4** liegt das entsprechende Fragment bei  $m/e = 175$ . Die Abspaltung des N-1-Methyl- und der beiden Carbonylgruppen führt schließlich zum Bruchstück  $m/e = 119$ . Eine Ringerweiterung, wie sie für die Entstehung dieses Ions formuliert wird (Formelschema 1), wurde schon beim Coffein diskutiert und über den Abbau markierten Materials gesichert<sup>17)</sup>. In Analogie zum Zerfall des Coffeins spaltet das Ion  $MZ\ 119$  HCN bzw. Cyanamid ab und bildet die Fragmente  $MZ\ 92$ , bzw.  $77$ .

12 F. Cacace, G. Fabrizi und M. Zifferero, *Ann. Chim. (Paris)* **46**, 91 (1956).

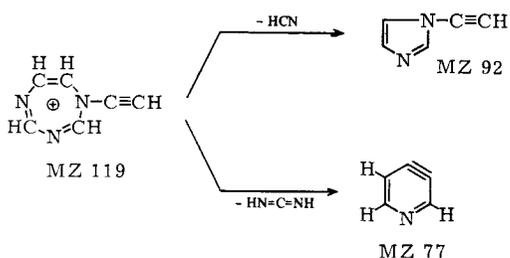
13 H. J. Gais, K. Hafner und M. Neuenschwander, *Helv. Chim. Acta* **52**, 2641 (1969).

14 D. H. Williams und I. Fleming, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1968.

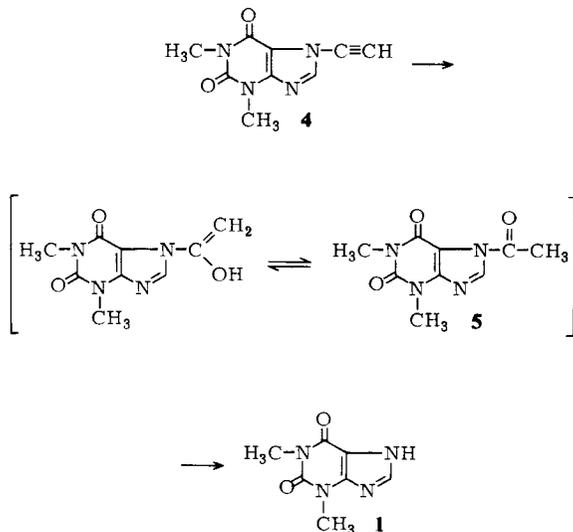
15 G. Spitteller und M. Spitteller, *Monatsh. Chem.* **93**, 632 (1962).

16 G. S. Rao, K. L. Khanna und H. H. Cornish, *J. Pharm. Sci.* **61**, 1823 (1972).

17 P. N. Rylander, S. Meyerson und H. M. Grubb, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 842 (1957).



Wie erwähnt neigen Inamine dazu, Wasser anzulagern, eine Eigenschaft, die im Tierversuch eine Metabolisierung vortäuschen könnte. Aus **4** könnte durch Hydratisierung 7-Acetyltheophyllin (**5**) entstehen, das leicht zu Essigsäure und **1** hydrolysiert wird<sup>18)</sup>. Wie sich ergab, ist **4** aber gegenüber kochendem Wasser stabil. Wesentlich drastischer lassen sich Alkine mit einem Schwefelsäure/Quecksilber-(II)-sulfat Reagens katalytisch hydratisieren. Obwohl die meisten Acetylenverbindungen dabei reagieren, gelang es nicht, auf diesem Wege an **4** Wasser anzulagern.



18 H. Biltz und K. Strufe, Justus Liebigs Ann. Chem. 404, 170 (1914).

In seinem chemischen Verhalten weicht also **4** deutlich von den bisher bekannten Inaminen ab. Die Ursache ist im elektronegativen Charakter des N-7 in **4** zu suchen, durch den die Ladungsverhältnisse im Äthinyrest so verändert werden, daß die Wasseraddition ausbleibt.

