

**Sabine Paris**

**In vitro Untersuchungen  
zur stereoselektiven Biotransformation des  
Antihistaminikums/Antiasthmatikums Flezelastin**

**1996**

Pharmazeutische Chemie

**In vitro Untersuchungen  
zur stereoselektiven Biotransformation des  
Antihistaminikums/Antiasthmatikums Flezelastin**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Sabine Paris**  
aus Dortmund

-1996-

Dekan:

Prof. Dr. F.-K. Holtmeier

Erster Gutachter:

Prof. Dr. G. Blaschke

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. B. Unterhalt

Tag der mündlichen Prüfungen:

5.7., und 8.2.1996

Tag der Promotion:

8.2.1996

# Inhaltsverzeichnis

## Theoretischer Teil

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Eigenschaften und Biotransformation</b>	<b>5</b>
2.1	Eigenschaften	5
2.2	Pharmakokinetische Daten und Biotransformation	5
<b>3</b>	<b>Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels HPLC an chiralen stationären Phasen</b>	<b>8</b>
3.1	Enantiomerentrennung von Flezelastin	8
3.1.1	Chiral AGP <sup>®</sup>	8
3.1.2	Resolvosil-BSA-7 <sup>®</sup>	10
3.1.3	Chiralcel OD <sup>®</sup>	11
3.1.4	Chiralcel OD-R <sup>®</sup>	12
3.1.5	Chiralpak AD <sup>®</sup>	13
3.1.6	Säulen ohne Trennergebnis	14



---

3.2	Enantiomerentrennung von Desphenethylflezelastin	15
3.2.1	Chiralpak AD <sup>®</sup>	15
3.2.2	Weitere getestete Säulen	16
3.2.3	Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere von Desphenethylflezelastin	16
3.3	Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten	17
3.3.1	Chiralpak AD <sup>®</sup>	17
3.3.2	Chiral AGP <sup>®</sup>	18
3.4	Überprüfung der Enantiomerenreinheit des Flezelastins	19
<b>4</b>	<b>Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels Kapillarzonenelektrophorese</b>	<b>20</b>
4.1	Enantiomerentrennung von Flezelastin	20
4.2	Gleichzeitige Enantiomerentrennung von Flezelastin, Desphenethyl- flezelastin und des Carboxymetaboliten	21
<b>5</b>	<b>Achirale chromatographische Bestimmung von Fleze- lastin und seiner Metaboliten aus biologischer Matrix</b>	<b>24</b>
5.1	Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Verfahrens	24
5.2	Wahl des internen Standards	25
5.2.1	Wahl des internen Standards für die UV-Detektion	26
5.2.2	Wahl des internen Standards für die Fluoreszenzdetektion	26
5.3	Extraktionsverfahren	27
5.3.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	27
5.3.2	Festphasenextraktion	28

---

5.4	Validierung des analytischen Verfahrens	28
5.4.1	Validierung der Analytik mit UV-Detektion	29
5.4.1.1	Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion	29
5.4.1.2	Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion	31
5.4.2	Validierung der Analytik mit Fluoreszenzdetektion	33
5.4.2.1	Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion	33
5.4.2.2	Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion	35
5.4.3	Nachweisgrenze	37
<b>6</b>	<b>In vitro Untersuchungen zum Metabolismus des Flezelastins mit Hilfe von Leberzellfraktionen verschiedener Spezies</b>	<b>38</b>
6.1	Herstellung und Charakterisierung der Leberhomogenate	38
6.2	Inkubationsbedingungen	40
6.2.1	Inkubationen mit direkter Zugabe von NADPH	40
6.2.2	Inkubationen mit einem NADPH-regenerierenden System	40
6.2.3	Variation der Inkubationszeit	41
6.2.4	Variation der Proteinmenge	42
6.2.5	Variation des NADPH-Zusatzes	42
6.2.6	Variation des pH-Wertes des Inkubationsmediums	43
6.3	Ergebnisse der Inkubationen mit Leberhomogenaten verschiedener Spezies	45
6.3.1	Vergleich zwischen induzierten und nichtinduzierten Leberzellfraktionen der Ratte	45

---

6.3.2	Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenleber- mikrosomen	46
6.3.3	Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen	50
6.3.4	Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen	52
6.3.5	Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen	54
<b>7</b>	<b>Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Metaboliten</b>	<b>56</b>
7.1	Synthese des Flezelastin-N-Oxids	56
7.2	Inkubation von Desphenethylflezelastin mit Rattenlebermikrosomen	57
7.3	Umsetzungen mit einem Cytochrom P450 Modellsystem zur biomimetischen Monooxygenierung	59
7.4	DAD-Spektren	60
7.5	Massenspektrometrie	61
7.5.1	Identität der bekannten Metaboliten	61
7.5.2	Massenspektrometrische Untersuchungen der unbekannt Metaboliten	64
<b>8</b>	<b>Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin und Desphenethylflezelastin nach Inkuba- tionen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies</b>	<b>67</b>
8.1	HPLC-Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse an Chiralpak AD <sup>®</sup>	68
8.1.1	Validierung der Methode	68
8.1.2	Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenleber- mikrosomen	70
8.1.3	Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen	72
8.1.4	Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen	73
8.1.5	Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen	74

8.1.6	Überprüfung der Konfigurationsstabilität unter den Inkubationsbedingungen	76
8.2	Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse	76
8.2.1	Wahl der Methode	76
8.2.2	Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies	77
8.3	Vergleich der Methoden	80
<b>9</b>	<b>In vivo Untersuchungen zum Metabolismus von <sup>14</sup>C-markiertem Flezelastin in Ratten</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>

## Experimenteller Teil

<b>1</b>	<b>Allgemeines</b>	91
1.1	Allgemeine Geräte	91
1.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	92
1.3	Kapillarelektrophorese	92
1.4	Geräte zur Bereitung von Leberhomogenaten	93
<b>2</b>	<b>Abkürzungen und Erläuterungen</b>	94
2.1	Verbindungen	94
2.2	Kenngößen	95
2.2.1	Chromatographische Kenngößen	95
2.2.2	Elektrophoretische Kenngößen	95
2.2.3	Statistische Kenngößen	95
2.3	Häufig verwendete Abkürzungen	96
<b>3</b>	<b>Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels HPLC an chiralen stationären Phasen</b>	97
3.1	Enantiomerentrennung von Flezelastin	97
3.1.1	Chiral AGP <sup>®</sup>	97
3.1.2	Resolvosil-BSA-7 <sup>®</sup>	98
3.1.3	Chiralcel OD <sup>®</sup>	99
3.1.4	Chiralcel OD-R <sup>®</sup>	100

---

3.1.5	Chiralpak AD <sup>®</sup>	101
3.1.6	Säulen ohne Trennergebnis	101
3.2	Enantiomerentrennung von Desphenethylflezelastin	103
3.2.1	Chiralpak AD <sup>®</sup>	103
3.2.2	Weitere getestete Säulen	104
3.2.3	Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere von Desphenethylflezelastin	105
3.3	Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten	106
3.3.1	Chiralpak AD <sup>®</sup>	106
3.3.2	Chiral AGP <sup>®</sup>	107
3.4	Überprüfung der Enantiomerenreinheit des Flezelastins	108
<b>4</b>	<b>Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels Kapillarzonenelektrophorese</b>	<b>109</b>
4.1	Enantiomerentrennung von Flezelastin	109
4.1.1	Herstellung der Lauf- und Elektrodenpuffer	109
4.1.2	Ergebnisse der Trennversuche	110
4.2	Gleichzeitige Enantiomerentrennung von Flezelastin, Desphenethyl- flezelastin und des Carboxymetaboliten	111
4.2.1	Enantiomerentrennung von Desphenethylflezelastin	111
4.2.2	Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten	111
<b>5</b>	<b>Achirale chromatographische Bestimmung von Fleze- lastin und seiner Metaboliten aus biologischer Matrix</b>	<b>113</b>
5.1	Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Verfahrens	113
5.1.1	Trennung an einer RP 18-Phase	113
5.1.2	Trennung an einer Si-60-Phase	114

---

5.2	Wahl des internen Standards	114
5.2.1	Wahl des internen Standards für die UV-Detektion	115
5.2.2	Wahl des internen Standards für die Fluoreszenzdetektion	116
5.3	Extraktionsverfahren	117
5.3.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion	117
5.3.2	Festphasenextraktion	119
5.4	Validierung des analytischen Verfahrens	121
5.4.1	Validierung der Analytik mit UV-Detektion	121
5.4.1.1	Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion	121
5.4.1.2	Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion	123
5.4.2	Validierung der Analytik mit Fluoreszenzdetektion	125
5.4.2.1	Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion	125
5.4.2.2	Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion	127
5.4.3	Nachweisgrenze	129
<b>6</b>	<b>In vitro Untersuchungen zum Metabolismus des Flezelastins mit Hilfe von Leberzellfraktionen verschiedener Spezies</b>	<b>130</b>
6.1	Herstellung und Charakterisierung der Leberhomogenate	130
6.2	Inkubationsbedingungen	133
6.2.1	Inkubationen mit direkter Zugabe von NADPH	133
6.2.2	Inkubationen mit einem NADPH-regenerierenden System	134
6.2.3	Variation der Inkubationszeit	135
6.2.4	Variation der Proteinmenge	136

---

6.2.5	Variation des NADPH-Zusatzes	136
6.2.6	Variation des pH-Wertes des Inkubationsmediums	137
6.3	Ergebnisse der Inkubationen mit Leberhomogenaten verschiedener Spezies	138
6.3.1	Vergleich zwischen induzierten und nichtinduzierten Leberzellfraktionen der Ratte	138
6.3.2	Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen	139
6.3.3	Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen	141
6.3.4	Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen	142
6.3.5	Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen	143
<b>7</b>	<b>Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Metaboliten</b>	<b>144</b>
7.1	Synthese des Flezelastin-N-Oxids	144
7.2	Inkubation von Desphenethylflezelastin mit Rattenlebermikrosomen	145
7.3	Umsetzungen mit einem Cytochrom P450 Modellsystem zur biomimetischen Monooxygenierung	145
7.4	DAD-Spektren	146
7.5	Massenspektrometrie	147
7.5.1	Identität der bekannten Metaboliten	147
7.5.2	Massenspektrometrische Untersuchungen der unbekanntem Metaboliten	148



---

<b>8</b>	<b>Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin und Desphenethylflezelastin nach Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies</b>	150
8.1	HPLC-Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse an Chiralpak AD <sup>®</sup>	150
8.1.1	Validierung der Methode	150
8.1.2	Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen	153
8.1.3	Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen	154
8.1.4	Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen	155
8.1.5	Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen	156
8.1.6	Überprüfung der Konfigurationsstabilität unter den Inkubationsbedingungen	157
8.2	Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse	158
8.2.1	Wahl der Methode	158
8.2.2	Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies	159
<b>9</b>	<b>In vivo Untersuchungen zum Metabolismus von <sup>14</sup>C-markiertem Flezelastin in Ratten</b>	160
9.1	Durchführung der Studie	160
9.2	Auswertung der Studie	161
	<b>Literaturverzeichnis</b>	165

## **Theoretischer Teil**

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Flezelastin (1) (Abb. 1), 4-[(4-Fluorphenyl)methyl]-2-[hexahydro-1-(2-phenylethyl)-1H-azepin-4-yl]-1(2H)-phthalazinon, ist ein neues nichtsedierendes Antihistaminikum/Antiasthmikum, das als Nachfolgeverbindung des bereits in die Therapie eingeführten Azelastins entwickelt wurde. Azelastin (7) (Abb. 1) ist unter dem Namen Allergodil® in den Darreichungsformen Nasenspray (0,14 mg/Sprühstoß) und Tabletten (2 mg) seit 1992 im Handel. Es ist zugelassen zur Therapie des allergischen Asthmas sowie der saisonalen und perennialen Rhinitis<sup>1</sup>. Das noch nicht zugelassene Flezelastin zeigt im Vergleich zum Azelastin verbesserte physikochemische und pharmakologische Eigenschaften<sup>2,3</sup>.

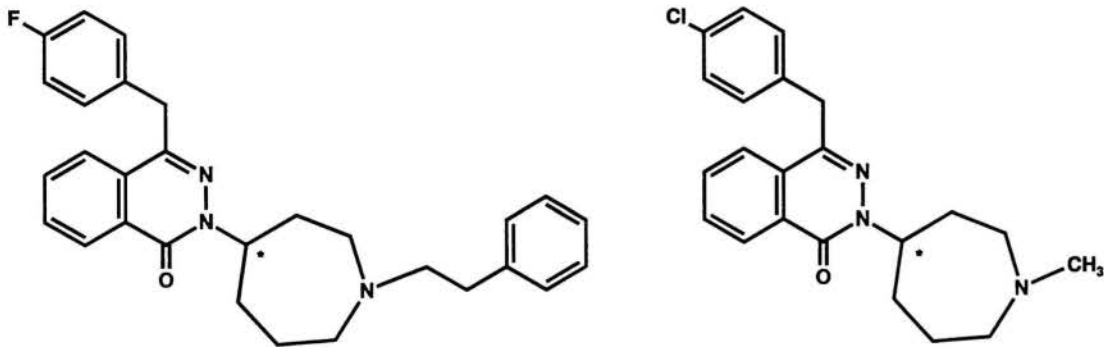


Abb. 1: Flezelastin (1)

Azelastin (7)

Beide Wirkstoffe weisen neben einem H<sub>1</sub>-antihistaminischen Effekt sowohl bronchodilatierende als auch antiinflammatorische Eigenschaften auf. Beschrieben sind die Stabilisierung der Mastzellmembran sowie eine hemmende Wirkung auf die durch Leukotriene und PAF (Platelet Activating Factor) induzierte Bronchokonstriktion<sup>2,4</sup>. Weiterhin wurden antiemetische, analgetische, antiarrhythmische<sup>5</sup> und antimykobakterielle<sup>6</sup> Effekte gefunden. Von therapeutischem Interesse ist auch eine Einsatzmöglichkeit zur Durchbrechung der multi-drug-resistance (MDR) während der Behandlung mit Zytostatika<sup>5,7</sup>.

Als unerwünschte Wirkungen des Azelastins treten Reizungen der Nasenschleimhaut, bitterer Geschmack und nach oraler Gabe auch Schläfrigkeit auf<sup>1,4</sup>.

