

c) mit Benzol + 1% Alkohol 83 mg VIII als farbloses Harz. Aus Benzol farblose Nadelchen. Smp. 218–220°.  $[\alpha]_D^{20} = -117^\circ$  ( $c = 0,5$  in Pyridin). KELLER'sche und VAN URK'sche Farbreaktion: negativ. IR.-Spektrum: Fig. 4. UV.-Spektrum: Maxima bei 213  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 4,33$ ), 258  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 3,85$ ) (Fig. 5). Rf-Wert im System tert. Amylalkohol/2-Benzyl-pyridin 1:1/Wasser, aufsteigend: 0,92.

$C_{17}H_{20}O_3N_2$  (300,4) Ber. C 68,0 H 6,7 O 16,0% Gef. C 68,2 H 6,6 O 16,0%

9. Reduktion von IIa zu 2-Oxo-2,3-dihydro-d-lysergsäure-diäthylamid (I). 2,1 g IIa wurden in 160 ml Eisessig und 105 ml Wasser mit 10 g Zinkstaub gekocht. Nach 3, 6 und 8 Std. fügte man nochmals je 2 g Zinkstaub hinzu und filtrierte nach 24 Std. vom unverbrauchten Zink ab. Bei der Aufarbeitung wie im Abschnitt 8 erhielt man 1,6 g gelbes Rohprodukt, das an 45 g Aluminiumoxyd chromatographiert wurde. Mit abs. Chloroform liess sich ein gelbes, nicht kristallisierbares Nebenprodukt abtrennen, worauf mit Chloroform +  $\frac{1}{4}$ % Alkohol die Verbindung I eluiert wurde. Aus Benzol farblose Nadelchen vom Smp. 235–237°. Ausbeute 160 mg.  $[\alpha]_D^{20} = +10^\circ$  (0,4 in Pyridin). IR.-Spektrum: Fig. 4. UV.-Spektrum in Methanol: Fig. 5; Maximum bei 256  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 4,06$ ).

$C_{20}H_{25}O_2N_3$  Ber. C 70,8 H 7,4 O 9,4 N 12,4%  
(339,4) Gef. „ 70,4 „ 7,9 „ 9,7 „ 12,3%

Während frisch bereitete Lösungen keine Fluoreszenz aufwiesen, zeigte die methanolische Lösung von I nach 10stündigem Stehen das gleiche Fluoreszenz-Spektrum wie die Naphtostyryl-Verbindung V ( $\lambda_{max}$  bei 542  $m\mu$  bei einer Anregungswellenlänge von 380  $m\mu$ ). Rf-Wert im System tert. Amylalkohol/2-Benzyl-pyridin 1:1/Wasser, aufsteigend: 0,92.

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. W. SCHÖNINGER) ausgeführt und die Spektren in unserer spektralanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. G. LEBMANN) aufgenommen.

### Zusammenfassung

Verschiedene Lysergsäure-Derivate wurden mit Calciumhypochlorit-Lösung zu den entsprechenden Dioxindol-Verbindungen oxydiert. Diese liessen sich mit Zinkstaub in Essigsäure zu Oxindol-Derivaten reduzieren. 2-Oxo-2,3-dihydro-d-lysergsäure-diäthylamid, ein biologisches Oxydationsprodukt von d-Lysergsäure-diäthylamid, konnte auf diesem Wege in reiner, kristallisierter Form gewonnen werden.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

## 88. Zum biochemischen Verhalten eines Psychoanaleptikums, des Phenyl-piperidyl-essigsäure-methylesters

von Karl Bernhard, U. Bühler und M. H. Bickel

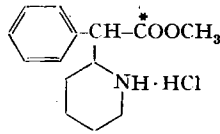
Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(13. III. 59)

Gewissen Piperidinderivaten ist eine zentralerregende Wirkung eigen, die ganz besonders beim  $\alpha$ -Phenyl- $\alpha$ -piperidyl-(2)-essigsäure-methylester ausgeprägt zur Geltung kommt. Letztere Verbindung hat daher unter der Bezeichnung *Ritalin*<sup>1)</sup> als zentrales Stimulans oder Psychoanaleptikum mit sehr vorteilhaften Eigenschaften bereits verbreitete Anwendung gefunden.