Die Tierversuche mit **4** wurden wie bei **2** beschrieben durchgeführt. Die sechs Ratten erhielten **4** in einer einmaligen Dosis von 100 mg/kg als Suspension per Schlundsonde appliziert. Die in einem Vorversuch ermittelte Urinmenge betrug 30 ml/20 h.

Bei der DC des Harnextraktes wurden **4** sowie **1** und **5** als Vergleichssubstanzen mitlaufen gelassen. Würde **4** wie vermutet metabolisiert werden, so sollten **1** und/oder **5** im Urin erscheinen. Im DC konnten mit Hilfe der beschriebenen Detektionsmittel zwei Flecke sichtbar gemacht werden. Der obere Fleck ( $R_f = 60$ ) entsprach **4**. Der zweite Fleck besaß wie **1** und **5** einen  $R_f$ -Wert von 38. Es gelang nicht, **1** und **5** zu trennen bzw. unterschiedlich zu detektieren. Eine einwandfreie Identifizierung der Metaboliten gelang daher erst nach ihrer Isolierung durch präp. DC: Fleck  $R_f$  60 war tatsächlich **4**; Fleck  $R_f$  38 **1**.

Im Vergleich zu **2**, das fast vollständig metabolisiert wird, ist die Metabolisierungsrate von **4** wesentlich geringer und liegt bei ca. 50 %. Daraus ergibt sich, daß **4** eine beträchtliche Stabilität gegenüber dem Stoffwechsel der Ratte hat. Da eine direkte Abspaltung der Acetylengruppe unwahrscheinlich ist, sollte **4** über eine Wasseranlagerung an die Dreifachbindung abgebaut werden. Hierbei entsteht zunächst **5**, das aber zu instabil ist, um im Urin in Erscheinung zu treten. Infolgedessen konnte nur das Folgeprodukt von **5**, nämlich **1** nachgewiesen werden. Für die Metabolisierung von **4** kann somit ein ähnlicher Reaktionsverlauf angenommen werden wie ihn *Böhm* für *o*-Nitrophenylacetylen vorgeschlagen hat<sup>19)</sup>. Aufgrund der hohen in vitro Stabilität der Dreifachbindung von **4** dürfte die biologische Hydratisierung des Äthinyrestes mit einiger Wahrscheinlichkeit auf enzymatischem Wege erfolgen. Dieser Befund ist ein Beweis dafür, daß der tierische Organismus durchaus in der Lage ist, Acetylenverbindungen zu metabolisieren, die in vitro sogar noch stabiler sind als z. B. Phenylacetylen<sup>20)</sup>.

## Experimenteller Teil

DC und präp. DC: Adsorbens: Kieselgel Merck – Fließmittel: Chloroform/Essigester/Methanol/Eisessig (40 : 40 : 5 : 2). – Detektion: a) 0,1 g Methylrot und 0,05 g Methyleneblau in 150 ml Äthanol b) 10proz. Silbernitratlösung. c) Jodatmosphäre

### 1) 7-(Propin-(2'-yl)-theophyllin (2)

Die Darstellung von **2** erfolgte in Anlehnung an bekannte Verfahren<sup>7,8)</sup>. 56,5 g 1-Kalium (0,26 mol) und 34 g 3-Brompropin-(1) (0,26 mol + 20 % Überschuß) in 250 ml absol. Alkohol wurden bis zur neutralen Reaktion unter Rückfluß erhitzt. Der entstandene Kristallbrei wurde abge-

19 F. Böhm, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 261, 35 (1935).

20 A. M. El Marcy, J. N. Smith und R. T. Williams, Biochem. J. 68, 199 (1958).

saugt und mit Wasser gewaschen. Zur Reinigung wurde in Chloroform gelöst und dreimal mit 5 proz. Natriumcarbonatlösung gewaschen. Ausbeute: 49,5 % d. Th., Schmp. 220° (Lit. <sup>7,8</sup>) Schmp. 212°).

