

b) Phenazin-Reaktion

174 mg II wurden mit 215 mg o-Phenylendiamin in 75 ml Eisessig versetzt und 1 Std. kräftig geschüttelt. Dann erwärmte man das Gemisch 1 Std. unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen wurde mit 10proz. NH_3 alkalisiert und das Gemisch chromatographisch untersucht. Dabei konnte ein Umsetzungsprodukt von II mit o-Phenylendiamin nicht gefunden werden.

c) Brenzkatechin-Reaktion

50 mg II wurden in 3 ml konz. Salzsäure gelöst. In die Lösung wurden einige Zinkgranalien gegeben. Nach 30 Min. wurde filtriert und das Filtrat mit einer 10proz. NaHCO_3 -Lösung neutralisiert.

3 ml der neutralisierten Lösung wurden mit 1 ml 10proz. FeCl_3 -Lösung versetzt. Das Gemisch färbte sich violett-rot, nicht aber grün.

Anschrift: Prof. Dr. H. Auterhoff, Auf der Morgenstelle, 74 Tübingen

[Ph 790]

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 888–893 (1977)

Johannes Reisch und Ulrich Seeger

Metabolismus des 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllins in Ratten^{*))}**

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster (Eingegangen am 22. November 1976)

Wistar-Ratten metabolisieren 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin zum 7-(2'-Hydroxy-butin-(3')-yl)-theophyllin, dessen Struktur durch Synthese bewiesen wurde.

Metabolism of 7-(3-Butynyl) theophylline in Rats

7-(3-Butynyl) theophylline is metabolized to 7-(2-hydroxy-3-butynyl)-theophylline in Wistar rats. The structure of the metabolite was confirmed by synthesis.

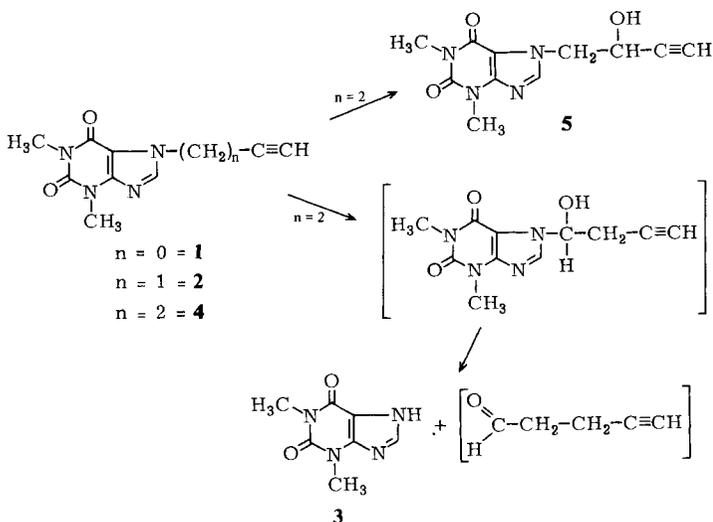
Wie kürzlich mitgeteilt¹⁾, wird 7-Äthynyl-theophyllin (1) und 7-Propinyl-theophyllin (2) in der Ratte zu labilen Zwischenprodukten metabolisiert und mit dem Urin als Theophyllin (3) ausgeschieden. Nach diesen Befunden sollte bei einer Verlängerung

*) 14. Mitt. Zur Synthese und Wirkung potentieller Arzneistoffe; 13. Mitt.: J. Reisch und U. Seeger, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 851 (1977).

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

1 J. Reisch und U. Seeger, Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 851 (1977).

des Alkynylrestes zum 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin (**4**) ein urinaler Metabolit erwartet werden können.



4 ist – analog **2**²⁾ – durch Umsetzung von Butinylbromid mit Theophyllin-Kalium in Äthanol erhältlich, allerdings werden hierbei nur Ausbeuten von 5 % erreicht. Erst der Austausch von 30 Vol-% des Äthanolts gegen DMF steigert die Ausbeute auf 30 %.

