

5,5-Bis-(o-hydroxypropiofenon-3-yl)-1,3-dimethyl-2,4,6-trioxo-hexahydropyrimidin (8a)

Aus 6 und 4d nach Verfahren B. Farblose Kristalle (Methanol). Schmp. 130°. Ausb. 790 mg = 35 % d. Th.

C₂₄H₂₄N₂O₇ Ber.: C 63.71 H 5.35 N 6.19 Mol.-Masse 452.5; Gef.: C 62.93 H 5.42 N 6.73 Mol.-Masse 452 (MS).

2,2-Bis-(o-hydroxypropiofenon-3-yl)-5,5-dimethyl-cyclohexan-1,3-dion (8b)

Aus 6 und 4e nach Verfahren B. Farblose Nadeln (Äthanol). Schmp. 154°. Ausb. 900 mg = 41,2 % d. Th.

C₂₆H₂₈O₆ Ber.: C 71.54 H 6.47 Mol.-Masse 436.5; Gef.: C 71.36 H 6.41 Mol.-Masse 436 (MS).

Bis-(o-hydroxypropiofenon-3-yl)-cyanessigsäureäthylester (8c)

Aus 6 und Cyanessigsäureäthylester nach Verfahren B. Farblose Kristalle (Äthanol). Schmp. 88°. Ausb. 810 mg = 39.7 % d. Th.

C₂₃H₂₃NO₆ Ber.: C 67.47 H 5.66 N 3.42 Mol.-Masse 409.4; Gef.: C 67.39 H 5.71 N 3.31 Mol.-Masse 409 (MS).

Anschrift: Prof. Dr. F. Eiden, Sophienstraße 10, 8 München 2.

[Ph 756]

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 579–587 (1977)

Herbert A.H. Oelschläger, David J. Temple und Julia Iglesias-Meier

Über den Mechanismus der oxidativen Abspaltung des Morpholins aus dem Lokalanästhetikum Fomocain

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

(Eingegangen am 25. August 1976)

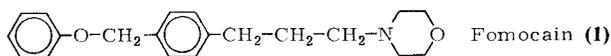
Die Abspaltung des Morpholinrestes aus dem Lokalanästhetikum Fomocain (1) nach oraler Applikation an Beaglehunde erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit durch oxidative N-Entalkylierung. Der Beweis wurde durch Inkubation von 1 in Meerschweinchen-Leberhomogenatfraktionen geführt. Es konnten dadurch 2 neue Metabolite, der Aldehyd 10 und die Carbonsäure 11, in das bekannte Biotransformationsschema von 1 eingeführt werden.

Mechanism of the Oxidative Cleavage of Morpholine from the Local Anaesthetic Fomocaine

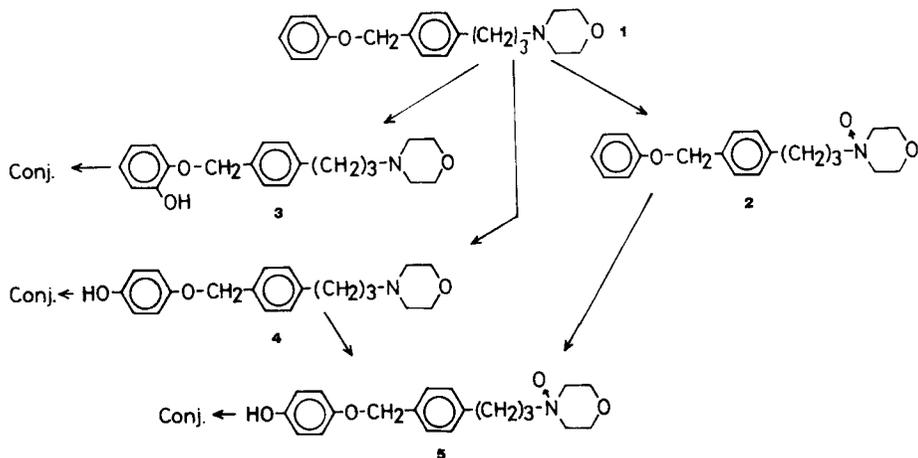
The cleavage of the morpholine residue from the local anaesthetic Fomocaine (1) following oral administration to beagle hounds occurs most probably by oxidative N-dealkylation. Proof for

this assumption was obtained using guinea pig liver homogenate fractions. Two further metabolites, the aldehyde **10** and the carboxylic acid **11**, have been added to the scheme which describes the metabolism of **1**.

