

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 489–498

Isolierung einiger Metaboliten des Phenyramidol (Cabral) aus menschlichem Harn und ihre Identifizierung

Von S. Goenechea

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn,

G. Eckhardt

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn und

K.-J. Goebel

Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn

(Eingegangen am 24. Januar/31. März 1977)

Zusammenfassung: Die Biotransformation des Phenyramidol (I), das zu einem Teil auch unverändert ausgeschieden wird, vollzieht sich auf drei primären Hauptabbauwegen: 1. Hydroxylierung des Pyridinringes in Stellung 3 (Metabolit V) und 5 (Metabolit VI). 2. Spaltung der Ethanolaminkette unter Bildung von 2-Aminopyridin (Metabolit II) und vermutlich Mandelaldehyd. 3. Paarung mit Glucuronsäure (Metabolit III). Als Folge von Sekundärreaktionen entstehen: Benzoylcarbinol (Metabolit XV), Benzoesäure (Metabolit XI), Mandelsäure (Metabolit XII) und die Glucuronide der Metaboliten V, VI, VII, XII und möglicherweise II (Metaboliten VIII, IX, X, XIII und IV), die ausnahmslos auch frei nachgewiesen wurden. Ein weiterer ungewöhnlicher Schritt auf dem Wege der Biotransformation ist die Dimerisierung des Metaboliten VI unter Bildung eines Dipyridylderivates (Metabolit VII), welches frei, jedoch hauptsächlich als Glucuronid (Metabolit X) ausgeschieden wird. Keine Erklärung konnte für das Auftreten von 2-(N-Benzylamino)-pyridin (XIV) im Harn gefunden werden. Es wurden ferner vier weitere Ausscheidungsprodukte festgestellt (Metabolit XVI, XVII, XVIII und XIX), die nicht identifiziert werden konnten; zwei wurden bei alkalischer (XVI und XVII), die anderen beiden (XVIII und XIX) bei neutraler Reaktion extrahiert. Sie waren sowohl frei als auch nach salzsaurer und alkalischer Hydrolyse, jedoch nicht nach Behandlung mit β -Glucuronidase nachweisbar.

Isolation and identification of some metabolites of phenyramidol (Cabral) from human urine

Summary: The biological transformation of phenyramidol (I), some of which is also excreted unchanged, occurs by three main degradative pathways: 1. Hydroxylation of the pyridine ring in position 3 (metabolite V) and 5 (metabolite VI). 2. Cleavage of the ethanolamine chain with the formation of 2-aminopyridine (metabolite II) and presumably mandelic aldehyde. 3. Conjugation with glucuronic acid (metabolite III). Secondary reactions result in the production of: benzoyl carbinol (metabolite XV), benzoic acid (metabolite XI), mandelic acid (metabolite XII) and the glucuronides of V, VI, VII, XII and possibly II (metabolites VIII, IX, X, XIII and IV), all of which were also found as free, unconjugated compounds. A further, unusual reaction is the dimerisation of metabolite VI with the formation of a dipyridyl derivative (metabolite VII), which is excreted partly as the free compound, but mainly as the glucuronide (metabolite X). The occurrence of 2-(N-benzylamino)-pyridine (XIV) in the urine could not be explained. Four further excretory products (metabolites XVI, XVII, XVIII and XIX) were not identified; XVI and XVII were extracted at an alkaline pH, whereas XVIII and XIX were extracted under neutral conditions. They could be detected both as free compounds, and after hydrolysis with HCl or alkali, but not after treatment with β -glucuronidase.

Einführung

Phenyramidol (2-(β -Hydroxy- β -phenyl-ethylamino)-pyridin) wird in der Medizin bei Muskelspannungen und Muskelschmerzen, bei Muskelrheumatismus, Ischialgien, Bandscheibenbeschwerden u. a. m. verwendet.

Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung von Phenyramidol sind bisher nur an Hunden untersucht worden (1); im Urin wurden hierbei weniger als 1,5% des Medikamentes in unveränderter Form wiedergefunden. Der weitaus größere Teil wird als Glucuronid ausgeschieden. Nach

oralen Gabe beträgt die tägliche Ausscheidungsrate etwa 10–15% der applizierten Dosis.

Bei den vorliegenden Untersuchungen sind im Harn eines Probanden außer dem unveränderten Pharmakon 19 Stoffwechselprodukte nachgewiesen worden, von denen 14 identifiziert werden konnten; für einen weiteren Metaboliten wird ein Strukturvorschlag angegeben.

Methodik

Eine gesunde, freiwillige, 25jährige männliche Versuchsperson erhielt fünf Tage lang dreimal täglich ein Dragée Cabral, also insgesamt 6 g Phenyramidol. Vor der Einnahme wurde die obere gelbe Schicht der Dragées mit Wasser abgewaschen. Nach Beginn der Medikamenteneinnahme wurde der Harn bis einschließlich drei Tage nach der letzten Gabe für die Untersuchung verwendet; die täglich anfallende Harnmenge wurde direkt aufbereitet.

Vor Versuchsbeginn wurden 3,5 l Harn desselben Probanden gesammelt und genauso wie die medikamentenhaltigen Proben aufbereitet und untersucht.

Extraktion des Harnes

Das Extraktionsschema ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Für die salzsaure Hydrolyse wurden jeweils 1000 ml der bei saurer, neutraler und alkalischer Reaktion mit Chloroform extrahierten wäßrigen Phase mit 200 ml HCl (370 g/kg) versetzt und 3 Stunden unter Rückfluß gekocht.

Für die alkalische Hydrolyse wurde 1 Teil der nach salzsaurem Spaltung extrahierten wäßrigen Phase mit 1 Teil 8 mol/l NaOH-Lösung versetzt und 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt.

Gewinnung der Konjugate und enzymatische Spaltung

Der Harn wurde erst – zur Entfernung der freien Anteile – wie beschrieben bei saurer, alkalischer und neutraler Reaktion mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Konjugate wurden dann mit Bleiacetat ausgefällt. Der Niederschlag wurde anschließend filtriert, gewaschen, in Methanol suspendiert und die Pb-Ionen

