

Synthese von [3-<sup>14</sup>C]- und [Phenyl-U-<sup>14</sup>C] Olaquinox

W. Maul, D. Scherling and F. Seng

Aus den Forschungslaboratorien der BAYER AG Wuppertal und Leverkusen

S U M M A R Y

Olaquinox is a new feed additive. [<sup>14</sup>C]Olaquinox, labelled in different positions, was needed for tracer-studies of pharmacokinetics, biotransformation and residues in several species of animals.

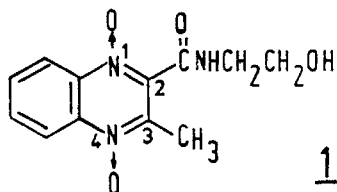
2- [N-(2-hydroxyethyl)-carbamoyl] -3-methyl-[3-<sup>14</sup>C]quinoxaline-1,4-dioxide ([3-<sup>14</sup>C]Olaquinox) was synthesized from barium[<sup>14</sup>C]carbonate (22 mmoles; 1.15 Ci) via [1-<sup>14</sup>C]acetic acid, sodium[1-<sup>14</sup>C]acetate, [1-<sup>14</sup>C]acetylchloride, ethyl[3-<sup>14</sup>C]acetoacetate and 2-carbethoxy-3-methyl-[3-<sup>14</sup>C]quinoxaline-1,4-dioxide with an overall yield of 10%, based on barium[<sup>14</sup>C]carbonate. The radiochemical purity was better than 98% (tlc). The specific activities of three preparations were 10.5, 8.4 and 5.45 μCi/mg respectively.

[phenyl-U-<sup>14</sup>C]Olaquinox was synthesized starting from [U-<sup>14</sup>C]aniline (19.8 mmoles; 284.4 mCi). Intermediate products were N-acetyl[U-<sup>14</sup>C]aniline, 2-nitro-N-acetyl[U-<sup>14</sup>C]aniline, 2-nitro[U-<sup>14</sup>C]aniline and [U-<sup>14</sup>C]benzofurazan-oxide. The total yield was 50% as calculated for [U-<sup>14</sup>C]aniline. At calibration samples of two preparations showed specific activities of 49.5 and 11.1 μCi/mg respectively. The radiochemical purity was checked by tlc and exceeded 98%.

Key words: synthesis, carbon-<sup>14</sup>C, Olaquinox, feed additive

Korrespondenzanschrift: BAYER AG  
Isotopenlabor Chemie  
im Inst. f. Pharmakokinetik  
Friedrich-Ebert-Str. 217  
D5600 Wuppertal 1

Olaquinox (=1;2- [N-(2-Hydroxyethyl)-carbamoyl]-3-methyl-chinoxalin-1,4-dioxid; BAYO-N-OX<sup>R</sup>; BAY Va 9391) wurde von K. Ley et al. <sup>(1)</sup> synthetisiert. Die Verbindung gehört chemisch zu den Chinoxalin-di-N-Oxiden. Sie besitzt antibakterielle Eigenschaften und wird zur Verbesserung von Wachstum und Futterverwertung in der Tieraufzucht und Mast eingesetzt <sup>(2)</sup>. Das antibakterielle Wirkungsspektrum von Olaquinox umfaßt gramnegative und grampositive Bakterien. Gramnegative Bakterien (E. Coli, Salmonella, Shigella, Proteus, etc.) sind besonders empfindlich.



1

Für Untersuchungen der Pharmakokinetik, der Biotransformation und des Rückstandsverhaltens bei verschiedenen Tierarten wurde radioaktiv markiertes Olaquinox benötigt. Wir entschieden uns zur Einführung von radioaktivem Kohlenstoff <sup>14</sup>C als

Traceratom in die 3-Position des heterocyclischen Ringsystems, da diese Stellung präparativ relativ leicht zugänglich war, und wir einen metabolischen Abbau zu einem kleinen Bruchstück für unwahrscheinlich hielten.

Die Synthese von [3-<sup>14</sup>C]Olaquinox verlief nach Schema A.