1967 wurde das Lokalanästhetikum Fomocain (Erbocain[®], **1**) in die Therapie eingeführt¹⁾. Es hat sich wegen seiner starken oberflächenanästhetischen Wirkung, seiner geringen Toxizität (DL₅₀ 175 mg/kg, Maus i. v.) und des Ausbleibens allergischer Nebenwirkungen, auch nach längerer topischer Applikation, besonders in der Dermatologie bewährt. Auf seine mögliche Eignung als Antiarrhythmikum bei Herzrhythmusstörungen wurde kürzlich hingewiesen²⁾.



Mit der Aufklärung der Biotransformation von **1** wurde 1969 begonnen³⁾. 1975 konnten wir abschließend über unsere Ganztierversuche (Ratte und Beaglehund) berichten⁴⁾. Danach unterliegt **1** im tierischen Organismus mehreren oxidativen Biotransformationsreaktionen, die zum Teil mit nachfolgenden Molekülsplattungen verknüpft sind (vgl. Schema 1 und 2)*).



Schema 1: Oxidativer Angriff auf **1** ohne nachfolgende Molekülsplattung.

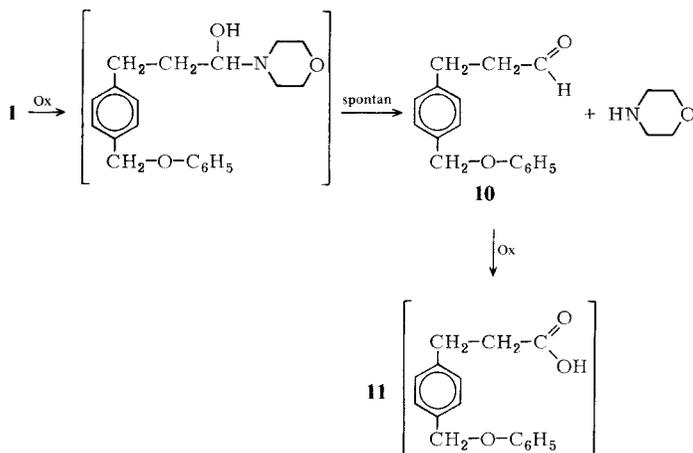
1 H. Oelschläger, O. Nieschulz, F. Meyer und K.H. Schulz, *Arzneim.-Forsch.* 18, 729 (1968).

2 N. Reuter, Fr. Meyer und J. Ziegenmeyer, *Arzneim.-Forsch.* 25, 1900 (1975).

3 Dissertation *K. Koch*, Universität Frankfurt a. M. 1970.

4 H.A.H. Oelschläger, D.J. Temple und C.F. Temple, *Xenobiotica* 5, 309 (1975).

*) Wir danken an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *Jindra*, Universität Bratislava, und Herrn Prof. Dr. *Hoffmann*, Universität Frankfurt a. M., für ihre Beiträge zur Abklärung des Problems, die gesondert veröffentlicht wurden bzw. werden.



Bei Ganztiersversuchen war uns die Auffindung von X nicht gelungen, vermutlich wegen des raschen Abbaus zu kleineren Bruchstücken. Daher gingen wir zu Inkubationsversuchen über, für die wir als Referenzsubstanzen die vermuteten Metabolite

Tab. 2: DC und GC des Metaboliten 11

A: DC [Fertigplatten Kieselgel GF₂₅₄ 0,25 mm (Merck)]

Fließmittel (Vol.)	Referenz	R _F -Werte Metabolit (isoliert)	Fomocain
Benzol/Methanol (70 + 30)	0,65	0,65	0,77
CHCl ₃ /Methanol (87,4 + 12,6)	0,75	0,74	0,77
Benzol/Methanol/Essigsäure (70 + 15 + 15)	0,89	0,90	0,65
Pentan/Aceton (70 + 30)	0,31	0,31	0,33

B: GC (11 und Referenz wurden auf der Säule mit Trimethylaniliniumhydroxid methyliert)