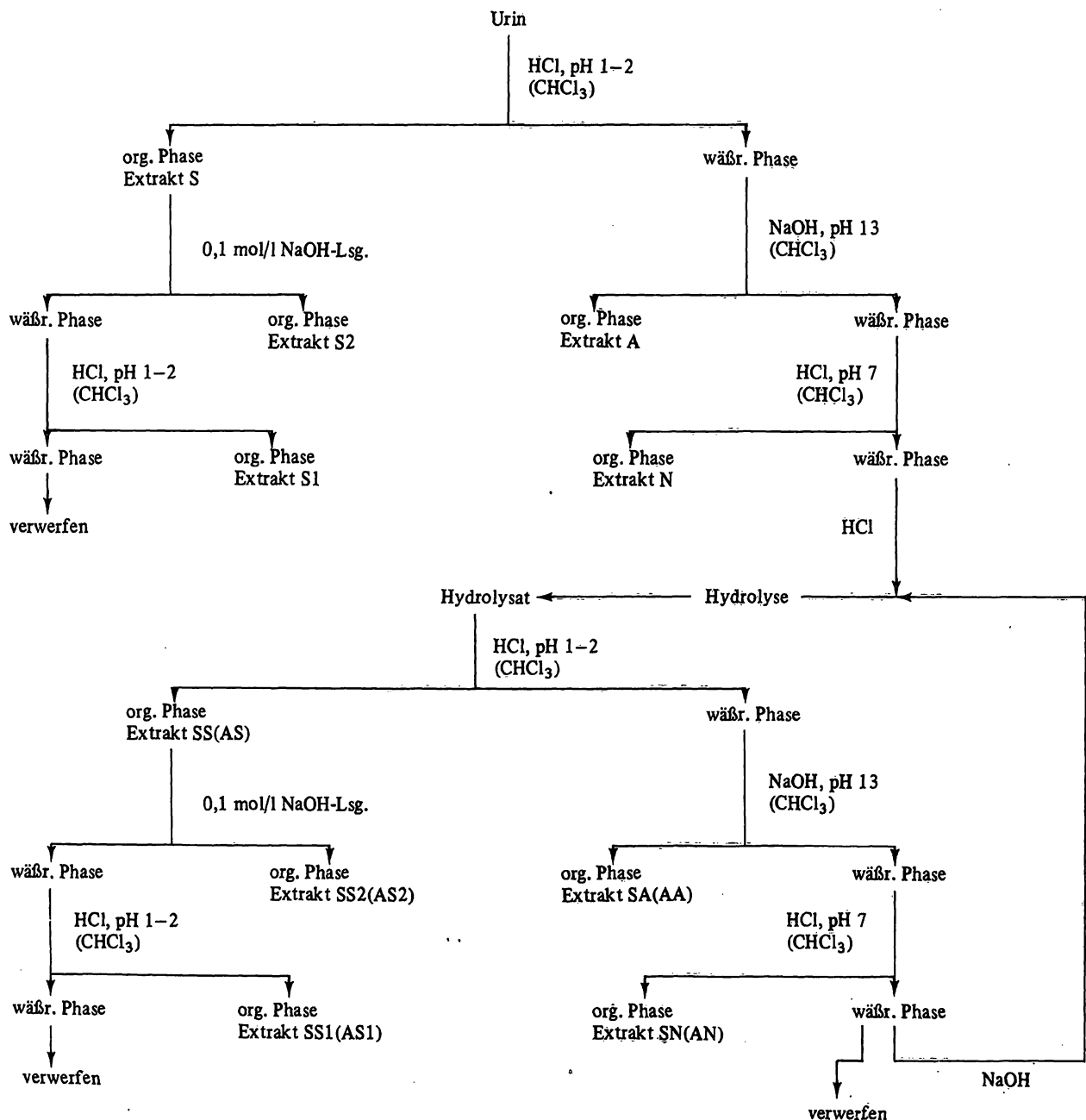


Abb. 1: Extraktionsschema des Urins.

durch Einleiten von H_2S ausgefällt (2); nach Filtration wurde die Lösung eingedampft, der Rückstand in 25 ml Pufferlösung pH 5,5 aufgenommen und mit 2 ml β -Glucuronidase (E. Merck) eine Woche lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die wäßrige Phase bei pH 1–2, dann bei pH 13 und schließlich bei pH 7 jeweils mit Chloroform extrahiert.

Schichtchromatographie

Es wurden Platten von 200 x 200 mm, die mit Kieselgel HF₂₅₄ nach dem Standardverfahren von Stahl (3) beschichtet wurden, benutzt. Für die präparative Schichtchromatographie wurde Kieselgel PF₂₅₄ (Schichtdicke 0,50–0,75 mm) verwendet.

Fließmittel waren:

1. Chloroform/Aceton (Volumina 85 ml + 15 ml)
2. Chloroform/Benzol/Methanol (Volumina 73 ml + 20 ml + 7 ml)
3. Methanol/Ammoniak (250 g/kg) (Volumina 150 ml + 1 ml)
4. Benzol/Aceton (Volumina 80 ml + 20 ml)
5. Chloroform/Benzol/Methanol (Volumina 60 ml + 25 ml + 15 ml)
6. Benzol/Methanol/Eisessig (Volumina 79 ml + 14 ml + 7 ml) (4)
7. Chloroform/Aceton/Ameisensäure (Volumina 70 ml + 29 ml + 1 ml) (5)
8. Chloroform/Aceton (Volumina 95 ml + 5 ml)

Als Nachweisreagenzien wurden benutzt:

- A. Dragendorff-Reagenz nach Munier & Macheboeuf (6) und Nachbehandlung mit $FeCl_3$ -Lösung (50 g/l Wasser)
- B. Kaliumjodoplatinat (6)
- C. Echtblausalz B (5 g/l Wasser) (6)
- D. Bromkresolgrün 0,4 g/l Ethanol (960 ml/l). Die Lösung wird mit 0,1 mol/l NaOH-Lösung bis zur eben auftretenden Blaufärbung versetzt (6)
- E. 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium 1 g/l Ethanol (960 ml/l) Erhitzen bei 120 °C (6)
- F. Silbernitrat (100 g/l Wasser) (7)

Für den Nachweis der Ausscheidungsprodukte wurden jeweils die entsprechenden Extrakte des medikamentenhaltigen und -freien Harnes mit der Technik der zweidimensionalen Trennung chromatographiert und miteinander verglichen. Für beide Richtungen wurde immer dasselbe Fließmittel benutzt.

Vor der Behandlung mit den Reagenzien wurden die Chromatogramme im kurz- und langwelligen UV-Licht ausgewertet; die Detektion der Substanzen auf den präparativen Schichten erfolgte im UV-Licht oder durch Besprühen der Plattenränder mit dem entsprechenden Reagenz. Vor den spektroskopischen Messungen wurden die Substanzen auf Schichten, die mit Chloroform/Methanol (Volumina 1 + 1) voreluert waren, erneut chromatographiert; die substanzhaltigen Zonen wurden abgetragen, auf eine mit Seesand gefüllte Säule (8) gegeben und mit Chloroform/Methanol-Gemisch eluiert. Das Lösungsmittelgemisch wurde in vacuo am Rotationsverdampfer bei etwa 40 °C abgedampft.

Gaschromatographische quantitative Mandel- und Benzoesäurebestimmung¹⁾

10 ml Harn wurden mit HCl (370 g/kg) auf pH 1 gebracht, mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 40 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei etwa 40 °C abgezogen. Der trockene Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril/Chloroform/N, O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (Volumina 2 + 1 + 1) aufgenommen und 1 Stunde auf 40–50 °C erhitzt. 0,5 μ l der resultierenden Lösung wurde in den Gaschromatographen injiziert.

Für die Gesamtmandelsäurebestimmung wurde 1 Teil des Harnes vorher – nach Versetzen mit 1 Teil 8 mol/l NaOH-Lösung –

30 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert und das Hydrolysat – wie bei der Bestimmung der freien Säuren angegeben – weiterbehandelt.

Es wurde eine gepackte Säule (2 m Länge, 2 mm ID) mit der Füllung OV-3 (3%) auf Chromosorb WHP, 100-120 mesh verwendet. Injektionsblock, 180 °C. Detektor, 250 °C. Temperaturprogramm, 5 min 100 °C und 5 min 250 °C (4 °C/min).