<sup>1)</sup> Schutzmarke der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel.

Wir haben uns im Rahmen seit längerer Zeit unternommener Untersuchungen über das Stoffwechselverhalten pharmakologisch wirksamer Verbindungen auch diesem Piperidinderivat zugewandt, indem uns eine kleine Menge eines in der Carboxyl-



gruppe <sup>14</sup>C-signierten Produktes zur Verfügung stand<sup>2)</sup>. Die vorteilhafte spezifische Aktivität erlaubte die orale Verabreichung sinnvoller Dosen in wässriger Lösung an Ratten. Dabei erwies sich die Expirationskohlendioxid solcher Tiere in Versuchen von 15- und 18stündiger Dauer völlig inaktiv. Im Harn konnte nach diesen Zeitintervallen der Hauptteil der applizierten Aktivität wieder aufgefunden werden (vgl. Tab. 1). Wie die renale Ausscheidung während 30 Std. verlief, geht aus Fig. 1 hervor.

Tabelle 1. *Aktivitäten in Harn und Faeces nach Gaben von 15 mg signiertem Phenyl-piperidyl-essigsäure-methylester an Ratten*

| Tier Nr.                             | 1                       | 2                       | 3                       |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Dauer, Std. . . . .                  | 15                      | 15                      | 15                      |
| Applizierte Aktivität c/min. . . . . | 2,31 · 10 <sup>7</sup>  | 2,20 · 10 <sup>7</sup>  | 2,20 · 10 <sup>7</sup>  |
| Ausscheidung                         |                         |                         |                         |
| Harn: Aktivität c/min. . . . .       | 16,5 · 10 <sup>6</sup>  | 17,3 · 10 <sup>6</sup>  | 18,8 · 10 <sup>6</sup>  |
| in % der appl. Aktivität . . . . .   | 71,5                    | 78,5                    | 85,3                    |
| Faeces: Aktivität c/min. . . . .     | 0,396 · 10 <sup>6</sup> | 0,332 · 10 <sup>6</sup> | 0,033 · 10 <sup>6</sup> |
| in % der appl. Aktivität . . . . .   | 1,71                    | 1,51                    | 0,15                    |
| Tier Nr.                             | 4                       | 5                       | 6                       |
| Dauer, Std. . . . .                  | 18                      | 30                      | 30                      |
| Applizierte Aktivität c/min. . . . . | 2,20 · 10 <sup>7</sup>  | 2,19 · 10 <sup>7</sup>  | 2,19 · 10 <sup>7</sup>  |
| Ausscheidung                         |                         |                         |                         |
| Harn: Aktivität c/min. . . . .       | 20,6 · 10 <sup>6</sup>  | 20,1 · 10 <sup>6</sup>  | 21,2 · 10 <sup>6</sup>  |
| in % der appl. Aktivität . . . . .   | 93,5                    | 91,9                    | 96,7                    |
| Faeces: Aktivität c/min. . . . .     | 0,008 · 10 <sup>6</sup> | 0,102 · 10 <sup>6</sup> | 0,048 · 10 <sup>6</sup> |
| in % der appl. Aktivität . . . . .   | 0,035                   | 0,46                    | 0,22                    |

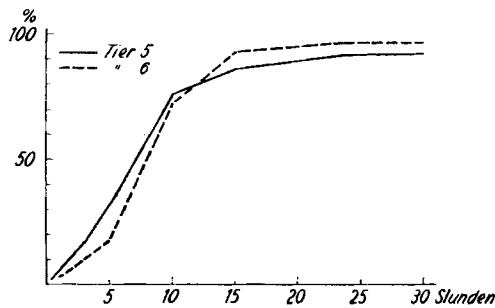


Fig. 1. *Renale Ausscheidung in % der appliz. Aktivität*

<sup>2)</sup> Wir verdanken die Synthese Herrn Prof. Dr. H. SCHMID, Chemisches Institut der Universität, Zürich.