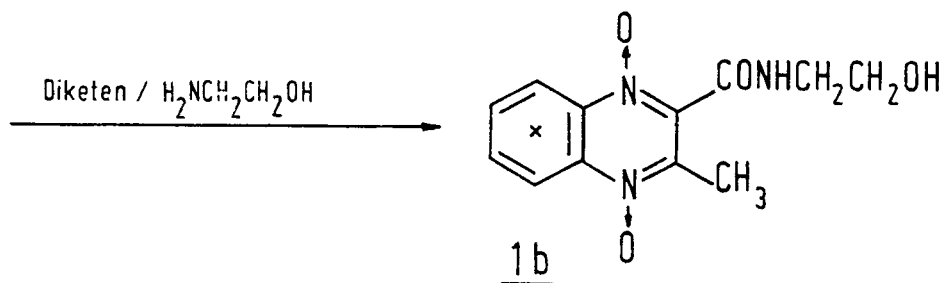
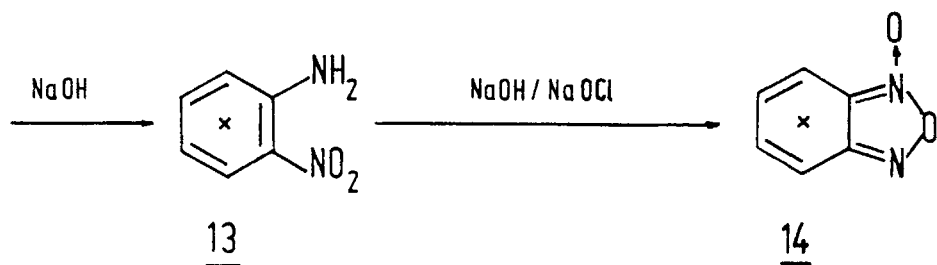
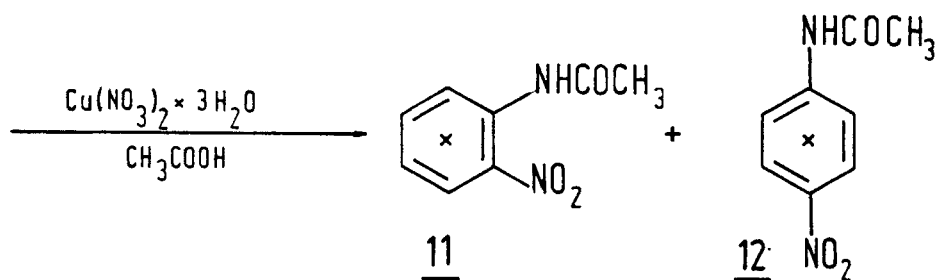
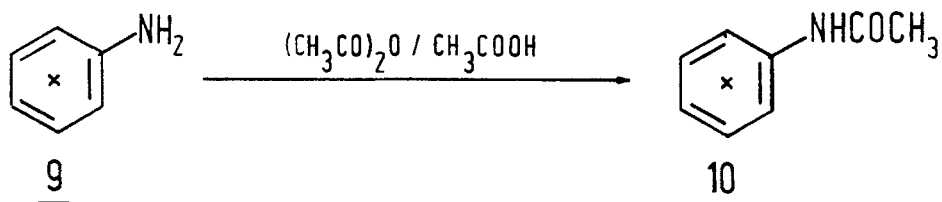
Die Reaktionssequenz zum [3-<sup>14</sup>C]Acetessigsäureethylester (7) erfolgte nach bekannten Literaturvorschriften <sup>(3,4)</sup>. Die Darstellung von Acetylchlorid (6) und die nachfolgende Umsetzung zum β-Ketoester wurden apparativ verbessert (s. Skizze im Exp. Teil). Die Kondensation von Benzofuroxan mit Enolatanionen ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden <sup>(5-7)</sup>; die Ausbeute lag allerdings nur bei 41% d. Th. (vgl. <sup>(7)</sup> mit 40% d. Th.). Die Umsetzung mit Ethanolamin führte in sehr guter Ausbeute zum Endprodukt.