Säulenmaterial	Temp.	rel. Retentionszeit (min)	
		Referenz	Metabolit
OV 17 (3 %)	210°	11,4	11,4
OV 225 (3 %)	210°	6,2	6,2
Carbowax 20M + TPA	210°	14,0	14,0

10 und **11** synthetisierten. Aufgrund von Vorversuchen mit dem Überstand eines 10.000 x g zentrifugierten Leberhomogenats von Mäusen (bzw. Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen) entschieden wir uns für den Überstand des Meerschweinchens (Cofaktoren: Glukose-6-phosphat, Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, NADP und $MgCl_2$) und inkubierten jeweils bei 37° 2 μ mol Fomocain. Nach 1 Stunde wurde das angesäuerte Inkubat mit Äther extrahiert und der Extrakt dc und gc (nach Methylierung mit N-Trimethylaniliniumhydroxid) analysiert. Tab. 2 informiert über die dc bzw. gc Beweise für die Bildung von **11** bei den Inkubationsversuchen. Als Referenzsubstanz diente in der DC die synthetisierte Säure **11** und in der GC deren auf der Säule gebildeter Methylester.

Um zu entscheiden, ob die Säure **11** durch mikrosomale Hydroxylierung von **1** mit nachfolgender Oxidation des primär gebildeten Aldehyds **10** entsteht, haben wir „gewaschene Lebermikrosomen“ (sie sind frei von löslicher Aldehyddehydrogenase) mit **1** inkubiert und zum Abfangen von **10** Semicarbazid hinzugegeben. In dem bei der Aufarbeitung erhaltenen Ätherextrakt konnte **10** als Semicarbazon gegen Referenzsubstanz dc in verschiedenen Systemen eindeutig nachgewiesen werden (s. Tab. 3).

Tab. 3: DC des Semicarbazons von **10**

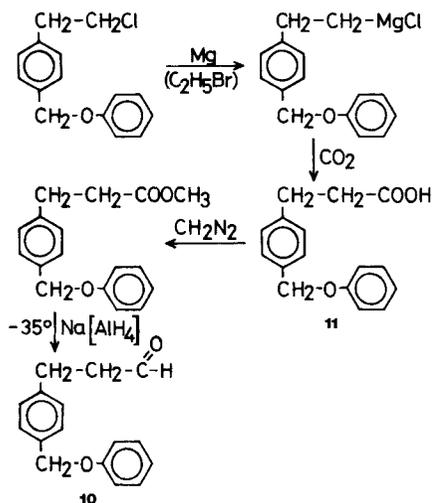
[Fertigplatten Kieselgel GF₂₅₄ 0,25 mm (Merck)]

Fließmittel (Vol.)	Referenz	R _F -Werte	
		10-Semicarbazon (isoliert)	Fomocain
Benzol/Methanol (70 + 30)	0,69	0,70	0,77
Chloroform/Methanol (87,4 + 12,6)	0,72	0,73	0,77
Benzol/Methanol/Eisessig (70 + 15 + 15)	0,88	0,88	0,65
Pentan/Aceton (70 + 30)	0,04	0,05	0,33
Reagens		Farbreaktion	
Schiffsches Reagens	violett	violett	negativ
Dragendorffs Reagens	negativ	negativ	orange
Gibbs Reagens	negativ	negativ	schwach blau

Die Aldehydstruktur wurde auch durch Ansprühen der DC-Platte mit *Schiff's* Reagens bewiesen. Infolge Spaltung des Semicarbazons trat in 5 min eine intensive Violett färbung ein.

Inkubiert man dagegen Fomocain in den mikrosomenfreien 100.000 x g Überstand, so wird **1** nicht verändert, weil die im Überstand vorhandenen löslichen Enzyme nur den Aldehyd, nicht aber **1** zu oxidieren vermögen.

Bei den Synthesen der Referenzsubstanzen **10** und **11** (Schema 3) mußten einige Schwierigkeiten überwunden werden. Die Säure **11** war aus dem substituierten β -Phenyläthylchlorid durch Grignard-Reaktion nur nach der Entrainment-Methode⁷⁾ – also mit Zusatz von Äthylbromid – in guter Ausbeute (ca. 75 % d. Th.) zu gewinnen.