Spektralphotometrische Mandelsäurebestimmung

Die Untersuchung erfolgte nach alkalischer Hydrolyse des Harnes nach dem Verfahren von Cummins et al. (9).

Darstellung von 2-(β -Hydroxy- β -phenyl-ethylamino)-3-hydroxypyridin

1,8 g (0,01 mol) Mandelsäureethylester und 1,1 g (0,01 mol) 2-Amino-3-hydroxypyridin wurden in einem 50 ml Rundkolben 4 Stunden auf 110–120 °C erhitzt, wobei der entstehende Ethylalkohol über eine Brücke laufend abdestilliert wurde. Nach dem Abkühlen wurde das braun gefärbte Reaktionsgemisch in 1 mol/l NaOH-Lösung gegeben und überschüssiger Ester mit Chloroform extrahiert. Die Abtrennung des entstandenen Amids von nicht umgesetztem 2-Amino-3-hydroxypyridin gelang durch Extraktion mit Chloroform bei pH 3–4, wobei das Amin in der wäßrigen Phase zurückbleibt. Das Amid wurde aus Chloroform/Isopropanol umkristallisiert; Ausbeute etwa 60% der Theorie. Die Identifizierung erfolgte nach vorheriger schichtchromatographischer Reinigung mit Hilfe der IR- und Massenspektroskopie.

1 g des Mandelsäureamids wurde in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und anschließend portionsweise ein Überschuss an $LiAlH_4$ zugegeben. Nach einstündigem Kochen unter Rückfluß und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit reichlich Wasser zersetzt, neutralisiert und direkt mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Reinigung durch präparative Schichtchromatographie kristallisierte 2-(β -Hydroxy- β -phenyl-ethylamino)-3-hydroxypyridin aus Chloroform/Isopropanol. Ausbeute: 85% der Theorie Fp.: 168–170 °C.

Darstellung von 2-(N-Benzylamino)-pyridin

5 g Benzylbromid (etwa 0,03 mol) und 5,5 g 2-Aminopyridin (etwa 0,06 mol) wurden 2 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsgemisch mit dest. Wasser verrührt und schwach angesäuert (pH 3). Unter diesen Bedingungen ist 2-(N-Benzylamino)-pyridin im Gegensatz zu 2-Aminopyridin mit Chloroform extrahierbar. Nach Reinigung des Rohprodukts mittels präparativer Schichtchromatographie und Umkristallisieren aus Ethanol wurde 2-(N-Benzylamino)-pyridin in Form farbloser Blättchen von Fp. 93 °C (Lit.: 93–94 °C (10)) Ausbeute (bezogen auf Benzylbromid): 57% der Theorie erhalten.

Darstellung von Benzoylcarbinol

4,5 g (etwa 0,03 mol) ω -Chloracetophenon wurden mit 100 ml Na_2CO_3 -Lösung (100 g/l) 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen und Ansäuern fanden sich im Chloroformextrakt mehrere Reaktionsprodukte. Durch chromatographische Reinigung konnten etwa 800 mg reines Benzoylcarbinol vom Fp. 85 °C. (Lit.: 86–87 °C (11)) erhalten werden.

Geräte

Die UV-Spektren wurden mit einem Leitz-Unicam-Spektrophotometer SP 800 B aufgenommen. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer-Spektrophotometer Modell 221 mit Gitter-Prisma-Austausch-Einheit, wenn nicht anders angegeben, in KBr unter Standardbedingungen. Die Massenspektren wurden durch direkte Einführung in das MS-9 (AEI) bei einer Ionenquellentemperatur von 150–190 °C, einem Emissionsstrom von 100 μ A und Ionisierungsenergien von 12 und 70 eV aufgenommen. Die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren erfolgte mit dem EM-360 60 MHz-Spektrometer in Dimethylsulfoxid-d₆. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben, bezogen auf Tri-

¹⁾ An dieser Stelle möchten wir Herrn Dr. K. Olek und Herrn Dipl.-Chem. P. Wardenbach – Institut für Humangenetik der Universität Bonn – für die Durchführung der Untersuchungen herzlich danken.

methylsilylacetamid. Für die gaschromatographische Untersuchung wurde ein Pye-104 Gaschromatograph mit Doppel-FID benutzt.

Ergebnisse

Die für die verschiedenen Substanzen verwendeten Fließmittel und Nachweisreagenzien sind in Tabelle 1 angegeben.

Vor Hydrolyse des Harnes wurden insgesamt 13 Ausscheidungsprodukte festgestellt. Nach salzsaurer und nach alkalischer Hydrolyse wurden jeweils 10 Substanzen, nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucuronidase nur 6 gefunden. Alle konjugiert ausgeschiedenen Verbindungen wurden auch vor der Hydrolyse nachgewiesen. Aus dem Formelschema (Abb. 6) ist zu entnehmen, in welchen Extrakten die einzelnen Substanzen gefunden wurden.

Bei pH 13 wurden vier Verbindungen ausgeschüttelt. Substanz I wurde dünnschichtchromatographisch, UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ - und massenspektrometrisch als Phenyramidol identifiziert. Das Massenspektrum ist in Abbildung 2 zu sehen. Eine weitere Verbindung (Metabolit II) zeigte in Methanol ein UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 233 und 297 nm. Im IR-Spektrum waren Banden für Aromaten ($3071, 3027, 1595, 1556$ und 1480 cm^{-1}) sowie die NH_2 -Valenzschwingungen ($3450, 3315, 3238$ und 3172 cm^{-1}) deutlich zu sehen. Durch dünnschichtchromatographischen und spektroskopischen Vergleich (UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ und Massenspektrum) mit den isomeren Aminopyridinen konnte die Struktur von Metabolit II als 2-Aminopyridin bewiesen werden.

Für die beiden anderen Substanzen (Metabolit XVI und XVII) konnte wegen zu geringer Substanzmenge keine Struktur abgeleitet werden.

Bei pH 7 wurden fünf weitere Substanzen extrahiert, von denen zwei nicht identifiziert werden konnten (Metabolit XVIII und XIX); die drei anderen erhielten die Bezeichnung Metabolit V, Metabolit VI und Metabolit VII.

Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurde die Summenformel von Metabolit V zu $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ bestimmt. Somit besitzt dieser Metabolit ein Sauerstoffatom mehr als Phenyramidol. Dieses O-Atom muß, wie der Vergleich der Hauptfragmente in den Massenspektren von Phenyramidol und Metabolit V zeigt, im Pyridinteil des Moleküls lokalisiert sein (Abb. 2).

Das UV-Spektrum des Metaboliten V ergab in Methanol Absorptionsmaxima bei 243 und 305 nm. Bei pH 10 lagen die Absorptionsmaxima bei etwa 254 und 315 nm. Das IR-Spektrum zeigte eine sehr breite Absorption bei $3600\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ (OH- und NH-Banden), ferner Banden bei 3060 und 3030 cm^{-1} (Aromat), aliphatische C-H- bei 2920 und 2850 cm^{-1} , sowie aromatische C=C-Valenzschwingungen zwischen 1610 und 1500 cm^{-1} .