Nach Durchführung der ersten tierexperimentellen Untersuchungen wurden uns Publikationen bekannt, die darauf hinwiesen, daß substituierte Chinoxalin-1,4-dioxide unter bestimmten Bedingungen sowohl chemisch <sup>(8,9)</sup>, als auch photochemisch <sup>(10)</sup>, thermisch <sup>(11)</sup> und metabolisch <sup>(12)</sup> unter Ringverengung und Elimination des Kohlenstoffatoms der Position 3 in die entsprechenden Benzimidazol-Derivate übergeführt werden können.

<sup>R</sup> eingetragenes Warenzeichen der BAYER AG, Leverkusen



## Schema B



Um eine Verfälschung der tierexperimentellen Ergebnisse durch eine derartige Ringkontraktion im Falle des Olaquinox ausschließen zu können, wurde eine zusätzliche Markierung im homocyclischen Teil der Verbindung durchgeführt.

Die Synthese von [phenyl-U-<sup>14</sup>C]Olaquinox ist im Schema B wiedergegeben.

Ausgangspunkt der Synthese war [U-<sup>14</sup>C]Anilin (9), das ausgehend von Barium[<sup>14</sup>C]carbonat mit einer Ausbeute von 83% über die Zwischenstufen Calcium[<sup>14</sup>C]carbid, [<sup>14</sup>C<sub>2</sub>]Acetylen, [U-<sup>14</sup>C]Benzol (13) und Nitro[U-<sup>14</sup>C]benzol (14) synthetisiert worden war. Nach Acetylierung wurde Acet[U-<sup>14</sup>C]anilid (10) mit Kupfer(II)nitrat (15) in ein Gemisch von 2- und 4-Nitroacet[U-<sup>14</sup>C]anilid übergeführt. Nach Trennung der beiden Isomeren wurde 2-Nitro-acet[U-<sup>14</sup>C]anilid (11) alkalisch zu 2-Nitro[U-<sup>14</sup>C]anilin (13) verseift und ohne weitere Isolierung mit Chlorlauge zu [U-<sup>14</sup>C]Benzofuroxan (14) oxidiert (16). Die Reaktion von Benzofuroxan mit Ethanolamin und Diketen in Methanol führte in einer Eintopf-Reaktion zum Endprodukt.

### Experimenteller Teil

#### Synthese von [3-<sup>14</sup>C]Olaquinox

[3-<sup>14</sup>C]Acetessigsäureethylester (7) wurde nach allgemein bekannten Literaturangaben (3,4) hergestellt. Insgesamt wurden 1,153 Ci Barium[<sup>14</sup>C]Carbonat (2) - spezifische Aktivität 56 mCi/mol nach Angaben der Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst - zu Natrium[1-<sup>14</sup>C]acetat (5) umgesetzt. Die Reaktion zum β-Ketoester 7 erfolgte in zwei Ansätzen:

Somit standen 1,963 g (15,1 mmol = 258 mCi) und 1,338 g (10,3 mmol = 307 mCi) zur Verfügung.

2-Carboethoxy-3-methyl-[3-<sup>14</sup>C]chinoxalin-1,4-dioxid (8)

1,963 g [3-<sup>14</sup>C]Acetessigsäureethylester (15,1 mmol) und 2,464 g Benzofuroxan (18,1 mmol) wurden in Gegenwart von 0,9 ml Ethanolamin (15,1 mmol) in 6 ml Methanol unter Rühren und Lichtausschluß 15 Stunden auf 50 °C erhitzt. Nach 6 Stunden bei 5 °C wurden die Kristalle abfiltriert, mit 7,5 ml Ether/Methanol (2+1) und 7,5 ml Ether gewaschen und auf der Nutsche trocken gesaugt. 1,537 g (Ausbeute 41%) wurden isoliert, die ohne weitere Reinigung zur letzten Stufe eingesetzt wurden.

[3-<sup>14</sup>C]Olaquinox (1a)

1,537 g 2-Carboethoxy-3-methyl-[3-<sup>14</sup>C]chinoxalin-1,4-dioxid (6,2 mmol) wurden in Gegenwart von 1,9 ml Ethanolamin (31 mmol) in 4,35 ml Methanol unter Rühren und Lichtausschluß 42 Stunden auf 50 °C erhitzt. Nach 5 Stunden bei 5 °C wurden die gelben Kristalle abfiltriert, mit 5 ml Methanol und 15 ml Chloroform gewaschen. 1,395 g (Ausbeute 85,6%) wurden isoliert.