Durch Radiochromatographie liessen sich im Harn drei Metaboliten (A, B und C), nicht aber unverändertes Ausgangsmaterial nachweisen. Die Auszählung der Chromatogramme führte zur folgenden prozentualen Verteilung: Metabolit A: 31%, B: 7%, C: 62%. Die Vermutung lag nahe, der Methylester erleide *in vivo* eine Umwandlung zur freien Säure, und es gelang zu zeigen, dass Metabolit C mit derselben identisch ist, also Phenyl-piperidyl-(2)-essigsäure darstellt. Metabolit A ist offenbar ein Glucuronsäure-Paarungsprodukt der Verbindung B, welche letztere demnach sowohl frei als gepaart zur Ausscheidung gelangt.

Die Tatsache, dass Ritalin vom Tierkörper nicht abgebaut, sondern geringfügig verändert wieder ausgeschieden wird, erleichtert auf Grund von Aktivitätsbestimmungen exakte Angaben über seine Verteilung in den verschiedenen Organen. Wir haben daher zwei Tiere nach 15 Std. getötet und in den lipidlöslichen und lipidfreien Anteilen aus einzelnen Organen Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Aus der Tab. 2 sind diese Ergebnisse ersichtlich.

Tabelle 2. *In den Organen nach 15 Std. nachweisbare Aktivitäten in % der applizierten Aktivität*

| Organ  | Tier 1 |      | Tier 2 |      |
|--|--------|------|--------|------|
|  | L      | R    | L      | R    |
| Leber. . . . .   | 0,20   | 0,16 | 0,27   | 0,27 |
| Niere . . . . .  | 0,11   | 0,11 | 0,08   | 0,18 |
| Gehirn und Rückenmark . . .                            | 0,07   | 0    | 0,09   | 0    |
| Magen-Darm-Tractus . . . . .                           | 0,27   | 0,45 | 0,17   | 0,42 |
| Dünndarm-Inhalt . . . . .                              | 0,07   | 0,31 | 0,08   | 0,60 |
| Carcass . . . . .                                      | 0,27   | 0    | 0,26   | 0    |
| L = lipidlösliche Anteile    R = lipidfreier Rückstand |        |      |        |      |

Besonderes Interesse kommt der Verteilung im Zentralnervensystem zu, welche wir kurzfristig nach erfolgter Aufnahme, d. h. nach 15, 30 und 60 Min. prüften. Darüber hinaus schienen uns, vor allem zu Vergleichszwecken, auch die entsprechenden Werte für das Blut und die Leber von Interesse. In der Tab. 3 sind die erhaltenen Befunde dargestellt.

Tabelle 3. *Spezifische Aktivitäten der verschiedenen Gehirn-Abschnitte, des Blutes und der Leber*  
c/min. mg

| Minuten nach Applikation             | 15  |     | 30  |     | 60  |     |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                      | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
| Tier                                 |     |     |     |     |     |     |
| Blut . . . . .                       | 645 | 440 | 120 | 142 | 99  | 152 |
| Leber. . . . .                       | 748 | 601 | 238 | 365 | 317 | 412 |
| Grosshirn-Hemisphären . . . .        | 490 | 525 | 99  | 92  | 76  | 117 |
| Stammhirn-Ganglien . . . . .         | 475 | 539 | 70  | 127 | 99  | 106 |
| Kleinhirn . . . . .                  | 398 | 385 | 59  | 47  | 45  | 54  |
| Brücke und <i>Medulla obl.</i> . . . | 308 | 300 | 66  | 56  | 50  | 46  |
| Rückenmark . . . . .                 | 270 | 245 | 40  | 26  | 5   | 25  |