4 zeigt ein für Purine typisches Massenspektrum, in dem M^+ in höchster Ausbeute anfällt. **4** bildet drei Schlüsselbruchstücke: Im Hauptabbauweg entsteht unter Verlust eines $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ -Fragments Theophyllin (67 %), daneben führt die Abspaltung von $\text{CH}_3-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ zu dem Bruchstück m/e 175 (8 %) und die Eliminierung von $\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ zu einer Fragmentation mit der MZ 193 (3 %). Das im Verlauf des Abbaus gebildete Theophyllin zerfällt in dem bekannten Fragmentierungsmuster weiter (vgl.³⁾).

Die Versuchsbedingungen für die Stoffwechselstudien entsprachen früheren Experimenten¹⁾. Da **4** toxischer als **2** ist, wurden nur 150 mg/kg appliziert^{***)}. Die Versuchsdauer wurde auf 48 h festgesetzt. Innerhalb 12 h nach Applikation steigerte sich die Harnausscheidung auf etwa 35 ml/24 h. Dieser Wert liegt nur etwas höher als bei **1**, beträgt aber das 5-fache der Harnausscheidung nach 2-Applikation und übertrifft den Normalwert um das 6-fache.

Der Urin wurde an Kieselgel adsorbiert, getrocknet und dann mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Chloroform und Methanol extrahiert. Der Extrakt enthielt drei Purinderivate mit den hRf-Werten 47, 54 und 68. Nach Aufarbeiten mit Hilfe der

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

3 G. Spittler und N. Spittler, *Monatsh. Chem.* 93, 632 (1962).

***) Die genaue Feststellung der Toxizität muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

präp. DC (vgl.¹⁾), konnte der Fleck mit dem $hRf = 47$ als **3** und der Fleck mit dem $hRf = 68$ als unverändertes **4** identifiziert werden.

Die dritte Substanz ($hRf = 54$) besaß nach Umkristallisieren aus Äthanol einen Schmp. von $195-197^\circ$. Der Hinweis auf eine endständige Acetylenbindung, der sich aus der positiven Reaktion mit einem Mischindikator auf dem DC ergab¹⁾, konnte durch das IR-Spektrum bestätigt werden. Neben der $\equiv C-H$ -Valenzschwingung bei 3250 cm^{-1} ist eine $C\equiv C$ -Valenzschwingung bei 2110 cm^{-1} zu erkennen. Wegen des gegenüber **4** geringeren hRf -Wertes des Metaboliten und der unveränderten Acetylenbindung sollte eine Hydroxylierung in der Seitenkette eingetreten sein. Tatsächlich findet sich eine breite OH-Bande bei 3420 cm^{-1} und eine Bande bei 1075 cm^{-1} , die für sekundäre Alkohole charakteristisch ist. M^+ des Metaboliten liegt bei $m/e = 248$, die Mol.-Masse hatte gegenüber **4** um 16 ME zugenommen. Bereits aus den ersten Spitzen des Spektrums läßt sich die α -Stellung der Hydroxylgruppe zur Dreifachbindung ableiten. Die Entstehung der Schlüsselbruchstücke $m/e = 194, 193$ und 180 wird im Formelschema 1 diskutiert.