Bedingt durch den siebengliedrigen Hexahydroazepinring weisen Flezelastin und Azelastin ein Chiralitätszentrum auf. Therapeutisch verwendet wird das Razemat des Azelastins, da die vergleichende pharmakologische Testung keine eindeutige Präferenz für ein Enantiomer erkennen ließ<sup>2,3</sup>. Für die Antipoden des Flezelastins wurden ähnliche Ergebnisse gefunden<sup>3</sup>, die in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Testmodell	Razemat (±)	Enantiomere	
		(+)	(-)
<b>in vitro</b>			
Hemmung der Bildung von			
5 HETE (IC <sub>50</sub> , µmol/l)	17,0	19,2	31,2
LTB <sub>4</sub> (IC <sub>50</sub> , µmol/l)	16,0	16,8	21,5
LTC <sub>4</sub> (IC <sub>50</sub> , µmol/l)	19,6	20,3	28,8
Hemmung der Histaminfreisetzung (IC <sub>50</sub> , µmol/l ± SD)	6,4 ± 0,4	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,4
H <sub>1</sub> -Rezeptorbindung (IC <sub>50</sub> , nmol/l ± SD)	189 ± 22	176 ± 30	501 ± 41
<b>in vivo</b>			
Hemmung des Ovalbumin-Spasmus („early phase“, ED <sub>50</sub> , mg/kg p.o.)	0,2 (0,07-0,48)	0,2 (0,12-0,36)	2,0 (0,32-12,3)
Beeinflussung der spontanen Motilität bei 40 mg/kg p.o. (± SD <sub>rel</sub> )	-18 ± 9%	-31 ± 8%	-30 ± 12%

Tab. 1: Vergleich pharmakologischer Ergebnisse von razemischem Flezelastin (1) und seiner Enantiomeren

Zusammenfassend ist festzustellen, daß das (-)-Enantiomer des Flezelastins eine geringere Affinität zum H<sub>1</sub>-Rezeptor und eine geringere prophylaktische Wirkung als das (+)-Enantiomer besitzt. Die Ergebnisse anderer in vitro Modelle wiesen dagegen keine signifikanten Stereoselektivitäten auf<sup>3</sup>. Da die toxikologischen Befunde ebenfalls nicht stereospezifisch waren, wurde das Razemat klinisch entwickelt<sup>2</sup>.

Für die Enantiomere chiraler Arzneistoffe sind Unterschiede in der Pharmakodynamik, der Pharmakokinetik, der Proteinbindung und vor allem der Biotransformation beschrieben<sup>8-10</sup>. Daher sind neben pharmakologischen Testmodellen weitere Untersuchungen, insbesondere zur stereoselektiven Metabolisierung, von großer Relevanz.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der stereoselektiven Biotransformation des Flezelastins mit Hilfe von in vitro Modellen. Dazu sollten Leberhomogenate der Spezies Ratte, Rind und Schwein eingesetzt werden. Um Vergleiche zum Metabolismus im Menschen ziehen zu können, sollten daneben auch Humanlebermikrosomen verwendet werden.

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung der Umsetzungen sollte eine Analytik entwickelt werden, die eine Bestimmung des unverstoffwechselten Flezelastins neben seinen Metaboliten ermöglichte.

Ein wichtiger Aspekt bestand in der Auffindung neuer Metaboliten und deren Strukturaufklärung.

Eine weitere Zielsetzung war die Entwicklung einer HPLC- und einer Kapillarelektrophorese-Methode zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin und seinem aktiven Metaboliten Desphenethylflezelastin nach Umsetzungen mit Leberhomogenaten.

## 2 Eigenschaften und Biotransformation

### 2.1 Eigenschaften

Flezelastinhydrochlorid ist eine fast weiße, kristalline Substanz mit metallischem Geschmack, die unter Braunfärbung bei 225,2 - 225,4°C<sup>11</sup> schmilzt. Es ist sehr leicht löslich in Methanol, Chloroform und Ethanol, leicht löslich in Wasser und wenig löslich in Diethylether, n-Octanol und physiologischer Kochsalzlösung<sup>11</sup>. Der pK<sub>S</sub>-Wert beträgt 8,3<sup>11</sup>.

Die Enantiomere des Flezelastins sind über fraktionierte Kristallisation mittels (+)-(1R, 2S)-Camphersäure zugänglich<sup>3</sup>. Die optischen Drehwerte in Methanol betragen für das (+)-Enantiomer  $[\alpha]^{20} = +21,8^\circ$  und für das (-)-Enantiomer  $[\alpha]^{20} = -20,9^\circ$ <sup>11</sup>. Die absolute Konfiguration der Enantiomere ist nicht bekannt. Aufgrund der Strukturverwandtschaft zum Azelastin ist anzunehmen, daß dessen Konfiguration mit (+) = S und (-) = R auf das Flezelastin übertragen werden kann.

### 2.2 Pharmakokinetische Daten und Biotransformation

Die folgenden Angaben beziehen sich auf das bereits im Handel befindliche Azelastin (Allergodil®), da zu Flezelastin keine entsprechenden Daten vorliegen. Studien mit <sup>14</sup>C-markiertem Flezelastin in Ratten zeigten Übereinstimmungen der Hauptausscheidungswege der Arzneistoffe (vgl. Kap. 9).

Azelastin-Sprühlösung (1 mg/ml) wird zweimal täglich in jedes Nasenloch gesprüht. Dies entspricht einer Tagesdosis von 0,56 mg.

Die Tabletten enthalten 2 mg Azelastin. Von ihnen werden täglich 2 Stück verabreicht.



Nach oraler Gabe wird Azelastin nahezu quantitativ (95%) resorbiert und unterliegt einem starken First-Pass-Effekt<sup>12</sup>. Eine einmalige Gabe von 4 mg führt nach 4 bis 5 h zu maximalen Plasmaspiegeln von 3 ng/ml<sup>4</sup>. Nach intranasaler Applikation werden innerhalb von 2,1 bis 2,5 h 307 pg/ml im Plasma gemessen<sup>1</sup>.

Die Bioverfügbarkeit ist größer als 80%. Die Plasmaproteinbindung liegt zwischen 78 und 88%<sup>4</sup>.

Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 25 h nach oraler Einmalgabe und 35,5 h nach Mehrfachgabe. Dies ist wahrscheinlich durch die Akkumulation des pharmakologisch aktiven N-Desmethyl-Metaboliten bedingt, der eine Halbwertszeit von 42 h aufweist<sup>4</sup>.

Azelastin wird hauptsächlich in periphere Organe verteilt wie Lunge, Haut, Muskulatur, Leber und Niere, dagegen nur in geringem Ausmaß ins Gehirn<sup>4,13</sup>. Hohe Konzentrationen werden vor allem in der Lunge gefunden. In diesem Zusammenhang wird eine „Ionenfalle“ der eher aciden Lysosomen für schwache Basen diskutiert<sup>14</sup>.

Der plazentare Übergang des Azelastins auf die Feten ist gering. Im Tierversuch an der Ratte betragen die Konzentrationen in den Feten nur ein Zehntel der Konzentrationen in der Plazenta<sup>13</sup>.

Die Ausscheidung von Azelastin und seinen Metaboliten erfolgt hauptsächlich biliär, so daß ca. 25% renal und 75% fäkal eliminiert werden<sup>1</sup>.

Untersuchungen der Biotransformation beim Menschen zeigten, daß Azelastin N-Desmethylierung, Ringhydroxylierung und oxidativer Öffnung des Hexahydroazepinringes unterliegt<sup>4,14</sup>.

Bei der Biotransformation des Flezelastins (**1**) ist ebenfalls eine N-Desalkylierung zum Desphenethylflezelastin (D-21440, **2**) sowie eine oxidative Ringöffnung zum Carbonsäurederivat D-22258 (**3**) beschrieben. Des weiteren wurde das Vorkommen eines im Phenethylrest hydroxylierten Metaboliten (**4**) und des Flezelastin-N-Oxids (**5**) postuliert<sup>15</sup>.

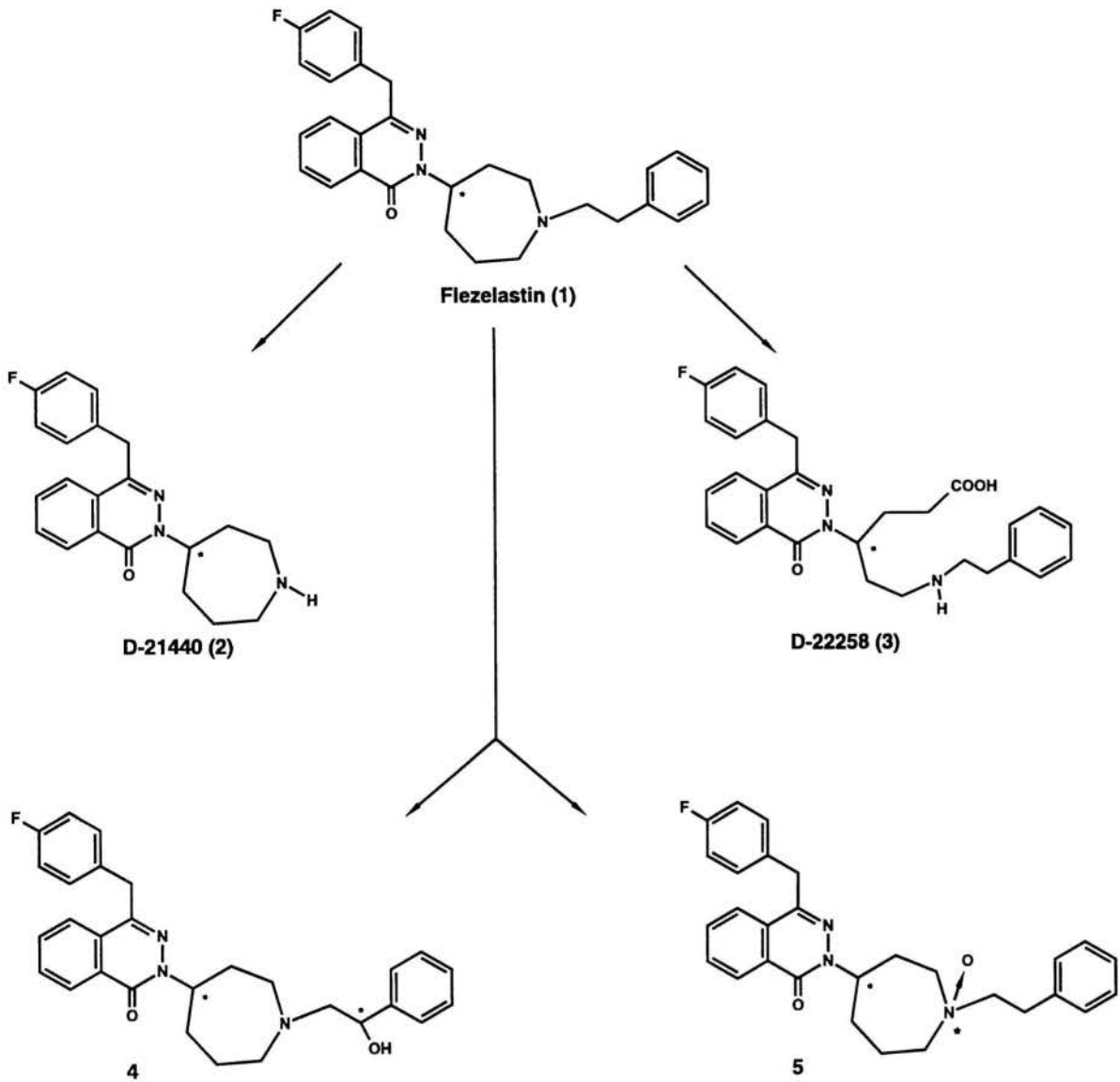


Abb. 2: Metabolisierungsschema des Flezelastins (1)



### 3 Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels HPLC an chiralen stationären Phasen

Für Flezelastin (1) und seine als Vergleichssubstanzen vorliegenden Metaboliten Desphenethylflezelastin (2) sowie für das ringoffene Carbonsäurederivat (3) sollten direkte Enantiomerentrennungen an chiralen stationären Phasen entwickelt werden, die sich für die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse aus biologischem Material eignen.

## 3.1 Enantiomerentrennung von Flezelastin

### 3.1.1 Chiral-AGP<sup>®</sup>

Zunächst sollte die bei ASTA Medica entwickelte Enantiomerentrennung an einer Chiral-AGP<sup>®</sup>-Säule<sup>16</sup> verbessert werden.

Das Füllmaterial dieser chiralen stationären Phase besteht aus humanem  $\alpha_1$ -acidem Glykoprotein, das auf modifiziertem Kieselgel immobilisiert ist. Die Säule wird im Reversed-Phase-Modus betrieben. Als Fließmittel dienen wässrige Pufferlösungen mit Zusätzen von Alkoholen oder Acetonitril als Modifier<sup>17</sup>.

Eine Basislinientrennung gelang mit einer mobilen Phase bestehend aus Phosphatpuffer pH 4,0, TBAH und Acetonitril (Abb. 3).

Da der isoelektrische Punkt von  $\alpha_1$ -AGP pufferabhängig mit Werten zwischen 1,8 und 2,7 sehr niedrig liegt, ist das Protein unter den gewählten Bedingungen negativ geladen<sup>18</sup>. Um zu starke Wechselwirkungen der stationären Phase mit dem protonierten Analyten zu vermeiden, wurde das quartäre Ammoniumsalz TBAH als kationischer Modifier zugesetzt.

Eine Erniedrigung des Anteils an Acetonitril bewirkte eine Zunahme der Retentionszeiten und der Trennkapazität. Der organische Modifier konkurriert wahr-

scheinlich mit dem Analyten um die Bindung am Protein mittels hydrophober Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrückenbindungen. Ebenso sind - abhängig von der Modifikonzentration - Änderungen in der Konformation des Proteins denkbar, die die Bindung des chiralen Arzneistoffs beeinflussen können<sup>19</sup>.

Die Nachteile der erzielten Basislinientrennung waren die breite Peakform und die späte Elution der Enantiomere. Auf der Suche nach einer optimalen Trennung wurden im folgenden weitere chirale Phasen getestet.