**Experimentelles.** – Der Phenyl-piperidyl-(2)-essigsäure-methylester besass eine spez. Aktivität von  $3,0 \cdot 10^6$  c/min.mg und wurde den Versuchstieren, d. h. weissen Ratten im Gewichte von 250–280 g, in Mengen von 15 mg in wässriger Lösung mit der Schlundsonde gegeben. Die Tiere befanden sich zur genauen Erfassung der Ausscheidung (Exspirationskohlen säure, Harn, Faeces) während der ganzen Dauer des Versuches in Stoffwechsellkäfigen. Wir sammelten den Harn quantitativ und brachten ihn auf ein bekanntes Volumen. Nach erfolgter Tötung wurden die zu untersuchenden Organe nach Homogenisierung in Aceton eingetragen und später mit Äther bzw. Petroläther extrahiert. Damit erhielten wir eine Abtrennung der lipidlöslichen Anteil. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten nach Verbrennung der Proben im Gaszählrohr, im Falle der Exspirationskohlen säure im ausgefällten Bariumcarbonat.

Papierchromatographic des Harnes: eine Sichtbarmachung der einzelnen Flecken durch Farbreaktion ist nicht, oder nur unvollkommen, durch Ninhydrin gelungen. Die Auftrennung bzw. der Nachweis einzelner Metaboliten vollzog sich auf Grund der Aktivität. In Isopropanol-Chloroform-Ammoniak (5:2:3) erfolgte aufsteigend eine Trennung, wobei folgende Rf-Werte gemessen und prozentuale Verteilungen ermittelt wurden:

| Chromatogramm | Metabolit A |        | Metabolit B |        | Metabolit C |        |
|---------------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
|               | Rf          | Anteil | Rf          | Anteil | Rf          | Anteil |
| 1             | 0,34        | 35     | 0,72        | 5      | 0,85        | 60     |
| 2             | 0,32        | 32     | 0,70        | 6      | 0,82        | 62     |
| 3             | 0,30        | 28     | 0,70        | 9      | 0,83        | 63     |



Fig. 2. Aktivitäts-Verteilung im Harn nach Chromatographie

Unverändertes Ausgangsmaterial lag im Harn nicht vor (vgl. Fig. 2). Wir haben 90 mg «inaktives» und 10 mg signiertes Ritalin zusammen mit 3 ml 1-n. HCl ca. 3 Std. bei  $105^\circ$  verseift. Den Rückstand lösten wir in sehr wenig Äthanol und fügten 3 ml Essigester hinzu, worauf die Phenyl-piperidyl-essigsäure auskristallisierte. Nach mehrmaligem Umkristallisieren haben wir die reine Säure (spezifische Aktivität  $4,10 \cdot 10^6$  c/min. mg, Rf 0,82) in Mengen von 25 mg einer Ratte verabreicht. Das Harnchromatogramm zeigte nur *einen* aktiven Fleck, mit dem für die freie Säure charakteristischen Rf-Wert. Nach Gaben inaktiver Säure an einen Hund (täglich 1,5 g) gelang ihr Nachweis in den alkoholischen Harnextrakten, die beiden andern Metaboliten A und B konnten nicht aufgefunden werden, da weder mit Ninhydrin, Universalindikator oder dem Fe-Salz der Hydroxamsäure farbige Flecken entstanden. Die Phenyl-piperidyl-essigsäure erfährt also offenbar auch im Hundeorganismus keine Veränderungen.

Wir haben in der Folge acht Ratten je 15 mg Ritalin (30 mg des inaktiven und 2 mg des aktiven Präparates) verabreicht und den Harn während 24 Std. gesammelt. Er wurde gesamthaft als Streifenchromatogramm auf 20 Papierbogen aufgetragen. Nach der Entwicklung mit einem Gemisch Butanol, Eisessig und Wasser wurden die den drei Metaboliten entsprechenden Zonen ausgeschnitten. Eine Isolierung nach Eluierung gelang aber nicht. Das Eluat von Metabolit A wurde mit KOH-Lösung verseift. Nach Neutralisieren mit  $\text{HClO}_4$  und Entfernung der Salze ergab

die Papierchromatographie drei Aktivitätsmaxima abnehmender Intensität (Rf 0,2; 0,6; 0,73), liess aber keinen Metaboliten A mehr erkennen. Dieses Verhalten berechtigt zur Annahme, A könnte ein Paarungsprodukt von Metabolit B (Rf 0,72) evtl. mit Glucuronsäure sein.