Das in Dimethylsulfoxid- d_6 aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt bei $\delta = 3.4, 5.63$ (t, $J = 5\text{ Hz}$) und 9.6 ppm Absorptionen für jeweils ein Proton, die bei Zugabe von D_2O verschwinden und einer aliphatischen OH-, einer NH- und einer phenolischen OH-Gruppe zugeordnet werden können.

Bei $\delta = 3.5$ ppm erhält man ein Multiplett entsprechend zwei Protonen, bei 4.82 ppm eine aus vier Linien bestehende Absorptionsbande (X-Teil eines ABX-Spektrums) entsprechend einem Proton. Die chemische Verschiebung und Multiplizität dieser Signale entsprechen nahezu völlig denen im Spektrum von Phenyramidol und können einer $\text{CH}_2\text{-N-}$ und einer CH-OH- Gruppe zugeordnet werden. Im Bereich der Aromaten-Protonen erkennt man bei 7.33 ppm eine Bande für fünf Phenyl-Protonen,

Tab. 1. Fließmittel und Nachweisreaktionen des Phenyramidol und seiner freien Ausscheidungsprodukte auf Kieselgel HF₂₅₄-Schichten.

Substanz	Fließmittel								Nachweisreagenzien					
	1	2	3	4	5	6	7	8	A	B	C	D	E	F
Phenyramidol	x	x	x						orangerot	blau (gelb)*				
Metabolit II	x	x	x						rotviolett					
Metabolit V				x	x				rotbraun		violett			
Metabolit VI				x	x				braun		dunkelblau			
Metabolit VII				x	x				rotbraun		braun			
Metabolit XI						x	x					gelb	rosarot	
Metabolit XII						x	x					gelb	rosarot	
Metabolit XIV				x				x	orangerot	blau				
Metabolit XV				x				x						schwarz**
Metabolit XVI		x							orangerot	blau				
Metabolit XVII		x							orangerot	blau				
Metabolit XVIII				x							blau			
Metabolit XIX				x							blau			

* Farbumschlag beim Vorliegen größerer Mengen

** nach Erhitzen auf 120°C

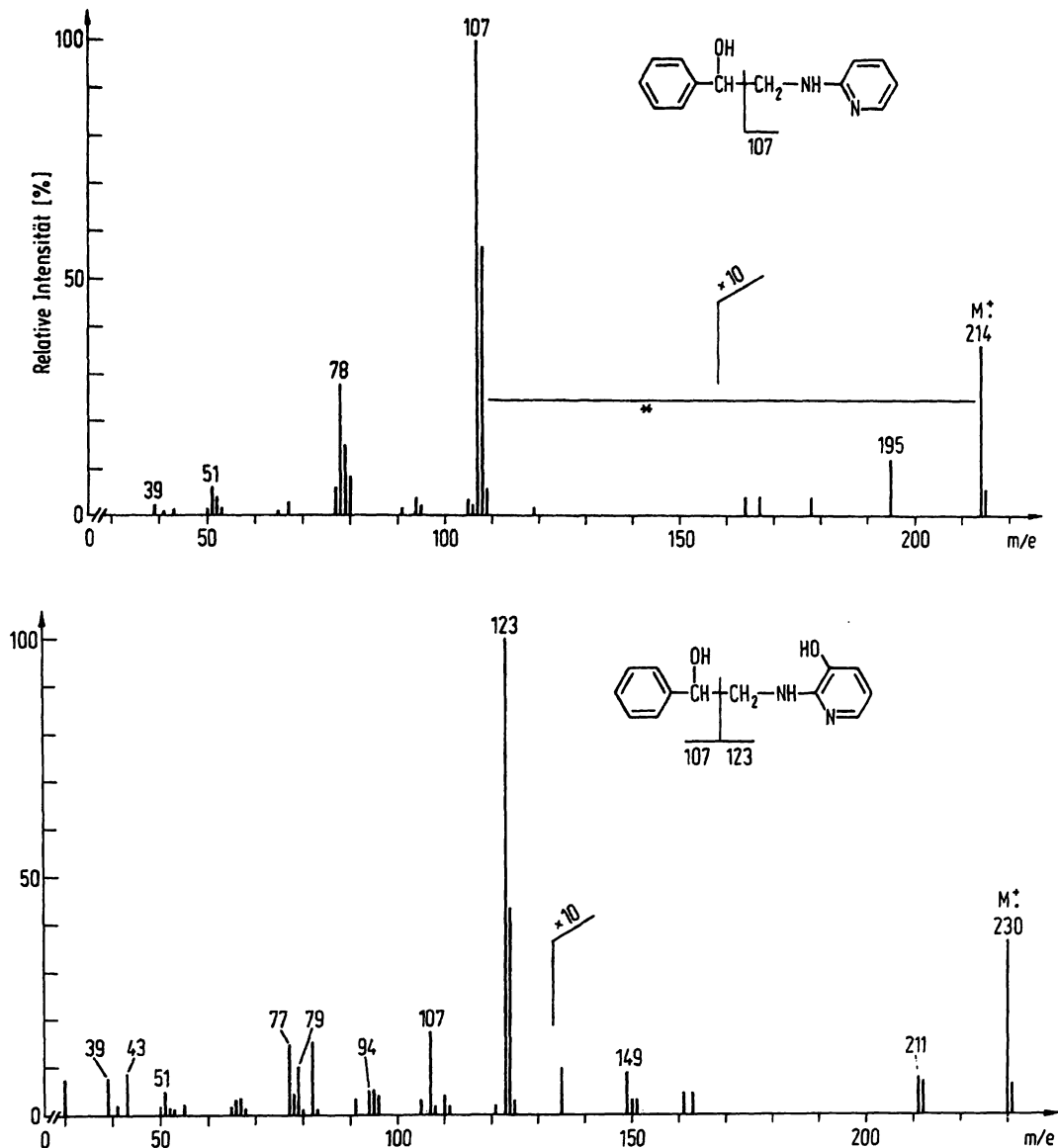


Abb. 2. Massenspektrum des Phenyramidol und von Metabolit V.

dazu drei weitere Signalgruppen (Doppeldubletts) für jeweils ein H-Atom am Pyridinring: 6.35 ppm (dd, $J_{4,5} = 7,5$ Hz, $J_{5,6} = 5$ Hz); 6.81 ppm (dd, $J_{4,5} = 7,5$ Hz, $J_{4,6} = 1,5$ Hz); 7.48 ppm (dd, $J_{5,6} = 5$ Hz, $J_{4,6} = 1,5$ Hz). Aufgrund der Multiplizität, der Größe der Kopplungskonstanten und der chemischen Verschiebungen kann die Position der zusätzlichen OH-Gruppe im Heteroaroma festgelegt und damit die Struktur von Metabolit V als 2-(β -Hydroxy- β -phenyl-ethylamino)-3-hydroxypyridin bestimmt werden. Durch Umsetzung von 2-Amino-3-hydroxypyridin mit Mandelsäureethylester und anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid ließ sich Metabolit V in guter Ausbeute darstellen. Das Syntheseprodukt war in allen untersuchten physikalischen und chemischen Eigenschaften mit dem isolierten Metaboliten V identisch.