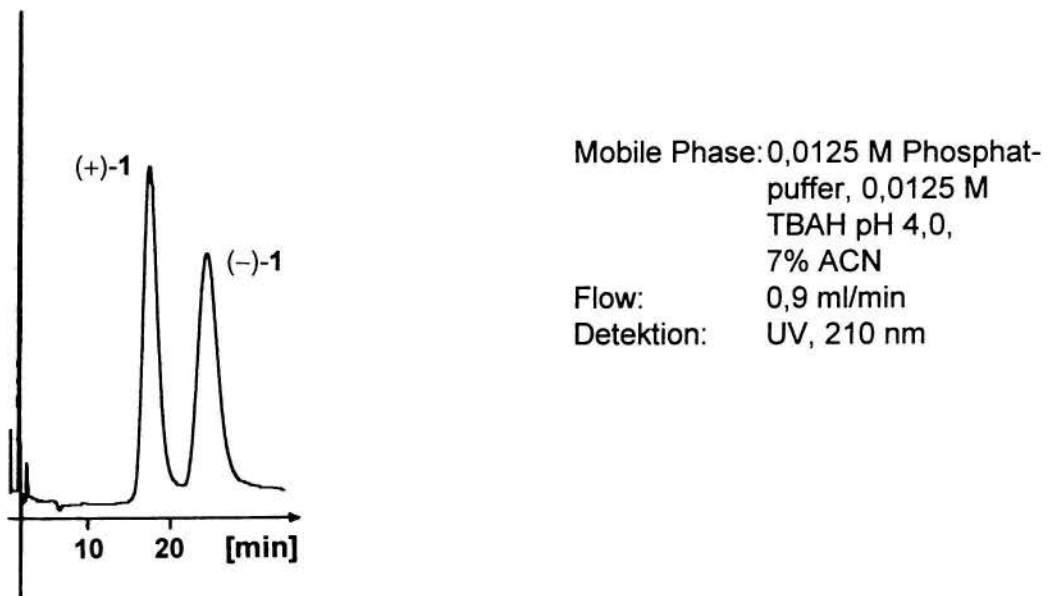


Abb. 3: Trennung der Enantiomere von 1 an Chiral-AGP<sup>®</sup>

### 3.1.2 Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>

Aufgrund der erzielten Enantiomerentrennung an Chiral-AGP<sup>®</sup> wurde eine weitere Proteinphase, die Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>, getestet. Bei dieser chiralen stationären Phase handelt es sich um an modifiziertes Kieselgel fixiertes, bovines Serumalbumin (BSA). Als Fließmittelgemische eignen sich ebenfalls wäßrige Pufferlösungen mit organischem Modifizierzusatz, bevorzugt 1-Propanol.

Eine Trennung der Enantiomere des Flezelastins (**1**) wurde mit einer mobilen Phase, die nur aus Phosphatpuffer pH 5,0 bestand, erzielt (Abb. 4). Die Peaks wiesen wie an der Chiral AGP<sup>®</sup> (s. Kap. 3.1.1) eine breite Form auf, so daß keine Verbesserung der Trennleistung erzielt wurde.

Die Molarität des Puffers wurde mit 50 mM in einem Bereich gewählt, der mittlere Kapazitätsfaktoren erwarten ließ. Die Affinität des Analyten zur stationären Phase ist abhängig von der Ionenstärke des Puffers und durchläuft mit steigender Molarität ein Minimum (bei ca. 100-150 mM)<sup>20</sup>.

Bereits ein 1%iger Zusatz von 1-Propanol bewirkte eine deutliche Verkürzung der Retentionszeiten sowie eine Verschlechterung der Trennleistung.

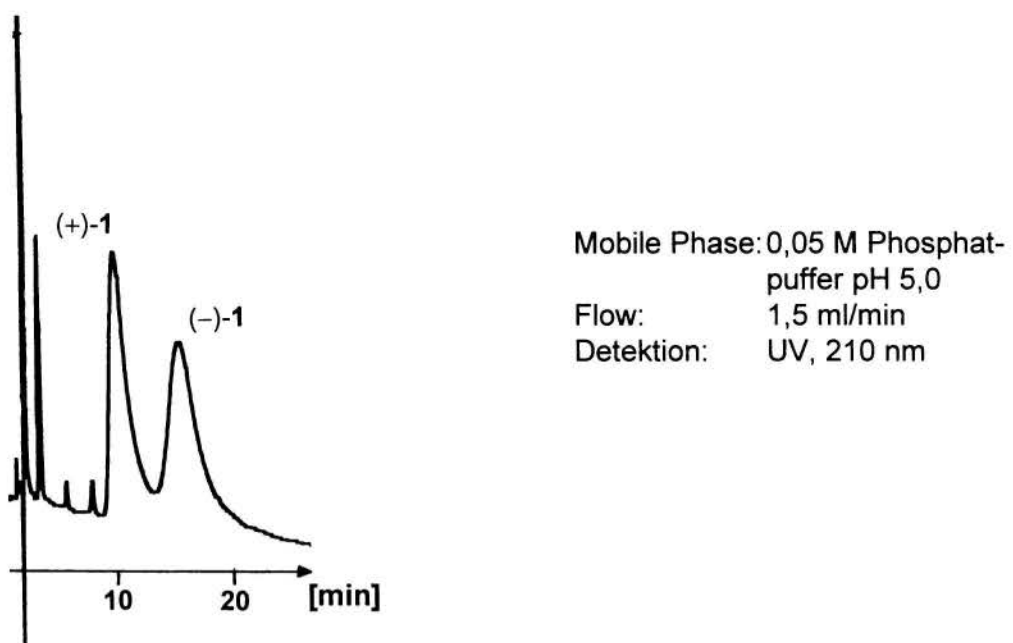


Abb. 4: Trennung der Enantiomere von **1** an Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>

### 3.1.3 Chiralcel OD<sup>®</sup>

Eine weitere Trennung der Enantiomere des Flezelastins (**1**) gelang an einer Chiralcel OD<sup>®</sup>-Phase, bei der Cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) adsorptiv auf modifiziertes, makroporöses Kieselgel aufgezogen ist<sup>21</sup> (Abb. 5).

Die Trennung mit einem Standard-Fließmittelgemisch (n-Hexan/Isopropanol 90/10) blieb unvollständig ( $R = 0,88$ ). Bereits durch einen Zusatz von 0,1% Diethylamin zur mobilen Phase konnte eine Verdreifachung der Auflösung erzielt werden ( $R = 2,52$ ). Das Diethylamin sättigt unselektiv adsorptive Stellen der Säule, freie Silanolgruppen, ab. Dies ist von Vorteil, wenn der Analyt, wie hier Flezelastin, basisch ist und selbst mit den Silanolgruppen interagiert. Nachteilig ist die durch den Diethylaminzusatz bedingte schlechtere Durchlässigkeit des Fließmittels im tieferen UV-Bereich um 210 nm, so daß die Detektion im Nebenmaximum bei 292 nm erfolgen mußte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Proteinphasen zeichnete sich die erzielte Trennung an der Chiralcel OD<sup>®</sup> durch sehr scharfe Peaks aus.

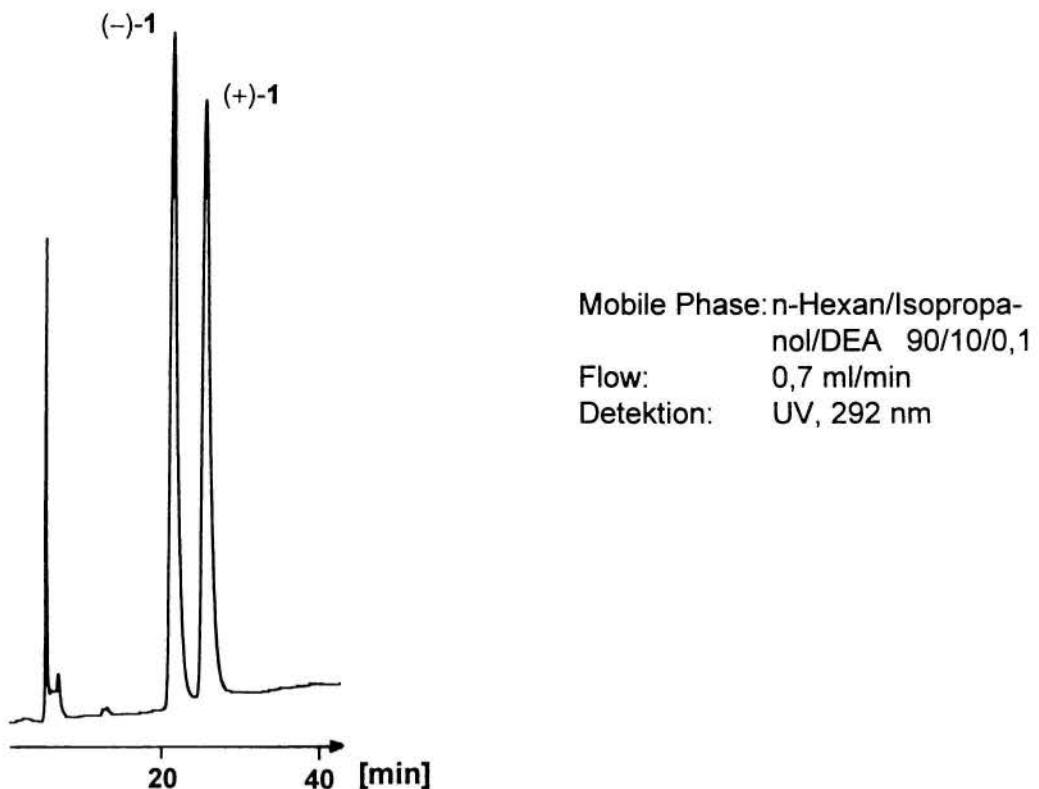


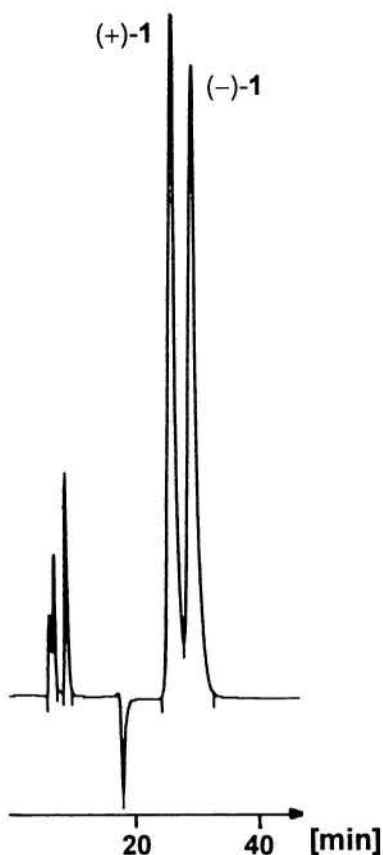
Abb. 5: Trennung der Enantiomere von **1** an Chiralcel OD<sup>®</sup>

### 3.1.4 Chiralcel OD-R<sup>®</sup>

Aufgrund der guten Trennleistung der Chiralcel OD<sup>®</sup> (s. Kap. 3.1.3) wurde getestet, ob sich diese Phase auch im Reversed-Phase-Modus für eine Enantiomertrennung des Flezelastins (**1**) eignete. Eigens für die Verwendung von wässrigen Fließmitteln ist die Chiralcel OD-R<sup>®</sup>-Säule im Handel. Der chirale Selektor ist jedoch mit dem der Chiralcel OD<sup>®</sup> identisch, so daß prinzipiell die Möglichkeit besteht, beide Phasen mit einem wässrigen Eluenten zu betreiben.

Für die Enantiomertrennungen von basischen Substanzen werden Fließmittelgemische aus wässrigen Natriumperchlorat-Lösungen und Acetonitril empfohlen<sup>22</sup>. Flezelastin (**1**) ließ sich unter diesen Bedingungen in die Enantiomere auftrennen (Abb. 6). Die Elutionsreihenfolge in diesem System war umgekehrt zum Normalphasen-Modus der Chiralcel OD<sup>®</sup>-Phase. (+)-**1** eluierte hier vor (-)-**1**.

Da die Trennung nicht so vollständig wie an der Chiralcel OD<sup>®</sup> und der Chiralpak AD<sup>®</sup> (s. Kap. 3.1.5) war, wurde sie nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt.



Mobile Phase: NaClO<sub>4</sub> 0,5 M/ACN  
40/60  
Flow: 0,4 ml/min  
Detektion: UV, 210 nm

Abb. 6: Trennung der Enantiomere von **1** an Chiralcel OD-R<sup>®</sup>

### 3.1.5 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Eine weitere chirale Phase, die Flezelastin (**1**) in seine Enantiomere zu trennen vermochte, war die Chiralpak AD<sup>®</sup> (Abb. 7). Der chirale Selektor ist hier Amylose-tris(3,5-dimethylphenylcarbammat).

Um eine Basislinientrennung zu erzielen, war wiederum ein Zusatz von Diethylamin zum Fließmittelgemisch aus n-Hexan/Isopropanol notwendig (vgl. Kap. 3.1.3). Mit steigenden Anteilen von Diethylamin (0,1-0,8%) verbesserte sich die Peakschärfe und damit einhergehend die Auflösung.

Da die Trennung an der Chiralpak AD<sup>®</sup> eine scharfe Peakform mit kurzen Analysenzeiten vereinigte, wurde sie für die nachfolgenden Untersuchungen aus biologischem Material ausgewählt. Gleichzeitig war auch eine Enantiomeren-trennung von Desphenethylflezelastin möglich (s. Kap. 3.2).