Schema 3: Synthesen des Aldehyds **10** und der Carbonsäure **11**.

Die Säure diente auch als Ausgangsmaterial für die Synthese von **10**. Ihr Methyl ester läßt sich, wie wir fanden, mit NaAlH_4 bei -35° in Tetrahydrofuran zum Aldehyd reduzieren, der über die Bisulfit-Additionsverbindung isoliert wurde (Ausbeute 8 % d. Th.). Bei der von den russischen Autoren⁸⁾ für solche Reduktionen im Prinzip empfohlenen tiefen Temperatur von -65° erhielten wir bei unseren Ansätzen nur Ausgangsmaterial zurück und bei -15° erfolgte bereits Weiterreduktion des Aldehyds zum korrespondierenden Alkohol.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von **10** bestand in der Umsetzung des Grignard-Reagenzes mit ortho-Ameisensäure-triäthylester, die aber den Aldehyd nur in Ausbeuten von ca. 10 % d. Th. lieferte.

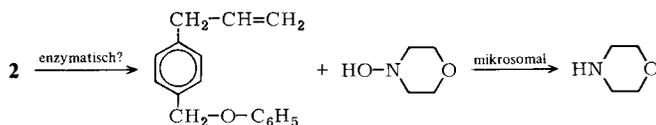
Als Ergebnis der geschilderten Inkubationsversuche darf festgehalten werden, daß die Abspaltung des Morpholinrestes aus **1** mit hoher Wahrscheinlichkeit über den von MacMahon⁹⁾ formulierten oxidativen N-Entalkylierungsmechanismus, also unter enzymatischer Bildung eines instabilen Aldehydammoniaks, verläuft.

7 M.S. Kharasch und O. Reinmuth, Grignard Reactions of Nonmetallic Substances S. 38, Prentice Hall, New York 1954.

8 L.I. Zakharkin, V.V. Gavrilenko, D.N. Maslin und I.M. Khorlina, Tetrahedron Lett. 29, 2087 (1963).

9 R.E. McMahon, J. Pharm. Sci. 55, 457 (1966).

Prinzipiell besteht auch eine zweite Möglichkeit für die Abspaltung des Morpholins, nämlich die über eine *Cope*-Eliminierungsreaktion des 1-N-Oxids (2), wobei das intermediär entstehende N-Hydroxymorpholin durch Lebermikrosomen¹⁰⁾ zu Morpholin reduziert wird:



Wir haben auf diese bisher nicht diskutierte mögliche Biotransformationsreaktion bereits verschiedentlich*) hingewiesen. Sie würde den N-Oxiden z. T. die Funktion als ausscheidungsfähige Endprodukte der Biotransformation tertiärer Amine nehmen und ihnen auch die Rolle von Zwischenprodukten im Metabolismus tertiärer Amine zuweisen. Damit ergäbe sich u. E. auch eine mögliche Erklärung für die stets geringe Menge von N-Oxiden bei der Biotransformation der verschiedensten N-haltigen Xenobiotika (Imipramin-N-oxid entsteht zu 1 %, Diphenhydramin-N-oxid zu 2–4 %, Nikotin-N-oxid zu 3–4 %¹¹⁾). Mit der experimentellen Prüfung vorstehender Hypothese sind wir (*H. Oelschläger, D. Temple* und *M. Ewert*) z. Zt. beschäftigt.

Für die Biotransformationsforschung dürfte es prinzipiell von beträchtlichem Interesse sein, daß – wie unsere Arbeit erstmalig gezeigt hat – auch alicyclische Amine ohne Fragmentierung enzymatisch aus basischen Arzneistoffen oxidativ eliminiert werden können. Als Regel galt bisher, daß z.B. Morpholin als Baustein von Pharmaka entweder in sein N-Oxid¹³⁾ übergeführt oder aber oxidativ bzw. hydrolytisch angegriffen wird (s. Tab. 4).

Analoge Beobachtungen sind bei dem Neuroleptikum Perazin¹⁷⁾ und bei dem Antihistaminikum Meclozin¹⁸⁾ gemacht worden, deren N-Methylpiperazinrest nicht abgespalten, sondern über mehrere Zwischenstufen abgebaut wird.