IR (KBr): 3250 (HC≡), 3120 (CH), 2130 (C≡C), 1710, 1650 (CO) cm<sup>-1</sup>. – <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 9.1 (s; H-8), 5.45 (t; -CH<sub>2</sub>-; J = 3 Hz), 3.8 (s; N-3-CH<sub>3</sub>), 3.6 (s; N-1-CH<sub>3</sub>), 2.84 (t; J = 3 Hz, ≡ CH).

## 2) 7-Äthinyltheophyllin (4)

### 2. 1) 7-(1',2'-Dibromäthyl)-theophyllin

10,0 g 7-Vinyltheophyllin (48 mmol) wurden in 750 ml Chloroform gelöst, vorsichtig mit 8,0 g Brom – das in etwas Chloroform gelöst war – versetzt und anschließend 48 h bei 5° im Dunkeln aufbewahrt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels i. Vak. hinterblieb ein hellbrauner, sirupöser Rückstand, der nach etwa zwei Wochen kristallisierte. Die Kristalle wurden auf eine Tonplatte abgepreßt und aus wenig Äthanol umkristallisiert. Schmp. 110° Ausb. 12,3 g (70,4 % d. Th.).

C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> (366,02) Ber.: C 29,59 H 2,73 N 15,30 Br 43,70; Gef.: C 29,50 H 2,71 N 15,35 Br 44,00.

<sup>1</sup>H-NMR (CCl<sub>4</sub>): δ (ppm) = 8,0 (s; H-8), 7,0 u. 6.85 (dd; J = 4.5/11, -CH<sub>A</sub>Br), 4.8 (t; J = 11/11, -CH<sub>C</sub>H), 4.25 u. 4.5 (dd; J = 11/4.5, -CHH<sub>B</sub>-), 3.6 (s; N-3-CH<sub>3</sub>), 3.45 (s; N-1-CH<sub>3</sub>).

### 2. 2) 7-Äthinyltheophyllin (4)

Zu 3.66 g 7-(1',2'-Dibromäthyl)-theophyllin (0,01 mol) in 30 ml absol. THF wurden innerhalb 30 min bei 0° unter Rühren eine Lösung von 2,24 g Kalium-tert.-Butylat (0,2 mol) in 40 ml absol. THF und 50 ml tert.-Butanol zugetropft. Danach wurde zwei h bei Raumtemp. weitergerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit 50 ml Dichlormethan versetzt und auf ca 50° erwärmt. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 207° (Zers.). C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (204,19) Ber.: C 52,94 H 3,95 N 27,44 Gef.: C 53,20 H 4,11 N 27,30.

Ber.: Mol.-Masse 204. Gef. Mol.-Masse 204 (ms). IR (KBr): 3200 (HC≡), 3110 (CH), 2160 (C≡C), 1710, 1600 (CO) cm<sup>-1</sup>. – <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.85 (s; H-8), 3.6 (s; N-3-CH<sub>3</sub>), 3.45 (s; N-1-CH<sub>3</sub>), 3.25 (s; HC≡). –

## 3) Die Isolierung der Metabolite aus dem Urin

In meinem Vorversuch wurde jeweils festgestellt, wieviel Urin bei gegebener Dosis und vorgesehener Versuchsdauer entstehen wird. Im Hauptversuch wurde eine dem erwarteten Urinvolumen entsprechende Menge Kieselgel (Korngröße 0,02–0,05 mm, Merck) in den Urinsammelgefäßen vorgelegt. Am Versuchsende wurde das Urin/Kieselgel-Gemisch 48 h i. Vak getrocknet und mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde getrocknet, filtriert, i. Vak. eingeeengt und dc untersucht bzw. präp. dc aufgearbeitet.