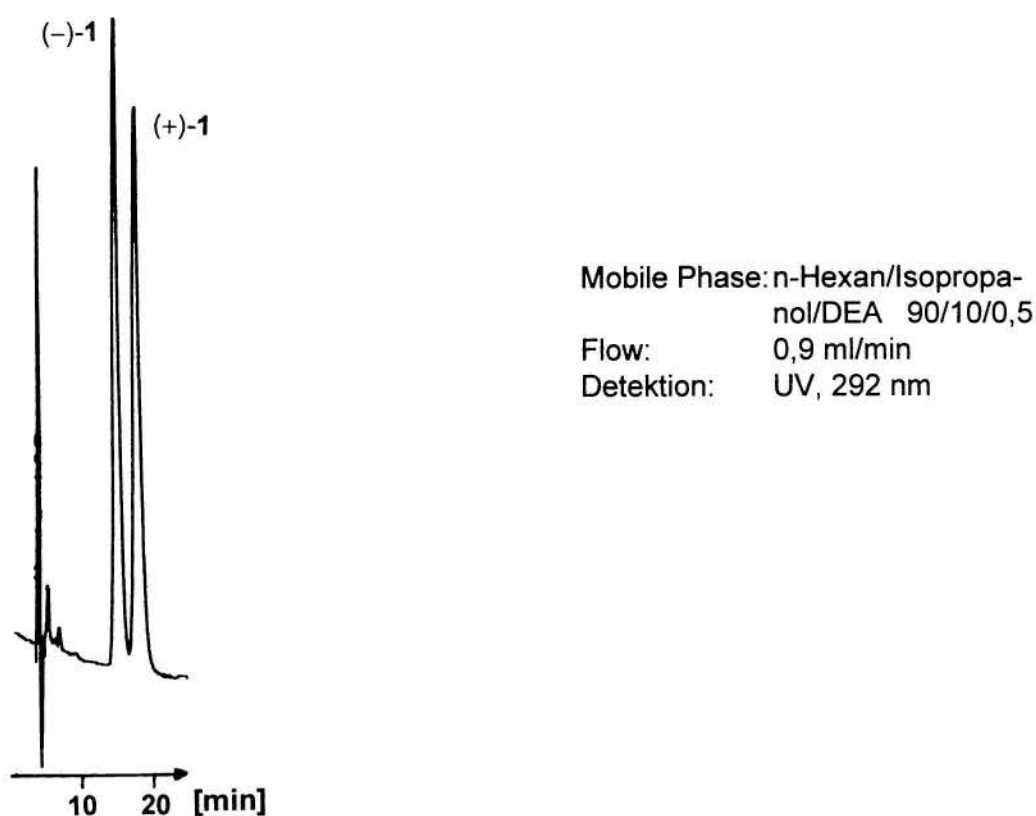


Abb. 7: Trennung der Enantiomere von **1** an Chiralpak AD<sup>®</sup>

### 3.1.6 Säulen ohne Trennergebnis

#### Chiralcel OJ<sup>®</sup>

Nach den erfolgreichen Trennungen an Cellulose- und Amylose-Phasen (vgl. Kap. 3.1.3-3.1.5) wurde als weiteres Cellulosederivat Cellulose-tris(p-methylbenzoat), die Chiralcel OJ<sup>®</sup>-Säule, getestet.

Flezelastin konnte ausschließlich mit reinem n-Hexan eluiert werden, wobei keine Trennung erzielt wurde. Ein 1%iger Zusatz von Isopropanol verbesserte die Trennung nicht.

#### Ultron ES-OVM<sup>®</sup>

Mit der Ultron ES-OVM<sup>®</sup> stand eine weitere Proteinphase zur Verfügung. Der chirale Selektor ist das Ovomuroid, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Protein. Die Molarität des eingesetzten Puffers sollte kleiner als 20 mM sein, da mit steigender Ionenstärke die Kapazitätsfaktoren sinken<sup>23</sup>.

Als Fließmittel dienten Gemische aus 5 und 10 mM Phosphatpuffer verschiedenen pH-Werts und Isopropanol oder Ethanol als Modifier. Mehr als eine Antrennung konnte allerdings nicht erzielt werden. Auch ein TBAH-Zusatz zum Puffer wie zur Enantiomerentrennung an Chiral-AGP<sup>®</sup> (s. Kap. 3.1.1) ermöglichte keine Verbesserung der Trennleistung.



## 3.2 Enantiomertrennung von Desphenethylflezelastin

### 3.2.1 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Für Desphenethylflezelastin (**2**) sollte eine HPLC-Methode zur Enantiomertrennung gefunden werden, die auch eine simultane Bestimmung der Flezelastin-Enantiomere erlaubt. Als einzige chirale Phase eignete sich Chiralpak AD<sup>®</sup>. Die Trennung gelang mit einem Eluenten aus n-Hexan, Isopropanol und Diethylamin (Abb. 8), wobei mit steigendem Diethylaminzusatz die Auflösung verbessert werden konnte (vgl. Kap. 3.1.5). Weiterhin wurde versucht, die Trennung mit anderen Fließmittelgemischen zu optimieren. Dazu wurden Mischungen von n-Hexan mit Ethanol, 2-Butanol sowie Isopropanol und 2-Butanol mit oder ohne Diethylaminzusatz hergestellt. Mit keinem dieser Eluenten konnte ein verbessertes Trennergebnis erzielt werden.

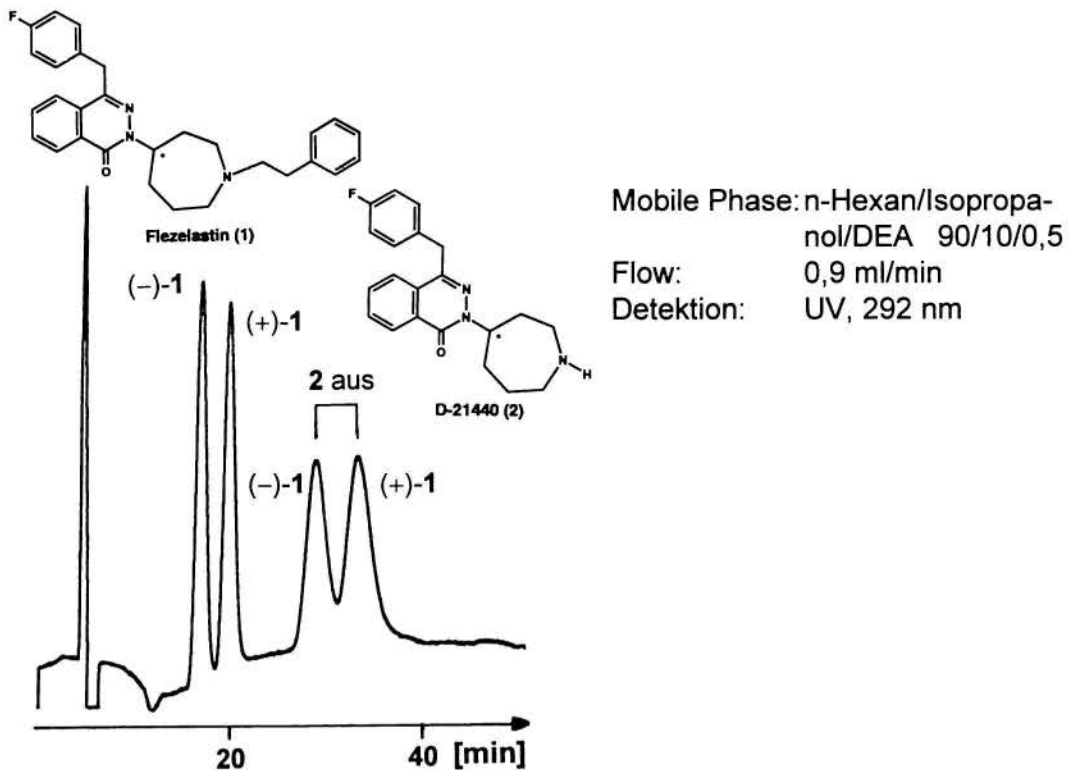


Abb. 8: Gleichzeitige Trennung der Enantiomere von **1** und **2** an Chiralpak AD<sup>®</sup>



### 3.2.2 Weitere getestete Säulen

Von den in Kap. 3.1 angeführten chiralen Phasen zeigte keine eine ausreichende Selektivität für die Enantiomertrennung von D-21440.

Lediglich die Chiral-AGP<sup>®</sup> ermöglichte eine Antrennung mit einem rein wäßrigen Eluenten ohne Zusatz von organischem Modifier.

### 3.2.3 Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere von Desphenethylflezelastin

Für die nachfolgende Bestimmung wurde die Chiralpak AD<sup>®</sup>-Säule aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl Flezelastin (**1**) als auch Desphenethylflezelastin (**2**) zu trennen, ausgewählt.

Da von Flezelastin (**1**) die reinen Enantiomere vorlagen, konnte deren Elutionsreihenfolge auf den verschiedenen chiralen Phasen durch Injektion von Lösungen der einzelnen Enantiomere ermittelt werden.

Die Enantiomere von **2** standen nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die reinen Flezelastin-Enantiomere mit Rattenlebermikrosomen inkubiert, um aufzuklären, welches Enantiomer von **2** aus welchem Enantiomer von **1** entstand. Die Inkubationen wurden wie in Kap. 6.2.1 beschrieben durchgeführt und die Proben analog Kap. 5.3.1 extrahiert.

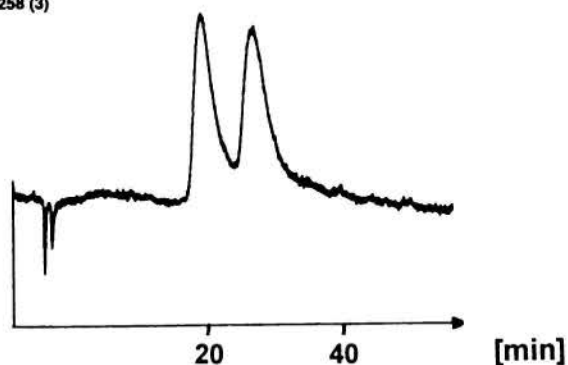
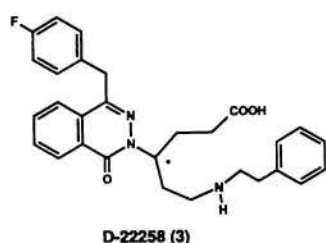
Aus (-)-Flezelastin ging das zuerst eluierende Enantiomer von **2** hervor, aus (+)-Flezelastin das später eluierende. Die Elutionsreihenfolge der Enantiomere stimmte daher bei Flezelastin und seinem Metaboliten **2** überein.

### 3.3 Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten

#### 3.3.1 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Der Carboxymetabolit (**3**) besitzt im Gegensatz zu Flezelastin (**1**) und Desphenethylflezelastin (**2**) neben einem basischen Stickstoff zusätzlich eine Carbonsäurefunktion, so daß eine Enantiomerentrennung mit dem Fließmittelgemisch aus n-Hexan, Isopropanol und Diethylamin nicht möglich war. Unter diesen Bedingungen wurde **3** nicht von der Säule eluiert. Gleiches beschreibt auch TERHECHTE<sup>24</sup> für den Carboxymetaboliten MDL 16.455 des Terfenadins.

Wählte man anstelle eines Basezusatzes zum Fließmittel jedoch einen Zusatz von Ameisensäure<sup>25</sup>, ließ sich eine Trennung der Enantiomere von **3** erzielen (Abb. 9). Flezelastin trennte sich mit diesem Eluenten ebenfalls in seine Enantiomere auf. Nachteilig waren aber die langen Retentionszeiten bei 34 und 46 min und die sehr breite Peakform. Desphenethylflezelastin koeluierte ungetrennt mit dem zweiten Enantiomer von **3**. Somit eignete sich die Analytik nicht zur gleichzeitigen Bestimmung von Flezelastin und seinen Metaboliten aus biologischen Proben.



Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/HCOOH  
80/20/1  
Flow: 1,0 ml/min  
Detektion: UV, 292 nm

Abb. 9: Trennung der Enantiomere von **3** an Chiralpak AD<sup>®</sup>

### 3.3.2 Chiral-AGP®

Die Proteinphase Chiral-AGP® eignete sich unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie für die Enantiomerentrennung des Flezelastins (s. Kap. 3.1.1) auch für die Trennung des Carboxymetaboliten (**3**) (Abb. 10). Da jedoch die beiden Substanzen koeluierten und sich Desphenethylflezelastrin nicht in die Enantiomere trennen ließ, konnte auch diese Methode nicht für Untersuchungen zur Biotransformation genutzt werden.

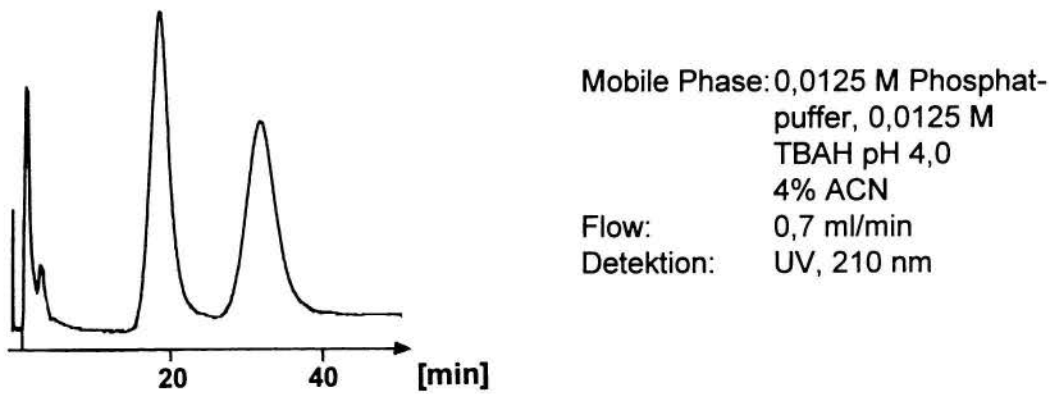


Abb. 10: Trennung der Enantiomere von **3** an Chiral-AGP®

### 3.4 Überprüfung der Enantiomerenreinheit des Flezelastins

Die Reinheit der Enantiomere wurde mittels HPLC an einer Chiralcel OD<sup>®</sup> nach Kap. 3.1.3 bestimmt. Im Chromatogramm des (-)-Flezelastins war nur ein Peak detektierbar. Die Zumischung von 1% Razemat konnte erkannt werden (Abb. 11). Bei der Analyse des reinen (+)-Enantiomers war bereits eine Verunreinigung mit dem Antipoden festzustellen. Hier konnte eine Zumischung von 2% Razemat noch erkannt werden. Die Enantiomerenreinheit (ee) des (-)-Flezelastins betrug somit  $\geq 99,5\%$  und die des (+)-Flezelastins  $\geq 99\%$ .