Die Summenformel des Metaboliten VI wurde massenspektrometrisch zu $C_{13}H_{14}N_2O_2$ ermittelt. Die Elektronenstoßinduzierte Fragmentierung (Abb. 3) verläuft ganz analog wie bei V, was auf eine ähnliche Struktur

der beiden Metaboliten schließen läßt. Metabolit VI ergab in Methanol ein UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 243 und 325 nm. Im IR-Spektrum erkennt man eine sehr breite Bande zwischen 3600 und 2100 cm^{-1} ; ferner Banden bei etwa 3030 cm^{-1} (C-H-Aromat), bei 2920 und 2855 cm^{-1} (aliphatische C-H-Valenzschwingungen) und aromatische C=C-Valenzschwingungen zwischen 1615 und 1480 cm^{-1} .

Im 1H -NMR-Spektrum erkennt man bei $\delta = 3.4$, 5.9 und 8.7 ppm Banden für drei mit D_2O austauschbare Protonen (aliphatisches -OH, -NH und aromatisches -OH). Das CH-OH-Proton absorbiert bei 4.75 ppm und spaltet durch Kopplung mit den benachbarten Methylenprotonen in vier Linien auf (X-Teil eines ABX-Spektrums). Die CH_2 -Gruppe erscheint als schlecht getrenntes Multiplett bei 3.3 ppm. In $CDCl_3$ -Lösung findet man für die Methylengruppe ein Dublett bei 3.5 ppm ($J = 5$ Hz), für die Methingruppe ein Triplet bei 4.88 ppm. Im Aromatenbereich beobachtet man Absorptionssignale für fünf Protonen am Phenylring (5.38 ppm) sowie für drei Pro-

tonen am Pyridinring bei 6,48 ppm (d, $J_0 = 9$ Hz); 7,01 ppm (dd, $J_0 = 9$ Hz, $J_m = 2,5$ Hz) und 7,65 ppm (d, $J_m = 2,5$ Hz).

Aufgrund der Multiplizität der Signale kann es sich bei VI nur um ein 4- oder 5-Hydroxypyridin-Derivat handeln. Die Größe der o-Kopplung ist nur vereinbar mit einer 3,4-Stellung zweier Protonen. Das Proton bei tiefem Feld muß aufgrund der beobachteten Aufspaltung zwangsläufig an C-6 gebunden sein. Damit im Einklang sind auch die gefundenen chemischen Verschiebungen, die mit den berechneten gut übereinstimmen. Somit ergibt sich die Struktur des Metaboliten VI zu 2-(β -Hydroxy- β -phenyl-ethylamino)-5-hydroxypyridin.

Metabolit VII stellt eine kristalline gelbe Substanz vom Schmelzpunkt 205–208 °C, die im langwelligen UV-Licht auf dem Chromatogramm eine starke orange Fluoreszenz aufweist, dar.

Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurde für Metabolit VII die Summenformel $C_{26}H_{26}N_4O_4$ bestimmt. Metabolit VII zeigt in Methanol Absorptionsmaxima bei 267, 406 und 413 nm. Im IR-Spektrum erkennt man bei 3540, 3420 und 3350 cm^{-1} Banden für -OH und -NH, bei 3085, 3060, 3030 sowie bei 2915 und 2850 cm^{-1} Banden von aromatischen und aliphatischen Valenzschwingungen und bei 1590, 1540 und 1525 cm^{-1} Banden für die aromatischen C=C-Valenzschwingungen. Abbildung 4 zeigt das Massenspektrum des Metaboliten VII. Die Elementarzusammensetzung der wichtigsten Fragmente wurde durch Hochauflösung bestimmt. Durch α -Spaltung des Moleküls $C_{26}H_{26}N_4O_4$ (m/e 458) wird zunächst das Ion m/e 351 gebildet, welches anschließend – wie durch metastabile Übergänge angezeigt wird – unter Verlust von Wasser, Benzaldehyd, Benzylalkohol bzw. Acetophenon die Fragmente m/e 333, 245, 243 und 231 ergibt. Das Ion m/e 229 entsteht durch Abspaltung von Styrol aus dem Ion m/e 333. Demnach han-

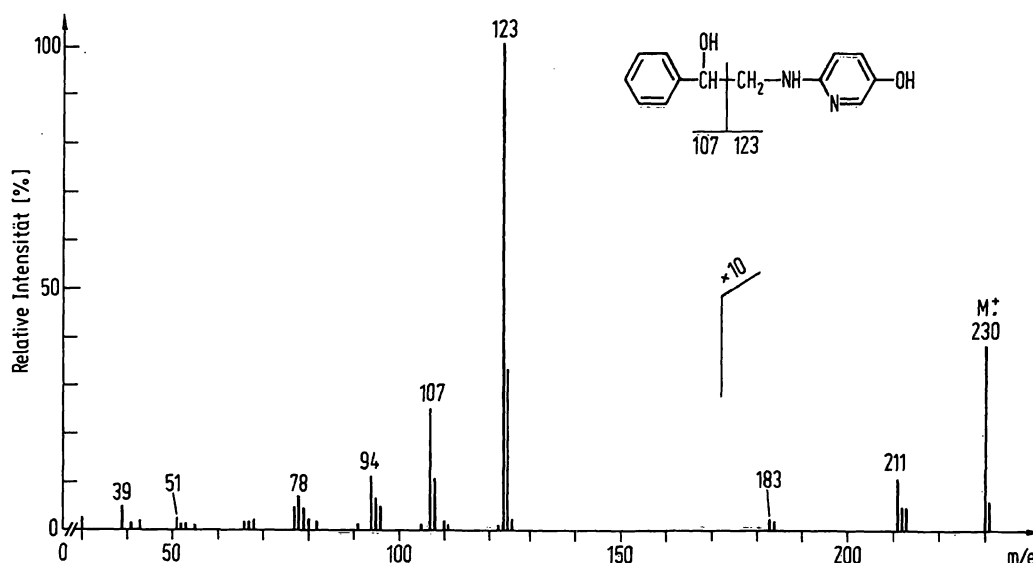


Abb. 3: Massenspektrum von Metabolit VI.

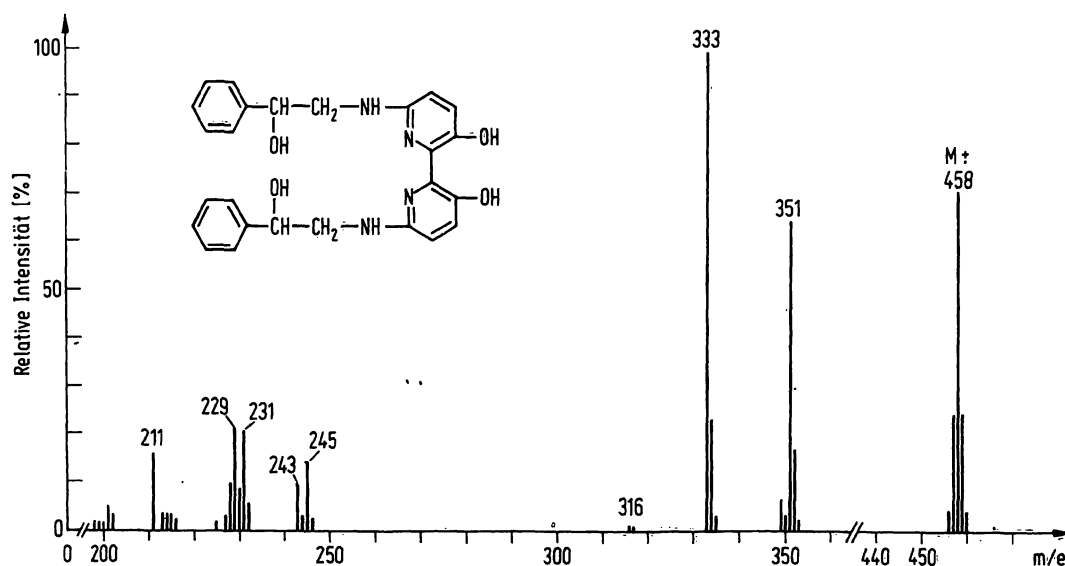


Abb. 4: Massenspektrum von Metabolit VII.

delt es sich bei Metabolit VII um das Dimere eines Hydroxyphenyramidols, wobei sowohl die Verknüpfungsstellen als auch die zusätzlichen OH-Funktionen an den Aminopyridin-Einheiten lokalisiert sein müssen.