### Diskussion der Ergebnisse

Perorale Gaben des in der Carboxylgruppe  $^{14}\text{C}$ -signierten Methylesters der Phenylpiperidyl-(2)-essigsäure an Ratten liessen keinerlei Aktivität in der Expirationskohlendensäure im Verlaufe eines 30 Std. dauernden Versuches erkennen. Die Verbindung wird nicht abgebaut, vielmehr nur geringfügig verändert, schon in kurzer Zeit grösstenteils wieder ausgeschieden. Es lässt sich eine Halbwertszeit von 7–8 Std. berechnen. Nach 15 Std. konnten in der Leber, der Niere, im Gehirn und Rückenmark, im Dünndarminhalt und im Carcass nur 2,0 bzw. 2,42% der applizierten Aktivität nachgewiesen werden, die sich zu 49% bzw. 40% auf die lipidlöslichen Anteile verteilen. Im Harne lagen nach 30 Std. 91,9 und 96,7% der Aktivität vor, in den Faeces 0,46% und 0,22% und im Intestinaltractus 1,18% und 2,10%, zusammen demnach 93,5 und 99%. Im Carcass war nach dieser Zeit keine Aktivität mehr nachweisbar, weder in den lipidlöslichen Anteilen noch im Rückstand.

Kurzfristige Untersuchungen ermöglichten interessante Einblicke in die Verteilung der Verbindung im Zentralnervensystem (ZNS), im Blut und in der Leber. Die Mittelwerte aus je zwei Versuchen sind folgende:

| Zeitspanne nach Applikation      | 15 Min. |      | 30 Min. |      | 60 Min. |      |
|----------------------------------|---------|------|---------|------|---------|------|
|                                  | spez.   | in % | spez.   | in % | spez.   | in % |
| Blut . . . . .                   | 543     |      | 131     |      | 125     |      |
| Leber. . . . .                   | 675     | 5,97 | 302     | 2,12 | 364     | 3,13 |
| Grosshirn-Hemisphären . .        | 508     |      | 95      |      | 97      |      |
| Stammhirn-Ganglien . . .         | 507     |      | 99      |      | 103     |      |
| Kleinhirn . . . . .              | 392     |      | 53      |      | 50      |      |
| Brücke und <i>Medulla obl.</i> . | 304     |      | 61      |      | 48      |      |
| Rückenmark . . . . .             | 258     |      | 33      |      | 15      |      |
| ZNS total. . . . .               |         | 0,8  |         | 0,12 |         | 0,13 |

Demnach sind nach 15 Min. die spezifischen Aktivitäten im Gross- und Stammhirn etwas geringer als im Blute und ungefähr um einen Viertel tiefer als in der Leber. Bereits nach 30 Min. ist ein starker Abfall der Aktivität in diesen Gehirnabschnitten auf etwa einen Fünftel feststellbar, Werte, die aber auch nach 60 Min. noch angetroffen wurden. Desgleichen ist die anfänglich im Blute stark zurückgehende Aktivität nach 1 Std. noch nahezu gleich wie nach 30 Min. Auch für die übrigen Teile des Zentralnervensystems ist die Abnahme innerhalb 15 und 30 Min. sehr ausgeprägt, in der folgenden halben Std. aber nicht mehr wesentlich. Die Aktivitäten im Zentralnervensystem in Prozenten der applizierten Aktivität sind nur gering und gehen von 0,8% nach 15 Min. auf 0,1% nach 30 bzw. 60 Min. zurück.