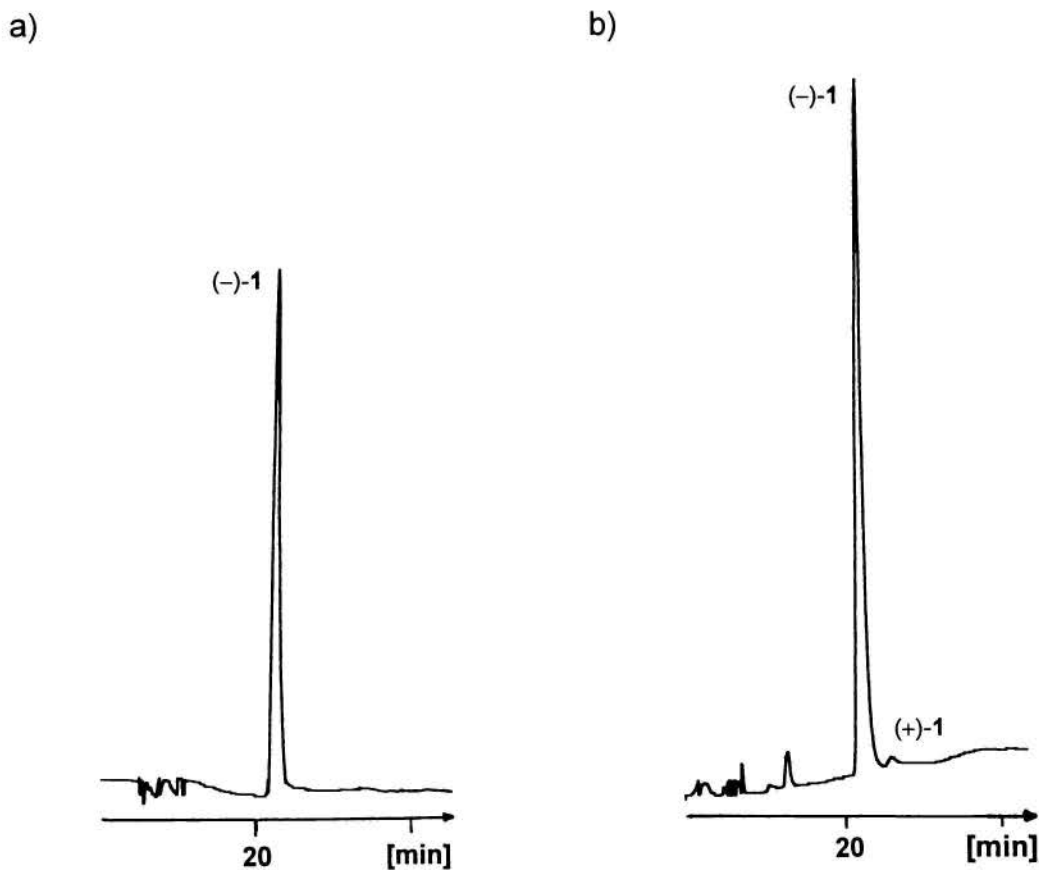


Abb. 11: Bestimmung der Enantiomerenreinheit am Beispiel von (-)-1

a) (-)-1    b) (-)-1 mit 1% Razematzumischung

Säule: Chiralcel OD<sup>®</sup>

Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/0,1

Flow: 0,7 ml/min

Detektion: UV, 292 nm

## 4 Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels Kapillaronenelektrophorese

Die Kapillaronenelektrophorese hat sich in den letzten Jahren zu einer bedeutenden analytischen Methode insbesondere auch auf dem Gebiet der Enantiomerentrennungen entwickelt<sup>26-29</sup>. Vor allem zeichnet sie sich aufgrund der großen Zahl an theoretischen Böden durch hohe Trenneffizienzen aus.

Für die Enantiomerentrennung von Flezelastin und seiner Metaboliten bot sich die Kapillaronenelektrophorese (CZE) mit einem Zusatz von Cyclodextrinen als chirale Selektoren zum Laufpuffer an, da die Verbindungen als sekundäre und tertiäre Amine in saurem Phosphatpuffer protonierbar sind und somit eine Eigenmobilität bei der CZE besitzen. Der Trennmechanismus basiert darauf, daß die Enantiomere mit dem Cyclodextrin Einschlußkomplexe unterschiedlicher Stabilität bilden. Hierdurch werden ihre Mobilitäten beeinflusst. Das Enantiomer, das einen stabileren Komplex ausbildet, weist eine geringere effektive Mobilität und daher eine größere Migrationszeit auf<sup>26</sup>.

### 4.1 Enantiomerentrennung von Flezelastin

Zur Entwicklung einer CZE-Methode für die Enantiomerentrennung von Flezelastin (1) wurden folgende Cyclodextrine (CD) getestet:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD sowie zwei Derivate des  $\beta$ -CD, Hydroxypropyl- $\beta$ -CD und Methyl- $\beta$ -CD. Als Laufpuffer diente 50 mM Phosphatpuffer pH 3,5 mit einem Zusatz des jeweiligen CD. Von den nativen CD konnte nur mit Zusatz von  $\beta$ -CD eine Basislinientrennung erzielt werden (Abb. 12), während Zusätze von  $\alpha$ -CD zu keiner und von  $\gamma$ -CD nur zu einer unvollständigen Trennung führten. Die derivatisierten  $\beta$ -CD zeigten gegenüber dem nativen  $\beta$ -CD verschlechterte Trennleistungen.

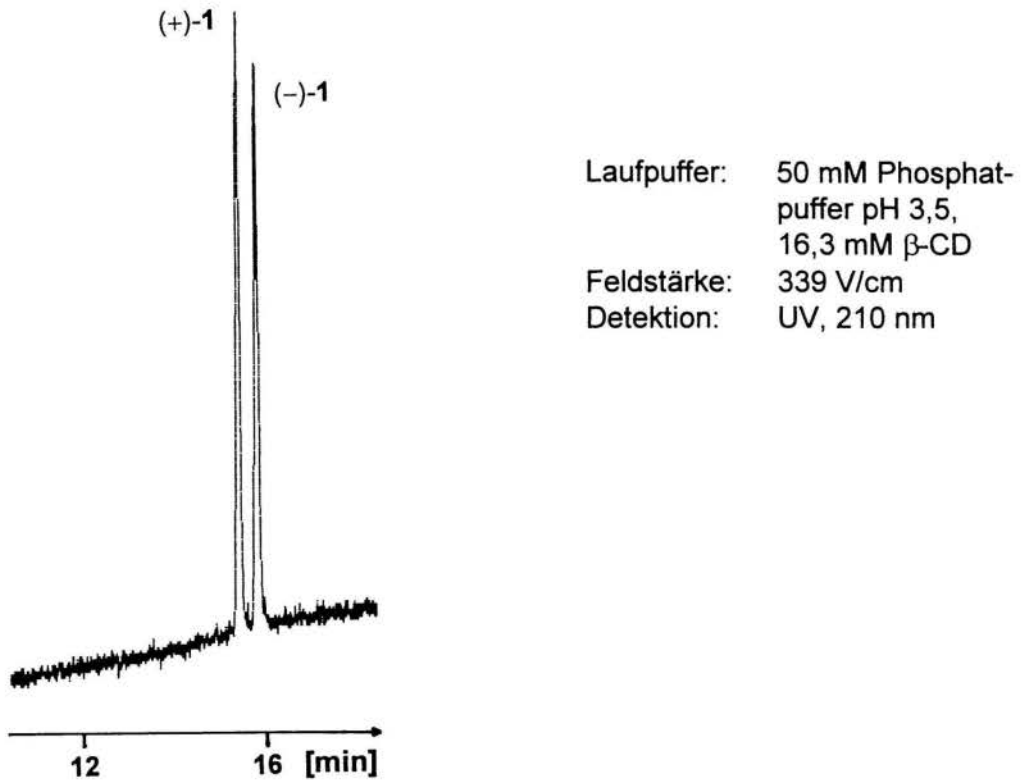


Abb. 12: Enantiomerentrennung von **1** mittels CZE

#### 4.2 Gleichzeitige Enantiomerentrennung von Flezelastin, Desphenethylflezelastin und des Carboxymetaboliten

Da für die HPLC-Analytik keine chirale stationäre Phase gefunden worden war, die eine simultane Enantiomerentrennung von Flezelastin (**1**), Desphenethylflezelastin (**2**) und des Carboxymetaboliten (**3**) ermöglichte, wurde untersucht, ob dazu die für Flezelastin entwickelte CZE-Methode (s. Kap. 4.1) geeignet war. Tatsächlich konnte unter leichter Modifizierung des pH-Wertes eine gleichzeitige Trennung aller drei Substanzen erhalten werden, wobei allerdings die Trennung von **3** unvollständig blieb (Abb. 13). Die Trennung von **2** ließ sich problemlos unter den

gleichen Bedingungen wie für die Muttersubstanz durchführen. **3** dagegen unterschied sich aufgrund seiner zwitterionischen Struktur sehr stark von den anderen beiden Verbindungen. Sowohl die Enantiomerentrennung mit  $\beta$ -CD als auch die Abtrennung von Flezelastin (**1**) zeigten eine starke pH-Abhängigkeit. Bei pH-Werten  $\leq 3,5$  koeluierte D-22258 (**3**) mit **1**. Bei pH-Werten  $\geq 4$  wurde **3** zwar gut von **1** getrennt, die chirale Trennung ging aber vollständig verloren (Abb. 14). Als Kompromiß zwischen möglichst guter Enantiomerentrennung und ausreichender Abtrennung der Analyten voneinander mußte der pH-Wert in einem Bereich von 3,7 bis 3,8 gewählt werden.