10 M. Kiese und H. Uehleke, *Naturwissenschaften* 48, 379 (1961).

11 P. Jenner, *Xenobiotica* 1, 399 (1971).

12 P.N. Giraldi, G.P. Tosolini, E. Dradi, G. Nannini, R. Longo, G. Meinardi, G. Monti und I. de Carneri, *Biochem. Pharmacol.* 20, 339 (1971).

13 J.E. Pitts, R.B. Bruce und J.B. Forehand, *Xenobiotica* 3, 73 (1973).

14 A. Zimmer, A. Prox, H. Pelzer und R. Hankwitz, *Biochem. Pharmacol.* 22, 2213 (1973).

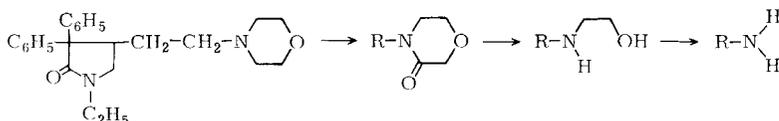
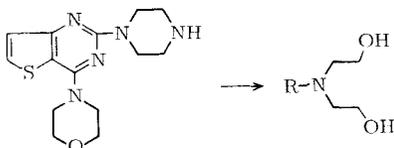
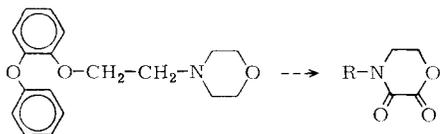
15 K. Tatsumi, S. Kitamura, H. Yoshimura, S. Tanaka, K. Hashimoto und T. Igarashi, *Xenobiotica* 5, 377 (1975).

16 U. Breyer, *Biochem. Pharmacol.* 21, 1419 (1972).

17 H.J. Gaertner, U. Breyer und G. Liomin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 195 (1973).

18 J.W. Gorrod, D.J. Temple und A.H. Beckett, *Xenobiotica* 5, 453 (1975).

*) Vortrag auf dem 4. Xenobiotika-Symposium in Pezinok/CSSR am 7.5.1975; Vortrag auf dem Symposium on Drug Metabolism in Guildford/UK am 6.4.1976.

Tab. 4: Oxidative bzw. hydrolytische Metabolisierung des Morpholinrestes^{14,15,16)}**Doxapram** (1973) (Robins Co./Richmond Va.)**V-K 774** (1973) (Thomae/Biberach)**PMPE** (1975) (Eisai Co./Tokio)

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt/Main, und der Fa. Hermal-Chemie, Reinbek bei Hamburg, für großzügige Förderung und Frau K. Schesmer für umsichtige Mitarbeit.

Experimenteller Teil

1. Darstellung der Referenzsubstanzen

1.1. 3-(p-Phenoxyethylphenyl)-propionsäure (11)

Aus 1 g (4 mmol) 2-Chlor-1-(p-phenoxyethylphenyl)-äthan, 0,5 g (20 mmol) Magnesiumspänen und 0,9 g (8 mmol) Äthylbromid wurde in 20 ml trockenem Äther das Grignard-Reagens bereitet. Unter N₂ wurde es auf -12° abgekühlt und dann über H₂SO₄-getrocknetes CO₂ durchgeleitet, wobei die Temp. -2° nicht überstieg. Nach etwa 20 min sank die Temp. ab, womit die Reaktion beendet war. Der Reaktionsansatz wurde mit 25 proz. H₂SO₄ hydrolysiert, die ätherische Phase abgetrennt und daraus die Säure 11 mit 10 proz. Kalilauge ausgeschüttelt. Durch Ansäuern erhielt man einen farblosen Niederschlag, der mit Wasser gewaschen und aus 50 proz. Äthanol umkristallisiert wurde. Farblose Kristalle vom Schmp. 114–115°, Ausbeute 78 % d. Th.

C₁₆H₁₆O₃ (256,3) Ber.: C 74,9 H 6,3 O 18,7 Gef.: C 74,5 H 6,3 O 19,2. IR- und NMR-Spektrum standen mit der Struktur in Übereinstimmung.