Eine zweite Synthese wurde ausgehend von 1,338 g [3-<sup>14</sup>C]Acetessigsäureethylester wie oben beschrieben mit einer Ausbeute von insgesamt 575,5 mg durchgeführt.

Reinigung: Beide Ansätze von [3-<sup>14</sup>C]Olaquinox wurden mit nicht markiertem Material vereinigt. Die Reinigung erfolgte durch Verteilung zwischen Wasser und Chloroform und nachfolgender Umkristallisation aus Wasser: 2,766 g (13,053 g) [<sup>14</sup>C]Olaquinox wurden in 270 ml (1,3 l) dest. Wasser bei 60 °C gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die wäßrige Lösung dreimal mit je 270 ml (1,3 l) Chloroform extrahiert. Die wäßrige Phase wurde zur Trockne eingedampft (50 °C; 20 mbar); der Rückstand (ca. 2 g bzw. 8 g) wurde aus 40 ml (160 ml) siedendem dest. Wasser umkristallisiert. Nach 24 Stunden bei 4 °C wurden die Kristalle isoliert, mit 5 ml (20 ml) dest. Wasser und 15 ml (60 ml) Methanol gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 1,964 g (spez. Aktivität 10,5 µCi/mg) bzw. 7,252 g (spez. Aktivität 5,45 µCi/mg) [3-<sup>14</sup>C]Olaquinox.

Reinheitsprüfung:

Die Reinheitsprüfung erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (20 x 20 cm; E. Merck, Darmstadt) durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie in Chloroform-Methanol (8+2; Rf-Wert 0,45). Nach dem Auskratzen der autoradiographisch nachgewiesenen radioaktiven Kieselgelzonen wurde der Aktivitätsgehalt - nach Verbrennung zu [<sup>14</sup>C] Kohlendioxid - durch Liquid-Szintillations-Messung bestimmt. Die Auswertung ergab eine radiochemische Reinheit von mehr als 98%. Aus den Mutterlaugen und den Chloroformextrakten wurden nach Reinigung durch Verteilung und Umkristallisation noch 6,787 g (spez. Aktivität 8,4 µCi/mg; radiochemische Reinheit ca. 99%) [3-<sup>14</sup>C]Olaquinox isoliert.

Synthese von [phenyl-U<sup>14</sup>C]Olaquinox2-Nitro-acet[U-<sup>14</sup>C]anilid (11)

Aus vorhandenen Beständen an [U-<sup>14</sup>C]Anilin (9, als Salz der Schwefelsäure) wurden vereinigt:

1,662 g (gemessene spezifische Aktivität: 78,3 µCi/mg)

2,115 g (gemessene spezifische Aktivität: 72,9 µCi/mg)

Im Scheidetrichter wurde obiges Anilinsulfat (284,3 mCi) mit 10 ml 15%-iger Natronlauge versetzt und die wäßrige Lösung mit 60 ml Diethylether extrahiert. Die wäßrige Phase wurde verworfen, die etherische Phase getrocknet (Natriumsulfat), in einen Rundkolben übergeführt und unter Rühren im Vakuum vorsichtig eingeeengt. Der Rückstand wurde in 13,3 ml Eisessig aufgenommen und mit 17,02 ml Acetanhydrid versetzt. Nach Temperaturanstieg auf ca. 40 - 50 °C (innen) wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

In die gekühlte Lösung wurden 8,233 g Kupfer(II)nitrat x 3 H<sub>2</sub>O (34,1 mmol) über 60 Minuten unter Rühren (Magnetrührer) eingetragen, wobei die Innentemperatur durch Kühlung mit einem Eisbad bei 15 - 17 °C gehalten wurde. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde 30 Minuten nachgerührt. Durch Zugabe von 133 ml dest. Wasser wurde das Isomerengemisch aus 2- und 4-Nitro-acet[U-<sup>14</sup>C]anilid gefällt. Nach Zusatz von 180 ml Dichlormethan wurde das Gemisch in einen Scheidetrichter übergeführt, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase noch dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden getrocknet (Natriumsulfat); auf

180 ml eingeeengt, eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt und die beginnende Kristallisation von 4-Nitro-acet [ $U-^{14}C$ ]anilid (12) durch Zugabe von 270 ml n-Hexan vervollständigt.