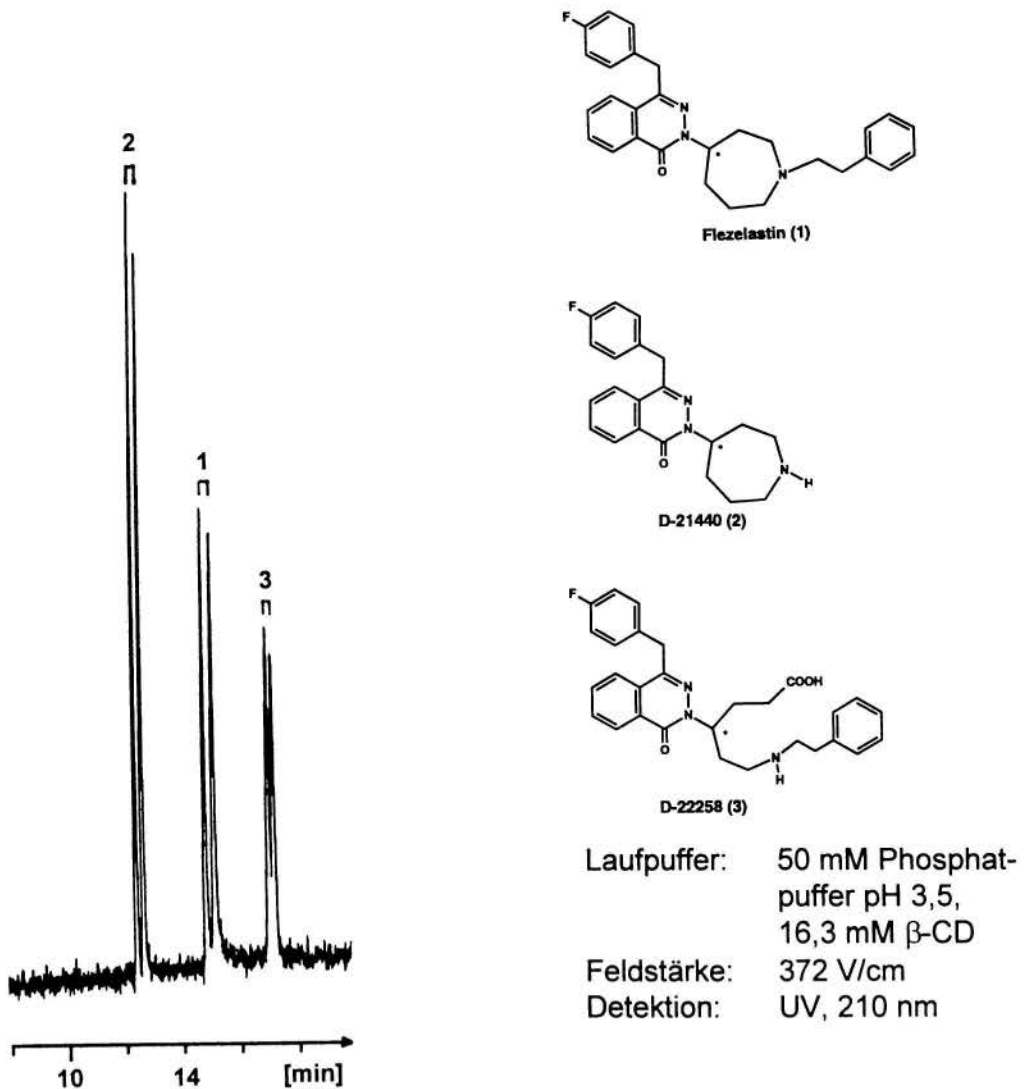


Abb. 13: Gleichzeitige Enantiomerentrennung von **1**, **2** und **3**

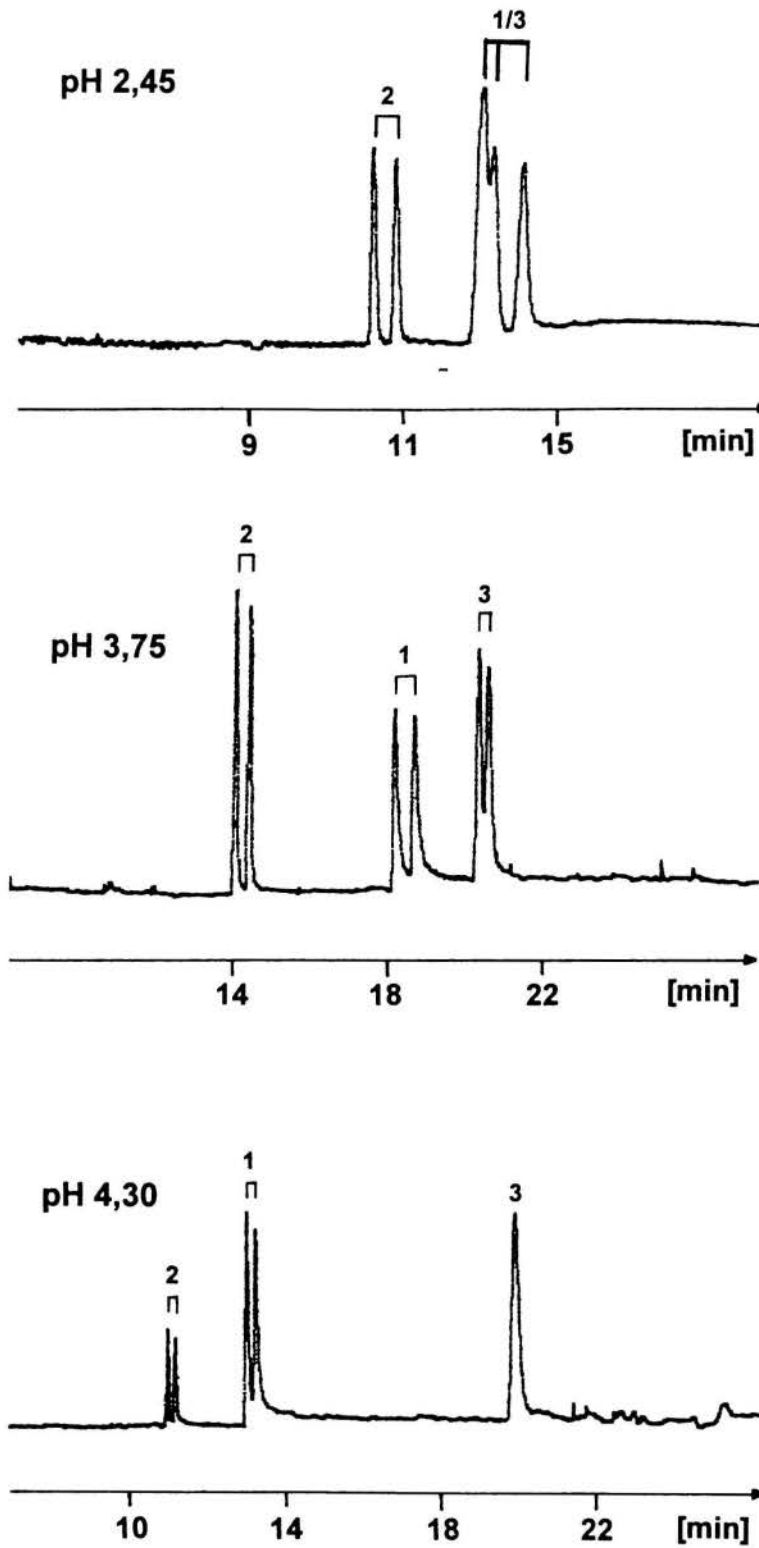


Abb. 14: Abhängigkeit der Enantiomertrennung von 3 vom pH-Wert  
Elektropherographische Bedingungen s. Abb. 12

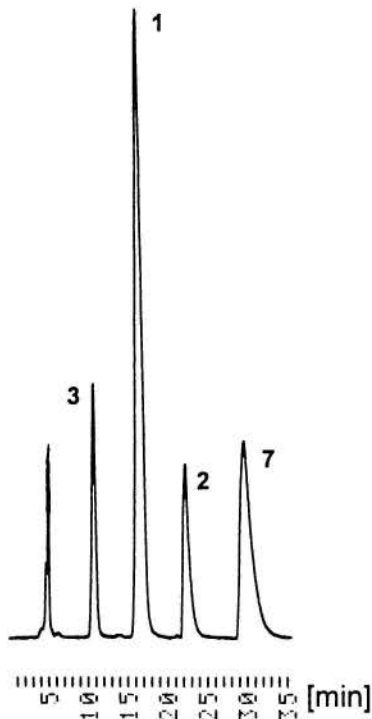


## 5 Achirale chromatographische Bestimmung von Flezelastin und seinen Metaboliten aus biologischer Matrix

### 5.1 Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Verfahrens

In der Literatur sind für die HPLC-Analytik von basischen Substanzen, insbesondere für H<sub>1</sub>-Antihistaminika, zumeist Methoden der Reversed-Phase-Chromatographie an Octadecyl- oder Cyanosäulen beschrieben<sup>30,31</sup>. Daher wurde die chromatographische Bestimmung von Flezelastin (**1**) und seinen Metaboliten **2** und **3** zunächst an einer LiChrospher® RP 18-Phase erprobt. Als Fließmittel dienten Gemische von saurem Phosphatpuffer und Acetonitril als organischem Modifizier. Die Ergebnisse waren jedoch nicht zufriedenstellend, da die Analysenzeit mit über 40 min sehr lang und die Peakform sehr breit war.

Bessere Trennergebnisse konnten auf einer Kieselgelsäule, die mit einem nichtwässrigen, ionischen Eluenten betrieben wurde, erzielt werden (Abb. 15). Diese Methode eignet sich besonders für die Analytik von tertiären Aminen und deren Metaboliten<sup>32</sup>. Das Fließmittel bestand aus Methanol mit einem geringen Perchlorsäurezusatz (0,0025-0,0075%). Flezelastin (**1**) und seine Metaboliten **2**, **3** besitzen protonierbare Aminogruppen, die mit dem entgegengesetzt geladenen Perchlorat Ionenpaare bilden konnten, wodurch ihre Retention abhängig von der Basenstärke beeinflusst wurde.



Mobile Phase: Methanol,  
 HClO<sub>4</sub> 0,0033%  
 Flow: bis 17 min 0,5, ab  
 17 min 0,9 ml/min  
 Detektion: Fluoreszenz,  
 Ex: 210 nm,  
 Em: 360 nm

Abb. 15: Trennung von 1, 2, 3 und dem internen Standard Azelastin (7) an LiChrospher® Si-60

## 5.2 Wahl des internen Standards

Zur quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen und deren Metaboliten aus biologischen Matrices wird üblicherweise mit einem internen Standard gearbeitet. Hierdurch können Schwankungen der Probenaufbereitung und -aufgabe ausgeglichen werden<sup>33,34</sup>. Da für die Analytik des Flezelastins zunächst die UV- und erst später auch die Fluoreszenzdetektion zur Verfügung stand, wurden zwei verschiedene interne Standards eingesetzt.

### 5.2.1 Wahl des internen Standards für die UV-Detektion

Auf der Suche nach einem internen Standard für die UV-Detektion wurden Substanzen auf ihr chromatographisches Verhalten getestet, die über einen protonierbaren Stickstoff verfügen und sich daher für die Ionenpaarchromatographie eignen. Zu diesen Substanzen gehören Bamethan, Halofantrin, Meclozin, Anilin, Diphenhydramin, Miconazol, Codein, Ketamin, Vincamin, Diclofensin, Mianserin, Methixen und Bamipin. Von den getesteten Verbindungen eignete sich nur Ketamin (2-(2-Chlorphenyl)-2-methylaminocyclohexanon (**6**),  $t_R = 20,69$  min), da alle übrigen Substanzen entweder mit Metaboliten koeluierten oder viel zu große Retentionszeiten aufwiesen.

### 5.2.2 Wahl des internen Standards für die Fluoreszenzdetektion

Aufgrund des Ersatzes der UV- durch die Fluoreszenzdetektion wurde die Suche nach einem neuen internen Standard notwendig, da Ketamin keinen Fluorophor besitzt. Folgende fluoreszierende, stickstoffhaltige Substanzen wurden untersucht: Benoxaprofen, Trimethoprim, Naproxen, Theobromin, Nomifensin, Azelastin, Zolpidem, Zopiclon, Chinin, Chinidin und Cinchonidin. Mit Ausnahme von Azelastin (**7**,  $t_R = 38,43$  min) und Nomifensin ( $t_R = 31,56$  min) erwiesen sie sich als ungeeignet, da sie entweder mit Metaboliten oder Matrixbestandteilen koeluierten. Wegen seiner Strukturverwandtschaft zum Flezelastin fiel die Wahl auf Azelastin, obwohl es den Nachteil hatte, sehr spät zu eluieren. Dieser Nachteil konnte durch den Einsatz eines Flow-Gradienten (bis 17 min 0,5, ab 17 min 0,9 ml/min) ausgeglichen werden.

## 5.3 Extraktionsverfahren

Für die Isolierung von Flezelastin (**1**) und seiner Metaboliten **2**, **3** aus biologischem Material wurden sowohl Festphasen- als auch Flüssig-Flüssig- Extraktionen auf ihre Eignung hin überprüft.

### 5.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Vor ihrer Extraktion wurden die Proben alkalisiert (pH 10), so daß die ausschüttelbaren freien Basen vorlagen. Ebenfalls konnte aufgrund seiner zwitterionischen Struktur der Carboxymetabolit extrahiert werden. Es wurden verschiedene organische Lösungsmittel wie Diethylether, n-Hexan, tert. Butylmethylether sowie Gemische aus Diethylether/Ethylacetat, n-Hexan/Diethylether, n-Hexan/Ethylacetat, n-Hexan/ Isoamylalkohol und Cyclohexan/Ethylacetat getestet. Das Extraktionsgemisch Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 erwies sich als bester Kompromiß zwischen Wiederfindung und Reinheit der Proben.

Zusätzlich wurden Versuche zur Proteinfällung mit anschließender Abtrennung vor der eigentlichen Extraktion der biologischen Proben durchgeführt. Das Standard-Extraktionsverfahren (s. o.) sah keine gesonderte Abtrennung der Proteine vor. Diese verblieben während des Ausschüttelns im Normalschliffglas.

Um eine Koagulation der Proteine zu erreichen, wurden zwei verschiedene Wege beschritten. Zum einen erfolgte die Zugabe von eiskaltem Acetonitril, zum anderen wurden die Proben auf 60°C erhitzt. Die Chromatogramme dieser so bearbeiteten Ansätze wiesen keine Störpeaks der Matrix auf. Allerdings ging die erzielte Reinheit mit einer reduzierten Wiederfindung einher. Dies verdeutlichte die hohe Proteinbindung der Substanzen, die durch Extraktion der zuvor abgetrennten, denaturierten Proteine bestätigt wurde. Die Analyse dieser Extrakte zeigte, daß Flezelastin und seine Metaboliten den Proteinen anhafteten und so mitgefällt wurden.

Als weitere Alternative zu herkömmlichen Extraktionsverfahren wurde eine Direktinjektion volumenverringertes Inkubationsansätze nach Proteinfällung getestet. Die Aufgabe der wäßrigen Lösung auf ein rein organisches HPLC-System hatte jedoch eine verschlechterte Trennleistung mit unscharfen Peaks zur Folge.

### 5.3.2 Festphasenextraktion

Zur Festphasenextraktion von Flezelastin (**1**) und seiner Metaboliten **2**, **3** wurden C18- sowie Kationenaustauscher-Kartuschen eingesetzt. Bedingt durch das Auftreten vieler Störpeaks und die reduzierte Wiederfindung war das Verfahren nicht verwendbar. Zudem konnte jeweils etwa ein Drittel der Säulen nach Aufgabe der biologischen Probe nicht mehr mit Lösungsmitteln durchspült werden.

Für alle folgenden Untersuchungen wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem Gemisch aus Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 genutzt.

## 5.4 Validierung des analytischen Verfahrens

Für quantitative Auswertungen unter Zuhilfenahme eines internen Standards muß die Linearität zwischen der zu bestimmenden Substanz und dem internen Standard sowohl vor als auch nach der Extraktion gewährleistet sein. Dazu wurden Substanzlösungen bekannten Gehalts mit einer jeweils konstanten Menge an internem Standard versetzt und das Peakflächenverhältnis bestimmt. Die Konzentrationen wurden in einem für die biologischen Proben zu erwartenden Bereich gewählt.

### 5.4.1 Validierung der Analytik mit UV-Detektion

#### 5.4.1.1 Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion

Zur Überprüfung der Linearität von Flezelastin (1) und seinen Metaboliten D-21440 (2) und D-22258 (3) wurden fünf verschiedene Konzentrationen dieser Substanzen mit einer konstanten Menge an internem Standard Ketamin (6) versetzt und unter den in Kap. 5.1 angegebenen Bedingungen chromatographiert. Es ergaben sich nach einer Regressionsanalyse erster Ordnung lineare Funktionen über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (Abb. 16-18).

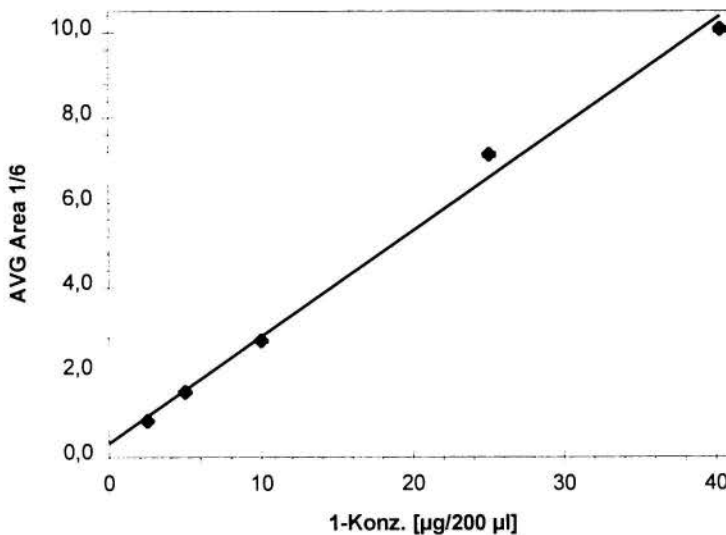


Abb. 16: Linearität von Flezelastin (1) gegenüber dem internen Standard Ketamin (6) vor Extraktion (AVG 1/6  $\pm$  SD, n = 3)

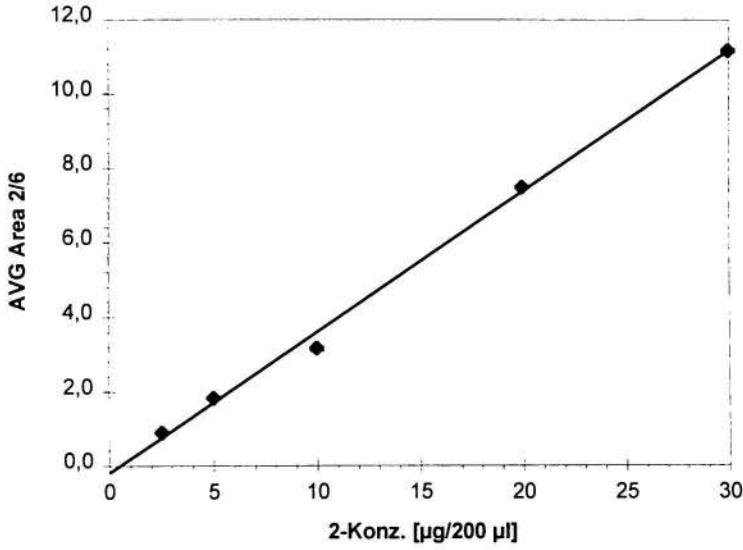


Abb. 17: Linearität von D-21440 (2) gegenüber dem internen Standard Ketamin (6) vor Extraktion (AVG 2/6 ± SD, n = 3)