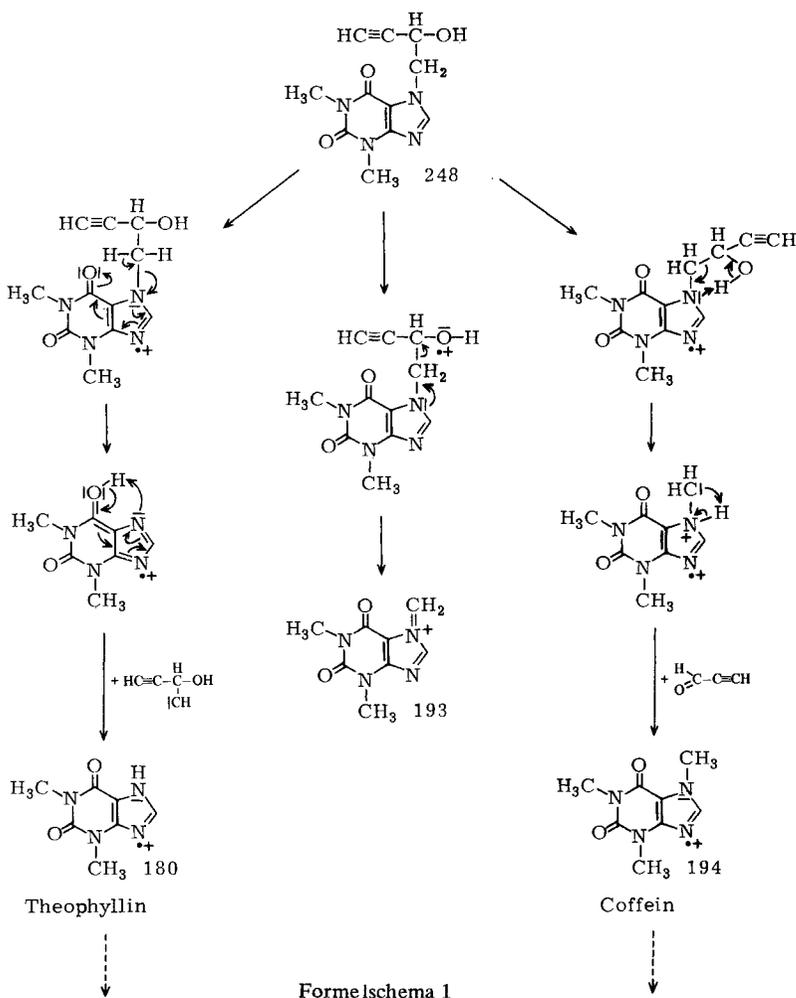
Dem Hauptmetabolit von **4** kommt demnach die Struktur **5** zu, die durch Synthese gesichert werden sollte. Als Syntheseweg war die Umsetzung von 7-Theophyllinacetaldehyd (**6**) mit Äthynyl-Magnesiumbromid vorgesehen.

Ein Verfahren zur Darstellung von **6** über eine Glykolspaltung wurde von Toffoli u. Mitarb.⁴⁾ beschrieben. Für das Reaktionsprodukt wird ein Schmp. von 129° angegeben; außerdem soll sich das Produkt durch schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln auszeichnen. Trotz mehrfacher Versuche und Variation der Bedingungen gelang es aber nicht, den auf diesem Wege hergestellten **6** mit Äthynylmagnesiumbromid umzusetzen.

Eine Erklärung für das unerwartete Verhalten gaben die in DMSO aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren. Das erste Spektrum, das bei 40° vermessen wurde, zeigte, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt um ein Gemisch aus **6** und seinem Hydrat handelte. Das Mengenverhältnis von 10:90 (**6**:**6**-Hydrat) ließ sich u. a. aus dem Intensitätsverhältnis der Signale des Imidazolprotons, die für **6** bei $\delta = 6,17$ und für **6**-Hydrat bei $7,94$ ppm lagen, errechnen. Die Protonen der Hydroxylgruppen des Hydrats erzeugten zwei Signale bei $6,17$ und $6,28$ ppm, die CH-Gruppe ein Triplet bei $5,13$ und die benachbarte Methylengruppe ein Dublett bei $4,2$ ppm ($J = 5,5$ Hz). Die beiden N-Methylgruppen von **6** und **6**-Hydrat erscheinen bei $3,4$ bzw. $3,2$ ppm. Dem geringen **6**-Anteil entsprechend war das Signal des Aldehydprotons bei $\delta = 9,85$ ppm sehr klein. Erwärmte man die Probe auf 100° , veränderten sich die Intensitäten der Signale von **6**:**6**-Hydrat zu einem Verhältnis von 60:40. Bei Temperaturerhöhung verschiebt sich demnach das Gleichgewicht zugunsten des freien Aldehyds. Die rückläufige Reaktion läuft nur sehr langsam ab. Eine Messung, die 30 Min. nach dem Abkühlen vorgenommen wurde, zeigte keine wesentlichen Änderungen der Signalintensitäten.