1.2. 3-(p-Phenoxyethylphenyl)-propionsäuremethylester

1,2 g (4,7 mmol) 3-(p-Phenoxyethylphenyl)-propionsäure wurden in 20 ml Methanol gelöst und

so lange unter Kühlen mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt, bis sich kein Stickstoff mehr entwickelte. Nach 12 h wurde vom Solvens befreit, der kristalline Rückstand in Äther aufgenommen und die ätherische Lösung zunächst mit 5 proz. KOH und dann mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der ätherischen Lösung über Na_2SO_4 , Verjagen des Lösungsmittels und Umkristallisieren aus verd. Alkohol erhielt man 1,2 g (94 % d. Th.) des kristallinen Methylesters vom Schmp. 65–66°.

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (270,3) Ber.: C 75,5 H 6,7 O 17,7 Gef.: C 75,6 H 6,5 O 18,0

1.3. 3-(p-Phenoxyethylphenyl)-propionaldehyd (10)

0,85 g (3 mmol) 3-(p-Phenoxyethylphenyl)-propionsäuremethylester, gelöst in 15 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF), wurden auf -35° abgekühlt und bei dieser Temp. mit 100 mg NaAlH_4 , suspendiert in 7 ml THF, versetzt und 2 h langsam gerührt. Danach fügte man zu dem Reaktionsgemisch kalte NaHSO_3 -Lösung, rührte weitere 12 h, verdampfte das THF, filtrierte den kristallinen Niederschlag ab und wusch ihn gründlich mit Äthanol und Äther nach. Die Spaltung der Hydrogensulfit-Verbindung erfolgte mit 10 proz. KOH. Der Aldehyd wurde ausgeäthert und wegen seiner Instabilität sofort in das Semicarbazon übergeführt. Dieses schmilzt nach Umkristallisieren aus Benzol zwischen 180–181°.

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (297,3) Ber.: C 68,6 H 6,4 N 14,1 O 10,7 Gef.: C 68,6 H 6,4 N 14,3 O 10,7
IR-, NMR- und Massen-Spektren [$m/e = 297$ (M^+)] bewiesen die Struktur.

2. Biopharmazeutische Versuche

2.1. Inkubationsversuch A: Nachweis des Aldehyds 10 als Semicarbazon

Die Lebermikrosomen-Fractionen vom Meerschweinchen wurden aus Rohleber nach der von Gorrod, Temple und Beckett¹⁸) gegebenen Vorschrift frisch bereitet. Die bei 140.000 x g aus 0,5 g Rohleber erhaltene Mikrosomenfraktion wurde in 1 ml Tris-KCl-Puffer suspendiert. Zu der Suspension gab man 2 μmol Fomocain-HCl in 0,5 ml dest. Wasser sowie 2 ml der Cofaktoren-Lösung [enthaltend Glukose-6-phosphat (10 μmol), Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (2 units), NADP (2 μmol), 4 mg Semicarbazid-HCl und 20 μmol MgCl_2]. Dieser Inkubationsansatz (3,5 ml) wurde 1 h bei 37° belassen. Dann versetzte man die Suspension mit 15 ml Aceton und zentrifugierte 10 min bei 3.000 U in einer Christ-Zentrifuge (Labofuge 1). Das überstehende Aceton wurde abgossen und weiter eingeeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mit Äther extrahiert und die ätherische Lösung dc chromatographiert (s. Tab. 3).

2.2. Inkubationsversuch B: Nachweis der Säure 11

Ausgehend von dem analog bereiteten Leberhomogenat wurde der 10.000 x g Überstand in gleicher Weise mit Fomocain-HCl und den Cofaktoren (ohne Semicarbazid) inkubiert. Nach 1 h bei 37° wurden 0,2 ml 5 N HCl hinzugefügt und danach die Säure 11 mit Äther extrahiert. Den Äther dampfte man im Wasserbad bei 45° ab und chromatographierte den verbliebenen Rückstand (s. Tab. 2).

Die Untersuchung des Rückstandes kann auch gc erfolgen. Hierzu wird in einer 10- μl -Hamilton-Spritze (701 N) die Lösung der Säure mit einer methanolischen Lösung von N-Trimethylanilinium-hydroxid aufgezogen, das die Methylierung der Carboxylgruppe auf der Säule besorgt. Die Ergebnisse der GC sind ebenfalls in Tab. 2 zusammengestellt.