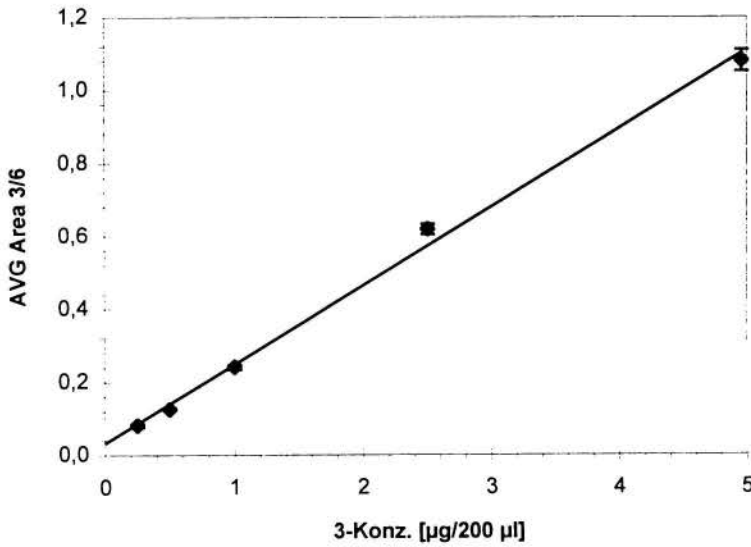


Abb. 18: Linearität von D-22258 (3) gegenüber dem internen Standard Ketamin (6) vor Extraktion (AVG 3/6 ± SD, n = 3)

## 5.4.1.2 Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion

Die Linearität zwischen Konzentration und Peakflächenquotient aus den Areas der zu bestimmenden Substanzen und dem internen Standard muß zusätzlich auch nach Extraktion aus biologischen Proben überprüft werden. Hierdurch ist es möglich, Substanzverluste während der Extraktion aufgrund von Adsorptionen an die Matrix miteinzuberechnen. Es wurden Inkubationsansätze gemäß Kap. 6.2.1 mit steigenden Konzentrationen an **1**, **2** und **3** sowie einer konstanten Menge an **6** versetzt und anschließend nach der in Kap. 5.3.1 beschriebenen Methode extrahiert. Die Chromatographie erfolgte nach Kap. 5.1. Die Berechnung der Peakflächenquotienten gegenüber den Konzentrationen ergab lineare Zusammenhänge (Abb. 19-21).

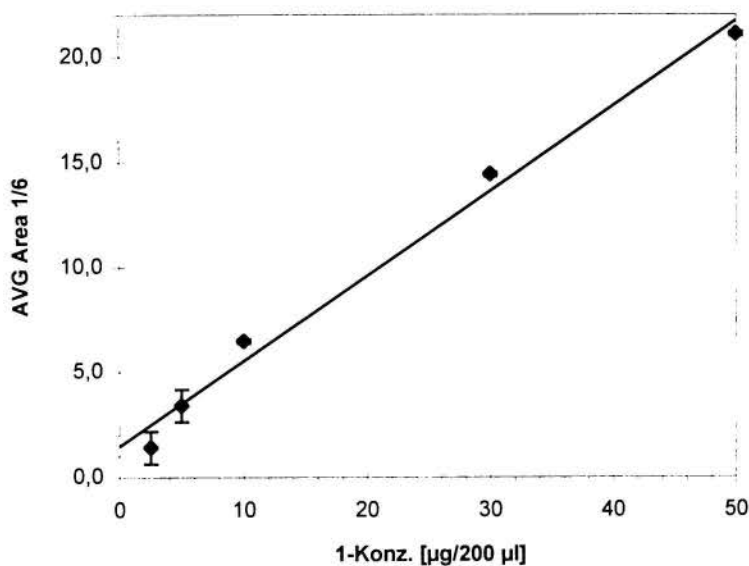


Abb. 19: Linearität von Flezelastin (**1**) gegenüber dem internen Standard Ketamin (**6**) nach Extraktion (AVG 1/6  $\pm$  SD, n = 3)



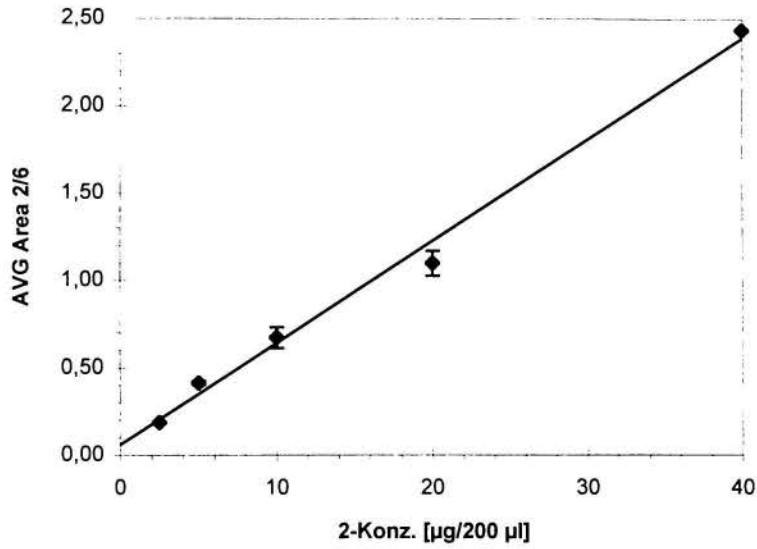


Abb. 20: Linearität von D-21440 (2) gegenüber dem internen Standard Ketamin (6) nach Extraktion (AVG 2/6  $\pm$  SD, n = 3)

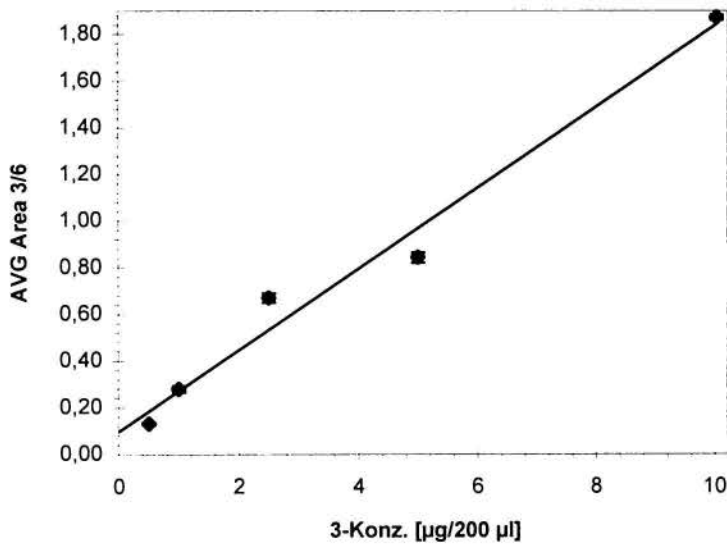


Abb. 21: Linearität von D-22258 (3) gegenüber dem internen Standard Ketamin (6) nach Extraktion (AVG 3/6  $\pm$  SD, n = 3)

## 5.4.2 Validierung der Analytik mit Fluoreszenzdetektion

### 5.4.2.1 Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion

Die Überprüfung der Linearität gegenüber dem internen Standard für die Fluoreszenzdetektion erfolgte wie unter Kap. 5.4.1.1 beschrieben. In Abweichung davon wurden sechs verschiedene Konzentrationen hergestellt, und als interner Standard wurde Azelastin (7) zugesetzt (vgl. Kap. 5.2.2). Die Abbildungen 22 bis 24 zeigen die sich ergebenden linearen Zusammenhänge.

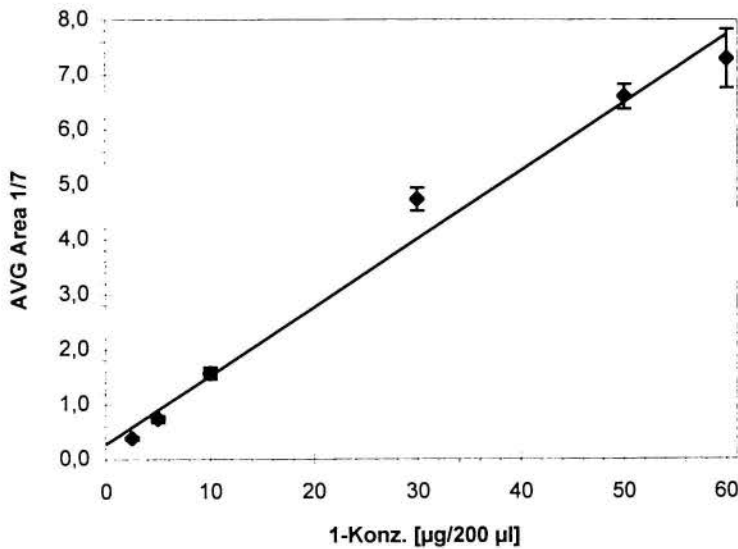


Abb. 22: Linearität von Flezelastin (1) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) vor Extraktion (AVG 1/7  $\pm$  SD, n = 6)

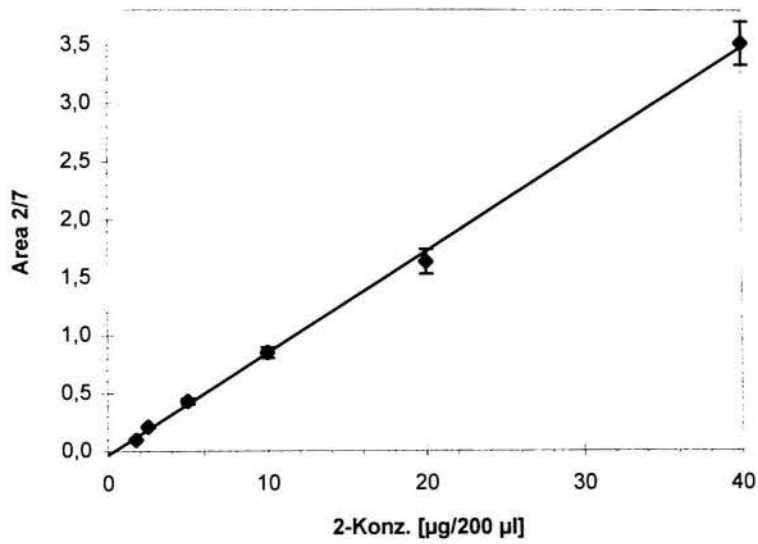


Abb. 23: Linearität von D-21440 (2) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) vor Extraktion (AVG 2/7  $\pm$  SD, n = 6)

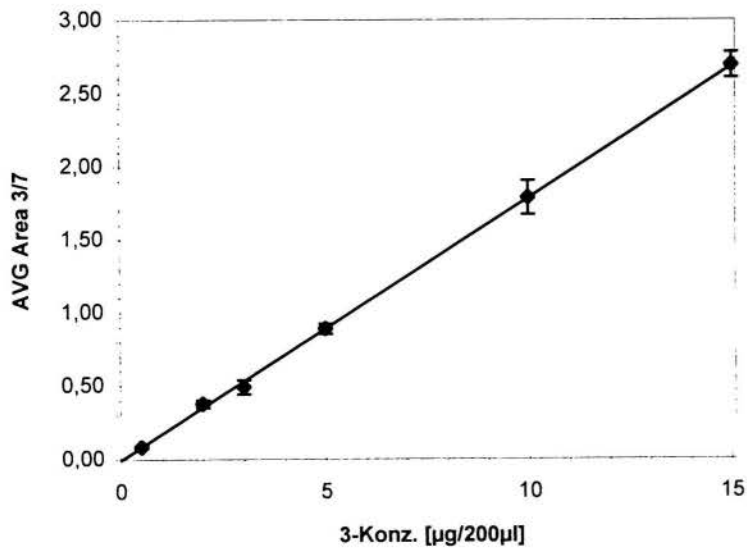


Abb. 24: Linearität von D-22258 (3) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) vor Extraktion (AVG 3/7  $\pm$  SD, n = 6)

## 5.4.2.2 Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion

Prinzipiell gelten die unter Kap. 5.4.1.2 gemachten Aussagen. Die Inkubationsansätze wurden abweichend davon für die Untersuchungen nach Kap. 6.2.2 mit einem NADPH-regenerierenden System hergestellt. Die Zugabe des internen Standards Azelastin (7) erfolgte nach der Extraktion gemäß Kap. 5.3.1, da es unter diesen Bedingungen unzuverlässig extrahiert wurde. Nach der Regressionsanalyse erster Ordnung wurden ebenfalls lineare Zusammenhänge erhalten (Abb. 25-27).