Ausgesprochen verschieden ist die Aktivitäts-Verteilung in den einzelnen Gehirnpartien. Die höchsten Werte fanden wir im Grosshirn und Stammhirn, geringere im Kleinhirn und in der *Medulla oblongata* und die kleinsten im Rückenmark. Diese Befunde sind eine experimentelle Stütze für die Vorstellung, ein zentrales Psychoanaleptikum wie Ritalin, das beim Tier ersichtlich die Motorik und die Sensibilität

steigert, greife in erster Linie an den primären und übergeordneten Zentren der Motorik und der Sinneseindrücke an.

Interessant erscheint die Beobachtung, dass die spezifischen Aktivitäten beim Wirkungseintritt, d. h. nach etwa 15 Min., für das Gross- und Stammhirn etwa fünfmal, für das Rückenmark aber rund achtmal grösser sind als beim ersichtlichen Wirkungsmaximum des Pharmakons, d. h. nach 30 bis 60 Min.

$\alpha$ -Phenyl- $\alpha$ -piperidyl-essigsäure-methylester wird im Organismus sehr rasch verseift, d. h. in die unwirksame Säure übergeführt, die einem weiteren Abbau nicht mehr zugänglich ist und als leicht wasserlösliche Verbindung zur Ausscheidung gelangt. Unverändertes Ausgangsmaterial war im Harn nicht enthalten, der indessen einen weiteren, offenbar in gepaarter Form auftretenden Metaboliten enthielt. Er dürfte sich aber von der Säure nur geringfügig unterscheiden und stellt vielleicht eine hydroxylierte Verbindung dar, deren Paarung z. B. mit Glucuronsäure verständlich wäre.

### *Zusammenfassung*

$\alpha$ -Phenyl- $\alpha$ -piperidyl-(2)-essigsäure-methylester oder Ritalin wird nach Gaben an Ratten hydrolytisch gespalten und grösstenteils als Phenyl-piperidyl-essigsäure im Harn ausgeschieden. Es liess sich eine Halbwertszeit von 6–7 Std. berechnen. Schon nach 15 Std. sind in den Organen und im Carcass nur noch sehr geringfügige Aktivitäten nachweisbar.

Kurzfristige Versuche (15, 30 und 60 Min.) ergaben Auskunft über die Verteilung der Verbindung in der Leber, im Blute und in den einzelnen Gehirnabschnitten. Die spezifischen Aktivitäten sind im Gross- und Stammhirn stets höher als im Kleinhirn, der *Medulla oblongata* und im Rückenmark.

Physiologisch-Chemische Anstalt der Universität, Basel

## 89. Konstitution des Resibufogenins<sup>1)</sup>

Über Krötengifte, 17. Mitteilung<sup>2)3)</sup>

von **Horst Linde** und **Kuno Meyer**

Herrn Prof. Dr. PAUL KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(13. III. 59)

Bei der chromatographischen Aufteilung von Chloroformextrakten aus der chinesischen Krötengiftdroge Ch'an Su waren jeweils gleich zu Beginn reichliche Mengen eines «Harzes» isoliert worden, aus dem erst nach Acetylierung Kristalle gewonnen werden konnten<sup>4)</sup>. Das dieser kristallisierten Acetylverbindung zugrunde-

<sup>1)</sup> Verschiedene Ergebnisse der hier mitgeteilten Untersuchungen waren Gegenstand einer kurzen Mitteilung: H. LINDE & K. MEYER, *Experientia* **14**, 238 (1958).

<sup>2)</sup> 2. Teil der Dissertation H. LINDE, die demnächst erscheint.

<sup>3)</sup> 15. Mitt.: J. P. RUCKSTUHL & K. MEYER, *Helv.* **41**, 2121 (1958); siehe auch<sup>5)</sup>.

<sup>4)</sup> Nähere Einzelheiten und Zusammenstellung der einschlägigen Literatur siehe K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952).