6-Hydrat läßt sich nicht durch Trocknung i. Vak. dehydratisieren, wohl aber durch Kochen mit Toluol am Wasserabscheider. Proportional zur Wasserabscheidung ging

4 F. Toffoli, F. De Martiis und M. Dolci, *Farmaco*, Ed. Sci, *11*, 516 (1956).



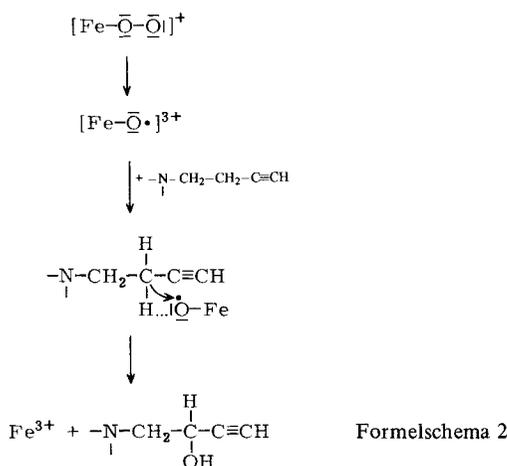
der Aldehyd unter leichter Gelbfärbung in Lösung und kristallisierte nach dem Abkühlen wieder aus. **6** reagiert leicht mit Äthynylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran. Das mit Chloroform extrahierbare Reaktionsprodukt schmilzt bei 198–200° und ist mit dem Metaboliten von **4** identisch.

Die in dieser und der vorausgegangenen Mitt. untersuchten alkylierten Theophylline sind im Rattenkörper unterschiedlich stabil. Bei direkter Verknüpfung der Dreifachbindung mit dem N-7 wird das Molekül bei Körperpassage nur zu etwa 50 % abgebaut. Da dieses Inamin in vitro selbst unter drastischen Bedingungen nicht hydratisiert wird,

sollte dies in vivo auf enzymatischem Wege erfolgen, wobei in Analogie zum Nitrophenylacetylen⁶⁾ ein nucleophiler Mechanismus diskutiert werden kann¹⁾. Nach Verfütterung von 2 erscheinen im Harn lediglich Spuren unveränderter Substanz. Dies läßt darauf schließen, daß die Methylengruppe zwischen dem N-7 und der Acetylenbindung besonders leicht hydroxylierbar ist. Das instabile Aminal-Zwischenprodukt wird in 3-Propinal zerlegt¹⁾. Diesem Abbauweg dürfte eine allgemeine Bedeutung bei der Biotransformation von Propinylaminen zukommen.

Allein 4 bildet bei Körperpassage einen urinalen Metaboliten mit Alkynyl-Seitenkette. Wären bei 4 beide Methylengruppen dem angreifenden Enzym gegenüber „gleichwertig“ so hätten 5 und 3 in ungefähr gleichen Ausbeuten entstehen müssen.

Die Ergebnisse der Studien zeigen in Übereinstimmung mit Befunden am Methobexital⁷⁾, daß eine Methylengruppe in Nachbarstellung zu einer Dreifachbindung besonders leicht angreifbar ist. Die Ursache ist in der Elektronenacceptorwirkung der C≡C-Bindung⁸⁾ zu suchen, die auf die Nachbargruppen einen positivierenden Einfluß ausübt. Die verschiedentlich allgemein formulierten Hydroxylierungsreaktionen^{9,10)} können – wie im Formelschema 2 dargestellt – auch für den Abbau der Alkynylpurine übernommen werden.



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

7 J.D. Welles, R.E. McMahon und W.J. Dorau; J. Pharmacol. Exp. Ther. 139, 166 (1963).

8 F. Bohlmann, Angew. Chem. 69, 82 (1957).

9 V. Ullrich und J.J. Staudinger in: Microsomes and Drug Oxidations, S. 214, Academic Press, New York-London 1969.

10 J.H. Dawson, R.H. Holm, J.R. Trudell, G. Barth, R.E. Linder, E. Bumenberg und C. Djerassi; J. Am. Chem. Soc. 98, 3707 (1976).