Die endgültige Struktur ließ sich mit Hilfe des in Dimethylsulfoxid- d_6 aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums festlegen, das für die Protonen an den Heteroaromaten ein AB-Spektrum entsprechend vier H-Atomen ($\nu_A = 399 \text{ Hz}$; $\nu_B = 432 \text{ Hz}$; $J_{AB} = 9 \text{ Hz}$) zeigte.

Aufgrund der Größe der Kopplungskonstanten sowie der chemischen Verschiebungen muß das Signal bei 6.65 ppm (berechnet (12) 6.59 ppm) zwei Protonen in Position 3, das Signal bei 7.20 ppm (ber. 6.98 ppm) zwei Protonen in Position 4 zugeordnet werden. Somit handelt es sich bei Metabolit VII um das in 6-Stellung verknüpfte Dimere von Metabolit VI.

Bei pH 1–2 wurden fünf Ausscheidungsprodukte extrahiert. Eines davon ist Phenyramidol, das nur in Spuren zu sehen war; die anderen sind die Metaboliten XI, XII, XIV und XV.

Metabolit XI konnte durch Vergleich mit dem authentischen Material dünn-schichtchromatographisch und spektrophotometrisch (UV-, IR- und MS-Spektrum) als Benzoesäure identifiziert werden.

Auch durch Vergleich mit dem authentischen Material konnte Metabolit XII dünn-schicht- und gaschromatographisch sowie durch die UV- und IR-Spektren als Mandelsäure identifiziert werden. Gaschromatographisch wurden – nach Einnahme von 1200 mg Phenyramidol – 14–16 mg freie Benzoesäure in dem 24-Stunden-Sammelharn festgestellt. Unter den gleichen Bedingungen war in dem medikamentenfreien Harn keine Benzoesäure nachweisbar. Bei demselben Versuch wurden 14 mg freie und 28–30 mg konjugierte Mandelsäure (also insgesamt 42–44 mg) pro Liter Harn festgestellt.

In dem medikamentenfreien Harn war keine freie Mandelsäure nachweisbar und nach alkalischer Hydrolyse wurden nur 4–6 mg/l gefunden.

Die Elementarzusammensetzung des Metaboliten XIV wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2$ bestimmt (Abb. 5). Das UV-Spektrum von Metabolit XIV ist identisch mit dem des Phenyramidol (Absorptionsmaxima bei 244–245 und 306 nm). Im IR-Spektrum erkennt man Absorptionsbanden bei 3225 cm^{-1} (NH), zwischen 3100 und 3000 cm^{-1} (C-H-Aromat), zwischen 3000 und 2800 cm^{-1} (CH-aliphatisch) und zwischen etwa 1600 und 1480 cm^{-1} (C=C-Aromat).

Für Metabolit XIV wurde die Struktur 2-(N-Benzyl)-aminopyridin abgeleitet. Das zum Beweis synthetisierte Produkt war in jeder Hinsicht – dünn-schichtchromatographisch und in seinen spektroskopischen Eigenschaften – mit der isolierten Substanz identisch. Eine weitere Substanz – Metabolit XV – zeichnete sich durch die schwarze Färbung, die nach Besprühen mit Silbernitrat-Reagenz und anschließendem Erhitzen auf 120°C entstand, aus. Metabolit XV verhielt sich dünn-schichtchromatographisch wie Benzoylcarbinol und besaß dasselbe UV-Spektrum. In dem medikamentenhaltigen Harn konnte außerdem – nach Hydrolyse mit Natronlauge – durch das UV-Spektrum Benzaldehyd, ein Umwandlungsprodukt des Benzoylcarbinol, nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen mit Metabolit XV konnten wegen der geringen Menge nicht durchgeführt werden.

Für Metabolit XV wird aufgrund der erwähnten Untersuchungen die Struktur des Benzoylcarbinol angenommen.

Sämtliche freien Ausscheidungsprodukte mit Ausnahme der Metaboliten XI, XV, XVI, XVII, XVIII und XIX waren auch nach Spaltung mit β -Glucuronidase nachweisbar. Die entsprechenden Glucuronide sind im Formel-

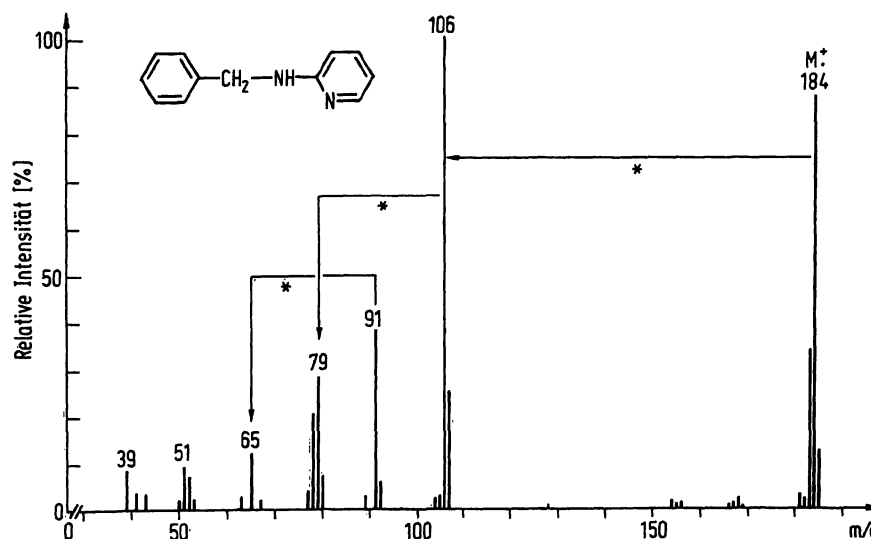


Abb. 5: Massenspektrum von Metabolit XIV.

schema (Abb. 6) als Metabolit III, IV, VIII, IX, X und XIII bezeichnet. Allerdings ist für die entsprechende Verbindung des Metaboliten II (Metabolit IV) die Bezeichnung Konjugat vorgezogen worden, da nicht als sicher gilt, daß 2-Aminopyridin mit Glucuronsäure gepaart ausgeschieden wird (s. Diskussion).