4-Nitro-acet [ $U-^{14}C$ ]anilid (12) wurde abfiltriert, auf der Nutsche mit n-Hexan gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet: 821 mg (12) mit einer gemessenen spez. Aktivität von 73,7  $\mu Ci/mg$  (ges. 60,51 mCi = 21,3% Ausbeute bezogen auf eingesetztes Anilinsulfat).

Das Filtrat wurde auf ein Volumen von 150 ml eingeeengt, in der Hitze mit Aktivkohle geklärt und filtriert. Beim weiteren Einengen auf ein Volumen von 100 ml begann spontan die Kristallisation; die Kristalle wurden zur Vervollständigung der Kristallisation über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, anschließend abfiltriert und getrocknet: 2,489 g 2-Nitro-acet [ $U-^{14}C$ ]anilid (11) (183,5 mCi = 64,5% Ausbeute bezogen auf eingesetztes [ $U-^{14}C$ ]Anilinsulfat). Die dünnschichtchromatographisch (Essigester-n-Hexan 1+1) mit anschließendem Radioscan ermittelte radiochemische Reinheit betrug ca. 98%.

#### [ $U-^{14}C$ ]Benzofuroxan (14)

2,489 g 2-Nitroacet [ $U-^{14}C$ ]anilid (11; 13,8 mmol) wurden mit 30 ml 5%-iger Natronlauge bei 90 °C Innentemperatur 1 Stunde gerührt, anschließend auf 60 °C abgekühlt und nach Zugabe von 11 ml Chlorlauge (157 g Chlor/l) weitere 3 Stunden nachgerührt. Beim Abkühlen im Eisbad verfestigte sich das gebildete gelbe Öl, wurde von der wäßrigen Reaktionslösung abgetrennt und nacheinander mit 10 ml Eiswasser, 5 ml 1N Salzsäure und 10 ml Eiswasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Kaliumhydroxid im Vakuum wurden 1,754 g [ $U-^{14}C$ ]Benzofuroxan (14) (93,4% d. Th.) erhalten.

#### 2- N-(2'-Hydroxyethyl)-carbamoyl -3-methyl-[phenyl- $U^{14}C$ ]chinoxalin-1,4-dioxid (1b)

Zu einer Lösung von 2 g Ethanolamin (1,96 ml; 32,8 mmol) in 11 ml Methanol wurden zwischen 0 - 10 °C unter Rühren 1,73 ml frisch destilliertes Diketen getropft. Bei Zimmertemperatur wurden 1,754 g [ $U-^{14}C$ ]Benzofuroxan (12,9 mmol) gelöst in 1,9 ml Dimethylformamid auf einmal hinzugefügt. Nach 30 Minuten Rühren wurde angeimpft und 70 Stunden stehengelassen. Nach dem Absaugen wurde zunächst mit kaltem Methanol, dann mit Tetrachlormethan und n-Hexan gewaschen



und die gelben Kristalle auf der Nutsche trockengesaugt: Rohausbeute 2,989 g. Zur Reinigung des Rohprodukts wurde in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und 70 Stunden kontinuierlich mit Tetrachlormethan extrahiert. Die wäßrige Lösung, die das gereinigte Produkt enthielt, wurde bei ca. 40<sup>o</sup> Badtemperatur im Vakuum-Rotationsverdampfer unter Lichtschutz eingedampft: 2,592 g reines <sup>14</sup>C-markiertes Olaquinox. Die gemessene spezifische Aktivität betrug 49,5 µCi/mg. (Radiochemische Gesamtausbeute: 46% berechnet für eingesetztes [U-<sup>14</sup>C] Anilinsulfat).