Der direkte Abbau der Acetylenbindung muß auf einem anderen Weg erfolgen. Die wesentlich kleinere Metabolisierungsrate dieser Teilstruktur läßt den Schluß zu, daß es für den Organismus relativ schwierig ist, diese zu metabolisieren.

Dem Fonds der chemischen Industrie danken wir für Sachbeihilfen.

Experimenteller Teil

Angaben über DC und Tierversuche s.¹⁾.

1) 7-(Butin-(3')-yl)-theophyllin (4)

In einem Gemisch aus 100 ml absol. Äthanol, 30 ml absol. DMF und 3,51 g 1-Brombutin-(3) (26 mmol) wurden 5,7 g 3-Kalium (26 mmol) gelöst und 20 h unter Rückfluß erhitzt. Der entstandene Niederschlag wurde dreimal mit 20 ml Chloroform ausgewaschen, die Chloroformauszüge mit dem übrigen Filtrat vereinigt und dreimal mit 50 ml 5-proz. Natriumcarbonatlösung gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 188–190°, Ausb.: 2 g (34 % d. Th.).

$C_{11}H_{12}N_4O_2$ (232,24) Ber.: C 56,89 H 5,21 N 24,13 Gef.: C 56,76 H 5,14 N 23,99. Ber.: Mol-Masse 232. Gef.: Mol-Masse 232 (ms).

IR (KBr): 3250 (HC≡), 2970 (CH), 2120 (C≡C), 1710, 1660 (CO) cm^{-1} . – 1H -NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.7 (s; H-8), 4.45 (t; J = 6 Hz), 3.65 (s; N-3-CH₃), 3.45 (s; N-1-CH₃), 2.8 (sext.; J = 2,5/6 Hz, -CH₂-), 2.05 (t; J = 2.5 Hz, HC≡).

2) 7-Theophyllin-acetaldehyd (6)

Das nach⁴⁾ hergestellte Präparat ist, wie die NMR-Messungen ergaben, ein Gemisch aus 10 % freiem Aldehyd und 90 % Aldehydhydrat. Schmp. 129–131°, Lit.⁴⁾ Schmp. 129°.

90 % $C_9H_{12}N_4O_4$ + 10 % $C_9H_{10}N_4O_3$ Ber.: C 45,00 H 6,04 N 23,33 Gef.: C 45,10 H 4,90 N 23,61.

5,0 g des oben erhaltenen Präparates wurden mit 100 ml Xylol solange am Wasserabscheider erhitzt bis kein Wasser mehr überging. Schmp. 162–163° (Dioxan), Ausb.: 4.2 g (95 % d. Th.).

$C_9H_{10}N_4O_3$ (222,22) Ber.: C 48,65 H 4,50 N 25,22 Gef.: C 49,00 H 4,65 N 25,10.

1H -NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 9.85 (s; CHO), 8.0 (s; H-8), 3.4 (s; N-3-CH₃), 3.2 (s; N-1-CH₃).

3) 7-(2'-Hydroxy-butin-(3')-yl)-theophyllin (5)

Unter Rühren wurden zu 20 ml einer 0,1 mol Äthylmagnesiumbromid enthaltenden Lösung 2,22 g (0,01 mol) 6 in 100 ml absol. THF bei 5° zugetropft und über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Danach wurde mit 100 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und dreimal mit 70 ml Chloroform extrahiert. Schmp. 198–200° (Äthanol), Ausb.: 270 mg (11 % d. Th.).

$C_{11}H_{12}N_4O_3$ (248, 24) Ber.: C 53,22 H 4,87 N 22,57 Gef.: C 53,00 H 4,91 N 22,60. Ber.: Mol-Masse 248. Gef.: Mol-Masse 248 (ms).

IR (KBr): 3420 (OH), 3250 (HC≡), 2110 (C≡C) 1075 (CHOH) cm^{-1} .

7-(2'-Hydroxy-butin-(3')-yl)-theophyllin ist mit dem Metaboliten von 4 identisch (Schmp. M.-Schmp. IR, DC).