Metabolit XV wurde nur in freier Form gefunden, während Metabolit XI (Benzoessäure) sowie die unbekannt Verbindungen XVI, XVII, XVIII und XIX frei, nach salzsaurer und nach alkalischer, aber nicht nach enzymatischer Spaltung nachgewiesen werden konnten; Benzoesäure war allerdings nach Hydrolyse auch in dem medikamentenfreien Harn nachweisbar. Quantitative Untersuchungen auf Benzoesäure sind nur in dem nicht hydrolysierten Harn durchgeführt worden.

Diskussion

Die Biotransformation des Phenyramidol (I) läßt sich durch das in Abbildung 6 angegebene Formelschema veranschaulichen. Bei der Biotransformation dieser Substanz, die zu einem Teil unverändert ausgeschieden wird, zeigen sich drei primäre Hauptabbauwege:

1. Hydroxylierung des Pyridinringes in Position 3 (Metabolit V) und 5 (Metabolit VI)

2. Spaltung der Ethanolaminkette unter Bildung von 2-Aminopyridin (Metabolit II) und vermutlich Mandelaldehyd

3. Glucuronidbildung (Metabolit III).

Als Folge von Sekundärreaktionen entstehen Benzoylcarbinol (Metabolit XV), Benzoesäure (Metabolit XI), Mandelsäure (Metabolit XII) und die Glucuronide der Metaboliten II, V, VI und XII (Metaboliten IV, VIII, IX und XIII), die ausnahmslos auch frei ausgeschieden werden.

Ein ungewöhnlicher Schritt auf dem Wege der Biotransformation ist schließlich die Dimerisierung des Metaboliten VI durch direkte Verknüpfung der Pyridinringe unter Bildung eines Dipyridylderivates (Metabolit VII), welches frei, hauptsächlich jedoch glucuroniert (Metabolit X) ausgeschieden wird.

Kondensationsprodukte sind im menschlichen Harn bisher nur nach Einnahme von Aminophenazon festgestellt worden (13); hier erfolgt die Verknüpfung jedoch über die Aminogruppe in Position 4 des Pyrazolonringes. Die beschriebenen Substanzen Rubazon- und Methylrubazonsäure scheinen zumindest teilweise erst nachträglich über Vorstufen im Harn zu entstehen (13).

Die Möglichkeit einer Artefaktbildung mußte auch in dem vorliegenden Fall berücksichtigt werden. Zur Klärung dieser Frage wurde der hochgereinigte Metabolit VI in medikamentenfreiem Urin gelöst. Nach mehrstündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde der gesamte Prozeß der Aufbereitung und Extraktion des Harnes wiederholt. Dünnschichtchromatographisch war nur Metabolit VI nachweisbar. Später stellte sich heraus,

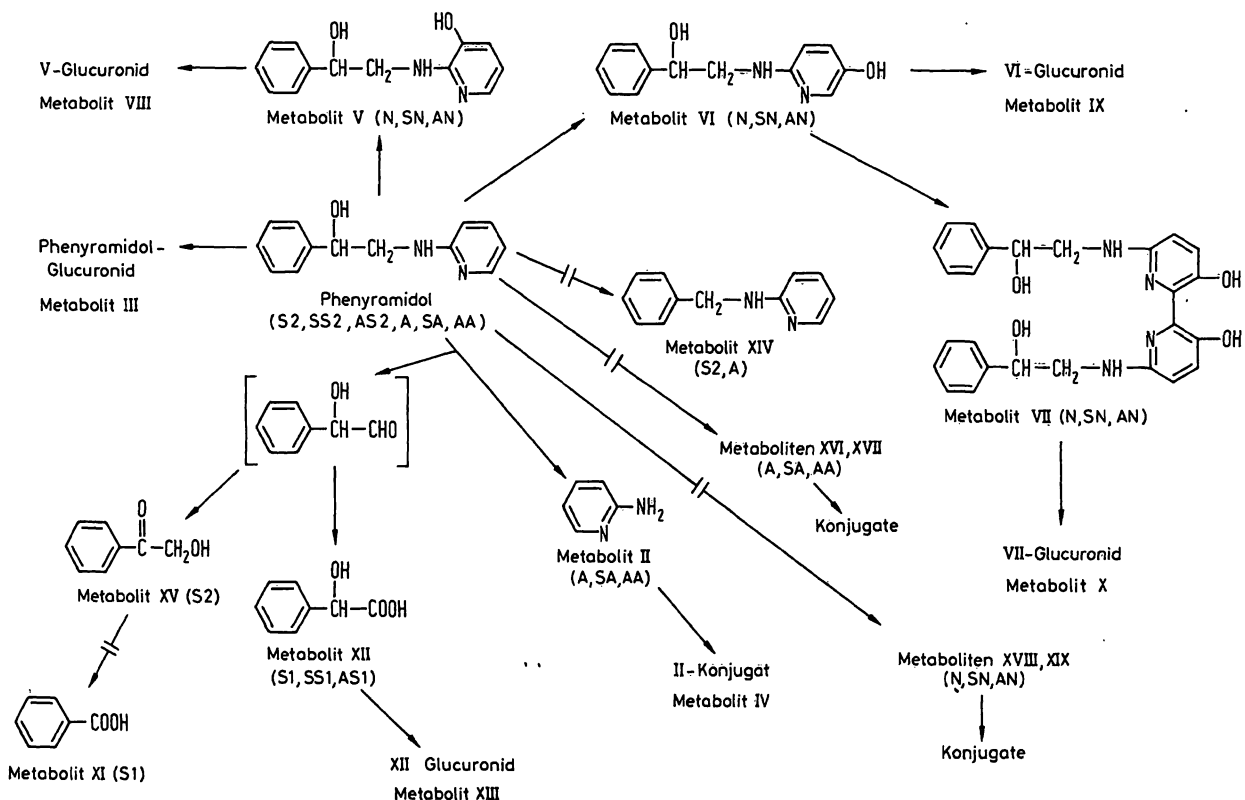


Abb. 6: Abbauschema des Phenyramidol. In Klammern sind die Extrakte angegeben, in denen die Metaboliten gefunden wurden (s. Abb. 1).

daß eine hochgereinigte Probe des Metaboliten VI nach mehrmonatiger Aufbewahrung im Kühlschrank (+ 2–4 °C) eine leicht gelbliche Färbung angenommen hatte; die dünn-schichtchromatographische Prüfung ergab, daß ein sehr geringer Teil des Metaboliten VI in Metabolit VII umgewandelt war.

Es erscheint trotzdem unwahrscheinlich, daß es sich bei Metabolit VII ausschließlich um ein Artefakt handeln soll, denn nach Einnahme des Phenyramidol wurden aus dem Sammelharn insgesamt etwa 30 mg des Dipyridylderivates gewonnen, eine Menge, die nach unserer Erfahrung *in vitro* nicht entstanden sein kann.

Die Hydroxylierung in Stellung 5 des Pyridinringes scheint der Hauptabbauweg des Phenyramidol zu sein.

Bei der enzymatischen Spaltung der Ethanolaminkette durch oxidative Desaminierung wird neben dem nachgewiesenen 2-Aminopyridin (Metabolit II) die Entstehung von Mandelaldehyd als weiteres primäres Spaltprodukt angenommen.