Die Tetrachlormethan-Lösung wurde gemeinsam mit allen wäßrigen Mutterlaugen (aus Voransätzen) nach Zugabe von 1 g nicht-radioaktivem Olaquinox zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in dest. Wasser aufgenommen und wie oben beschrieben mit Tetrachlormethan extrahiert. Nach Aufarbeitung wurden 1,092 g Reinsubstanz mit einer spez. Aktivität von 11,1 µCi/mg isoliert. Die radiochemische Gesamtausbeute erhöhte sich dadurch auf 142,9 mCi (= 50,2% bezogen auf eingesetztes [U-<sup>14</sup>C] Anilinsulfat).

#### Reinheitsprüfung:

Die Reinheitsprüfung erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 (20 x 20 cm; E. Merck, Darmstadt) und zwar in folgenden Fließmittelsystemen:

eindimensional: Chloroform-Methanol 8+2 (v+v)

zweidimensional: 1. Chloroform-Methanol 8+2 (v+v)

2. Dioxan-Wasser 85+15 (v+v)

Die Detektion der radioaktiven Flecken erfolgte durch DC-Scanner II (Berthold - Frieseke) sowie Autoradiographie mit Agfa-Curix-clearbase-Film. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels nachgeschalteter Integrationseinheit zum DC-Scanner. Darüberhinaus wurde die gesamte Kieselgelfläche (eindimensionale Laufstrecke von Start bis Fließmittelfront) anhand des autoradiographischen Bildes in 9 Zonen aufgeteilt, deren Radioaktivitätsgehalt in Instagel/Wasser 10+4 durch LS-Messung bestimmt wurde. Daraus errechnete sich die radiochemische Reinheit zu mindestens 98,3%.

Autoradiographisch ließen sich neben einer schwachen Radioaktivitätszone am Start zwei weitere schwach aktive Verbindungen mit größerem R<sub>f</sub>-Wert als Olaquinox nachweisen.

Literaturverzeichnis:

- (1) K. Ley, U. Eholzer, R. Nast, K.G. Metzger u. D. Fritsche; S.African 68 6,099, 26 Feb.1969, Ger.Appl. 04 Oct.1967 cf. C.A. 71: P 91528 h
- (2) K.Bronsch, D. Schneider u. F. Rigal-Antonelli; Z.Tierphysiol., Tierernähr., Futtermittelkd. 36, 211 u. 241 (1976)
- (3) A.Murray III u.D.L.Williams;"Organic Synthesis with Isotopes"; Teil I, Interscience, New York 1958, S. 34
- (4) M.Calvin, C.Heidelberger, J.C.Reid,B.M.Tolbert u. P.E.Yantewitch; "Isotopic Carbon", Wiley, New York 1949, S. 179 u. 193
- (5) C.H. Issidorides u.M.J.Haddadin; J.Org.Chem. 31, 4067 (1966)
- (6) W. Dürkheimer; Liebigs Ann.Chem. 756, 145 (1972)
- (7) K. Ley u. F. Seng; Synthesis 1975, 415
- (8) E.C. Taylor u. A. McKillop; J.Org.Chem. 30, 2858 (1965)
- (9) A. Rudolph, R.A.Abramovitch u.B.W.Cue, Jr.;Heterocycles 1, 227 (1973)
- (10) M.J. Haddadin u.C.H. Issidorides;ibid.4, 767 (1976)
- (11) J.P. Dirlam, B.W.Cue,Jr. u.K.J. Gombatz;J.Org.Chem.43,76 (1978)
- (12) D.E.Case, P.R.Reeves u.B.Shuker:Xenobiotika 7,105 (1977)
- (13) K. Schmid, H. Fürer u. G. Dändziker in: Advances in Tracer Methodology", Vol.3, s. 37-44; Editor: S. Rothschild; Plenum-Press, New York, N.Y. - 1966
- (14) Unveröffentlichte Resultate
- (15) Y. Soeda, D. Takiguchi, S. Kosaka u. T. Naguchi; J.Agr. Food Chem. 20, 940 (1972)
- (16) F.B.Mallory; Org.Synth.Coll.Vol IV.74 (1963)