Mandelaldehyd ist in wäßriger Lösung wenig beständig und geht schon bei 0 °C in Benzoylcarbinol über (14); *in vivo* scheint dagegen die Oxidation zu Mandelsäure im Vordergrund zu stehen (13). Von Benzoylcarbinol wiederum ist bekannt, daß es – insbesondere beim Erhitzen mit Alkali – in Benzaldehyd und Formaldehyd übergeht (15, 16).

Nach Einnahme von Phenyramidol war im Harn tatsächlich Benzoylcarbinol dünn-schichtchromatographisch und nach präparativer schichtchromatographischer Reinigung durch sein UV-Spektrum nachweisbar. In dem alkalisch hydrolysierten 24-Stunden-Sammelharn konnte außerdem – nach Extraktion mit *n*-Hexan – Benzaldehyd spektralphotometrisch festgestellt werden.

Diese Untersuchungen zeigen, daß das als Zwischenprodukt vermutete Mandelaldehyd im Organismus, z. T. in Benzoylcarbinol (Metabolit XV), z. T. in Mandelsäure (Metabolit XII) umgewandelt wird. Benzoylcarbinol dürfte die Vorstufe zur Bildung der Benzoesäure (Metabolit XI), die in freier Form nur in dem Medikamentenharn nachgewiesen werden konnte, darstellen.

Quantitativ durchgeführte Messungen bestätigen den angenommenen Abbauweg. Nach Einnahme von 1200 mg Phenyramidol wurde in dem alkalisch hydrolysierten 24-Stunden-Sammelharn gaschromatographisch eine Gesamtmandelsäurekonzentration von 42–44 mg/l gefunden, während spektrophotometrisch 54–56 mg/l festgestellt wurden.

Diese Diskrepanz zwischen beiden Verfahren läßt sich dadurch erklären, daß mit der spektralphotometrischen Methode außer Mandelsäure auch Benzaldehyd – bei der alkalischen Hydrolyse aus Benzoylcarbinol entstanden – erfaßt wird, denn dieses Verfahren beruht auf der Oxidation der Mandelsäure zu Benzaldehyd, wel-

ches – nach Extraktion mit *n*-Hexan – quantitativ bestimmt wird (9).

Diese Vermutung konnte bestätigt werden; in dem alkalisch hydrolysierten Harn wurden – bei Verzicht auf die Oxidation – 9 mg Benzaldehyd pro Liter gefunden, das entspricht einem Mandelsäuregehalt von 13 mg/l. Wird dieser Benzaldehyd – bzw. Mandelsäureanteil berücksichtigt, so zeigen beide Verfahren gute Übereinstimmung.

Keine Erklärung konnte für das Auftreten von 2-(*N*-Benzylamino)-pyridin (Metabolit XIV) im Medikamentenharn gefunden werden. Der Verdacht, das Handelsprodukt sei mit dieser Verbindung verunreinigt gewesen, konnte durch die dünn-schichtchromatographische Prüfung nicht bestätigt werden.

Außer den drei erwähnten Hauptabbauwegen sind für Phenyramidol auch andere Primärreaktionen denkbar. Diese Frage könnte geklärt werden, wenn es gelingt, die Struktur von vier anderen, nicht identifizierten Ausscheidungsprodukten (Metabolit XVI, XVII, XVIII und XIX) aufzuklären.

Die Metaboliten XVI und XVII waren aus alkalischer, die Metaboliten XVIII und XIX aus neutraler Lösung extrahierbar; der neutrale Charakter der letzten beiden Verbindungen und ihre Anfärbbarkeit mit Echtblausalz B lassen den Verdacht aufkommen, daß es sich hierbei möglicherweise um phenolische Substanzen handelt.

Die im Formelschema (Abb. 6) angegebenen Glucuronide sind in dem – nach Extraktion der freien Ausscheidungsprodukte – ausgefallten Konjugatgemisch nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucuronidase indirekt über die Aglykone nachgewiesen worden. Hiernach mußte das Vorliegen eines *N*-Glucuronids des 2-Aminopyridin angenommen werden. Auf der anderen Seite ist es bekannt, daß viele Amin-*N*-Glucuronide sehr unbeständig gegenüber Säuren sind (17, 18) und durch β -Glucuronidase nicht gespalten werden (18, 19). Eine nicht-enzymatische Spaltung eines Teils des möglicherweise vorliegenden *N*-Glucuronids oder eines anderen säurelabilen Konjugates während der Inkubationszeit (eine Woche bei pH 5,5) oder während der anschließenden Aufbereitung (Extraktion bei pH 1–2) kann nicht ausgeschlossen werden. Die Frage, ob es sich bei dem 2-Aminopyridin-Konjugat (Metabolit IV) um ein Glucuronid handelt, ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht sicher zu beantworten.

Danksagung

Der Firma Kali-Chemie Pharma GmbH (Hannover) für die freundliche Überlassung des Wirkstoffes und des Handelspräparates unseren aufrichtigen Dank.

Dem Verband der Chemischen Industrie e. V., Fonds der Chemischen Industrie, danken wir für die gewährte Unterstützung.

Literatur

1. Miller, L. D. (1962), *Toxikol. Appl. Pharmacol.* 4, 190–199.
2. Kato, K., Yoshida, K., Tatsumi, K. & Tsukamoto, H. (1962), *Chem. Pharm. Bull.* 10, 1238–1242.
3. Stahl, E. (1967), *Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.* Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
4. Petrowitz, H. J. & Pastuska (1962), *J. Chromatog.* 7, 128–130.
5. Auterhoff, H. & Kovar, K. A. (1973), *Identifizierung von Arzneistoffen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
6. Merck, E. (1972), *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie.* Darmstadt.
7. Goenechea, S. & R. Buttler (1968), *Z. analyt. Chem.* 239, 389–395.
8. Wotschokowsky, M. (1975), *Kontraste (Merck), Heft 1,* 14–22.
9. Cummins, L. M. & Perry, J. E. (1969), *J. Pharm. Sci.* 58, 762–763.
10. Tschitschibabin, A. E., Konowalova, R. A. & Konowalova, A. A. (1921), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 54, 814–822.
11. Graebe, C. (1872), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 4, 34–35.
12. Clerc, Th. & Pretsch (1973), *Kernresonanz-Spektroskopie, Teil I: Protonenresonanz.* Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt/M.
13. Beyer, K. H. (1975), *Biotransformation der Arzneimittel,* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
14. Evans, W. L. & Parkinson, Ch. R. (1913), *J. Am. Chem. Soc.* 1770–1774.
15. Hunaeus, P. & Zincke, Th. (1877), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 10, 1486–1491.
16. Zincke, Th. (1882), *Liebigs Ann. Chem.* 216, 286–323.
17. Axelrod, J., Inscoc, J. K. & Tomkins, G. M. (1957), *Nature* 179, 538–539.
18. Axelrod, J., Inscoc, J. K. & Tomkins, G. M. (1958), *J. Biol. Chem.* 232, 835–841.
19. Takitani, S. (1959), *Chem. Pharm. Bull.* 7, 845–848.

Prof. Dr. S. Goenechea
Institut für Gerichtliche Medizin
der Universität Bonn
Stiftsplatz 12
5300 Bonn