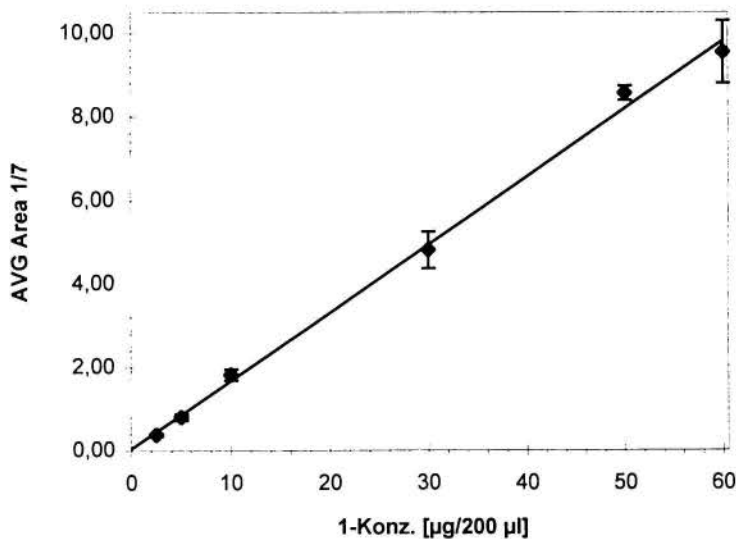


Abb. 25: Linearität von Flezelastin (1) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) nach Extraktion (AVG 1/7  $\pm$  SD, n = 6)

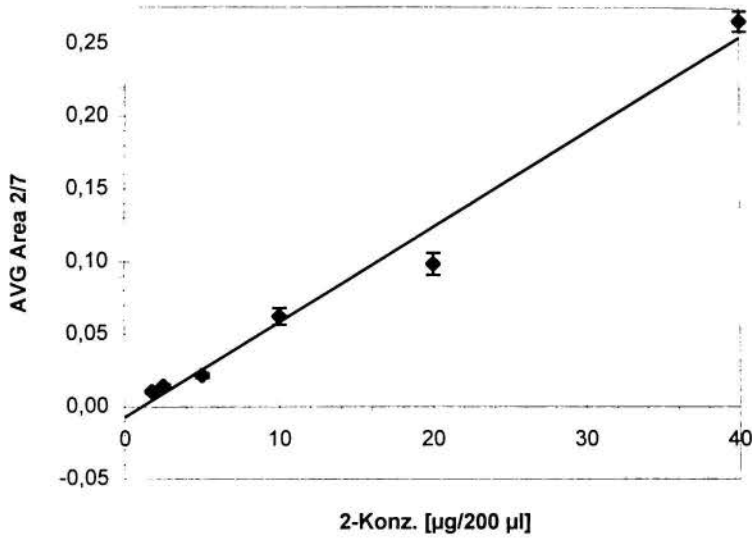


Abb. 26: Linearität von D-21440 (2) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) nach Extraktion (AVG 2/7  $\pm$  SD, n = 6)

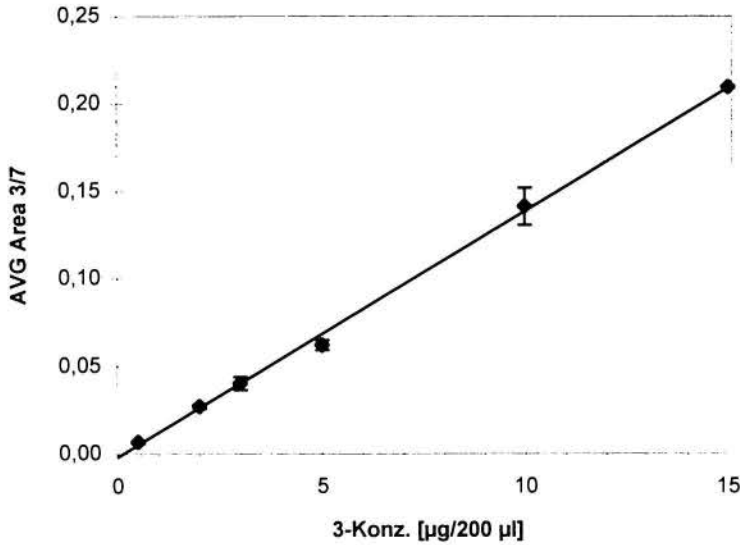


Abb. 27: Linearität von D-22258 (3) gegenüber dem internen Standard Azelastin (7) nach Extraktion (AVG 3/7  $\pm$  SD, n = 6)

### 5.4.3 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines Analysenverfahrens ist die kleinste Menge oder Konzentration eines Analyten, die noch mit hinreichender Sicherheit vom Untergrundrauschen unterschieden werden kann<sup>35</sup>. Sie wurde als Wert mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt.

Bei einem Injektionsvolumen von 20 µl lag die Nachweisgrenze für die UV-Detektion von Flezelastin (1) bei 10 ng „on column“ und für die Fluoreszenzdetektion bei 2,5 ng „on column“. Von D-21440 (2) konnten mit Fluoreszenzdetektion noch 5 ng „on column“ erkannt werden.

## **6 In vitro Untersuchungen zum Metabolismus des Flezelastins mit Hilfe von Leberzellfraktionen verschiedener Spezies**

Für die Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen kommen neben Tierversuchen auch Ersatz- und Ergänzungsmethoden in Frage, die einzelne Reaktionen des Gesamtorganismus ausführen können. Zu diesem Zwecke werden isolierte perfundierte Organe, isolierte und kultivierte Zellen der Organe sowie subzelluläre Strukturen und isolierte Enzyme<sup>36</sup> genutzt. Sie vermögen zwar nicht die Komplexität der Vorgänge im Organismus nachzuahmen, aber zur Aufklärung möglicher Metabolisierungsmuster und möglicher Stereoselektivitäten der Biotransformation können sie wertvolle Daten liefern.

In unserem Arbeitskreis ist seit einigen Jahren das Arbeiten mit subzellulären Fraktionen der Leber etabliert. Von allen Organen verfügt die Leber über die höchste Konzentration an Cytochrom P450, das membranständig im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und an den meisten Phase-I-Reaktionen beteiligt ist<sup>37</sup>. Die einzelnen Leberzellfraktionen werden nach Zerkleinerung und Homogenisierung des Lebergewebes durch differentielle Zentrifugation abgetrennt. Man erhält so die Mikrosomenfraktion, die die Bruchstücke des ER enthält, und das Cytosol, das nur im Zellsaft gelöste Enzyme beinhaltet.

### **6.1 Herstellung und Charakterisierung der Leberhomogenate**

Die Leberzellfraktionen wurden von Sprague-Dawley-Ratten, Rind und Schwein nach dem Verfahren von DAYER<sup>38</sup> gewonnen. Für die Untersuchungen mit dem Versuchstier Ratte lag eine Tierversuchsgenehmigung seitens der Bezirksregierung Münster (Aktenzeichen: 26.0834 (52/91)) vor.

Vor Gewinnung der subzellulären Fraktionen aus Rattenlebern wurden die meisten Tierchargen mit Phenobarbital induziert. Die Induktion führt zu einer Erhöhung des Lebergewichtes, des Einbaus von Aminosäuren, der Triglyceride und zu einer Proliferation des ER, woraus gleichzeitig ein Anstieg des Cytochrom P450-Gehalts resultiert<sup>37</sup>. Außerdem verschiebt sich das Isoenzymmuster zugunsten von CYP2B1, 2B2, 2C6 und 3A2<sup>39</sup>. Zu weiteren stimulierten Enzymen zählen auch die UDP-Glucuronyltransferase, die Glucose-6-phosphatdehydrogenase sowie die Epoxidhydratase<sup>37</sup>.

Die Lebern wurden nach Entnahme zerkleinert und mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Hierdurch zerreißen die Membranen des ER und bilden Vesikel. Darauf erfolgte zunächst ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 g, der Zellbruchstücke und Mitochondrien abtrennte. Der erhaltene Überstand (Supernatant) wurde bei 100.000 g zentrifugiert. Die Ultrazentrifugation führte zu einer Auftrennung des Supernatants in das Cytosol (Überstand) und die Mikrosomenfraktion (Pellet). Die Mikrosomen wurden in Puffer resuspendiert und ebenso wie die anderen Fraktionen bei -20°C gelagert.

Zur Charakterisierung der Leberzellfraktionen wurde der Proteingehalt nach der von BRADFORD<sup>40</sup> entwickelten Methode bestimmt. Sie beruht auf der photometrischen Auswertung einer Farbreaktion der Proteine mit dem Reagenz Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Konzentrationen wurden anhand einer Kalibriergeraden mit Boviserin berechnet.



## 6.2 Inkubationsbedingungen

### 6.2.1 Inkubationen mit direkter Zugabe von NADPH

Zur Untersuchung der Biotransformation wurden Inkubationsansätze hergestellt, die aus dem umzusetzenden Substrat, der Enzymquelle und den darüber hinaus notwendigen Kofaktoren bestanden. Unbedingt zugesetzt werden mußten Magnesiumchlorid-Lösung und NADPH als Reduktionsäquivalent. Die NADPH-Lösung wurde aus Stabilitätsgründen vor jeder Versuchsreihe neu hergestellt. Die benötigte Menge an Leberzellhomogenat wurde jeweils frisch aufgetaut. Die Bestandteile der Inkubationsansätze wurden in der stets gleichen Reihenfolge Substrat, Magnesiumchlorid-Lösung, Enzymquelle, Puffer- und NADPH-Lösung in 10 ml Normalschliffgläser pipettiert. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 37°C im Wasserbad, wobei durch ständiges Rühren eine gute Durchmischung sowie Belüftung gegeben war. Zur Beendigung aller enzymatischen Reaktionen wurden die Inkubationen schnell im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Danach schloß sich direkt die Aufarbeitung entsprechend Kap. 5.3.1 an.

### 6.2.2 Inkubationen mit einem NADPH-regenerierenden System

Für Langzeitinkubationen bis zu 48 Stunden wurde die Zusammensetzung der Inkubationsansätze variiert. Um aufwendige und teure zusätzliche NADPH-Zugaben zu vermeiden, wurde mit einem NADPH-regenerierenden System<sup>41</sup> gearbeitet, welches während der Umsetzungen verbrauchtes NADPH aus NADP und Isocitronensäure mittels der Isocitratdehydrogenase zurückbildete. Das regenerierende System wurde in größeren Ansätzen, die alle erforderlichen Kofaktoren enthielten, hergestellt und jeweils Aliquots bei -20°C eingefroren, die bei Bedarf frisch aufgetaut wurden. Auch hier wurden in immer gleicher Reihenfolge

das Substrat, die Proteinquelle und das regenerierende System in ein 10 ml Normalschliffglas pipettiert. Die weitere Behandlung der Ansätze erfolgte analog Kap. 6.2.1.

### 6.2.3 Variation der Inkubationszeit

Die Substratabnahme des Flezelastins wurde nach Inkubation mit induzierten Rattenlebermikrosomen über einen Zeitraum von 4 Stunden beobachtet. Die stärkste Abnahme fand bereits innerhalb der ersten 30 Minuten statt. Gleichzeitig war festzustellen, daß eine Inkubationsdauer von über 2 Stunden keine weitere Steigerung der Umsetzung des Flezelastins zu erzielen vermochte (Abb. 28).

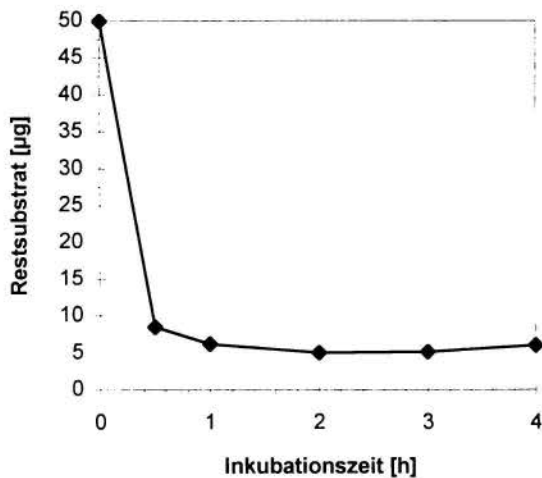


Abb. 28: Bestimmung des Restsubstrats nach unterschiedlicher Inkubationsdauer

### 6.2.4 Variation der Proteinmenge

Weiterhin wurde der Einfluß der eingesetzten Proteinmenge in den Inkubationsansätzen auf die Metabolisierung des Flezelastins überprüft. Es zeigte sich, daß größere Proteinmengen die Umsetzung nicht überproportional steigern konnten und somit eine Menge von 0,8-1,5 mg Protein pro Ansatz ausreichend war (Abb. 29).

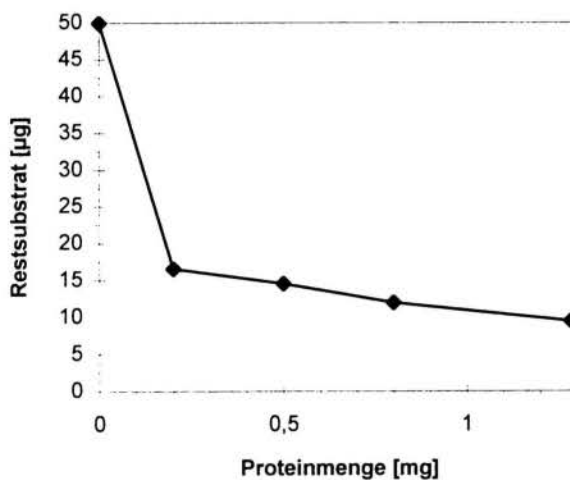


Abb. 29: Bestimmung des Restsubstrats nach Umsetzung mit verschiedenen Proteinmengen

### 6.2.5 Variation des NADPH-Zusatzes

Die Cytochrom P450-abhängige Oxygenierung verläuft in einem Reaktionszyklus, für den die Anwesenheit des NADPH als Überträger von Elektronen essentiell ist<sup>42</sup>. Durch Variation der zugesetzten Menge konnte seine Bedeutung für oxidative Biotransformationsreaktionen verdeutlicht werden. Es wurden Inkubationen mit steigendem molarem Überschuß an NADPH - im Verhältnis zum eingesetzten

Substrat - durchgeführt. Die Bildung der beiden Metaboliten D-21440 (**2**) und D-22258 (**3**) zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten NADPH (Abb. 30). Ab ca. einem 10fachen Überschuß war die Steigerung der Metabolisierung nur noch marginal, so daß in den weiteren Untersuchungen ein Überschuß dieser Größenordnung eingesetzt wurde.

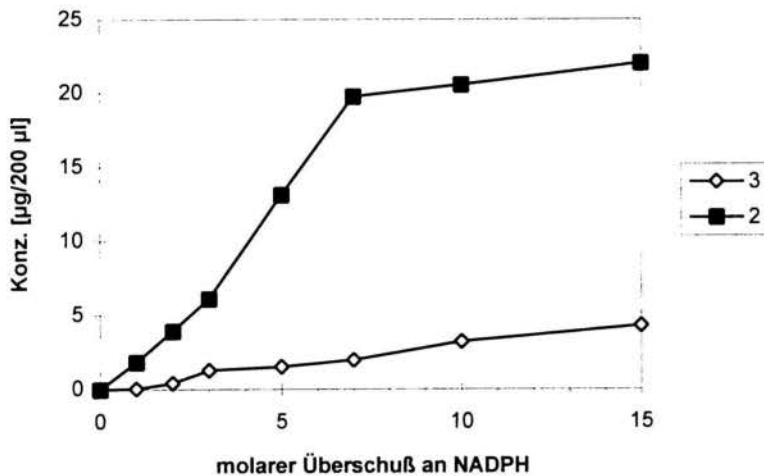


Abb. 30: Abhängigkeit der Metabolisierung vom NADPH-Zusatz

### 6.2.6 Variation des pH-Wertes des Inkubationsmediums

Über die Auswirkungen einer Variation des pH-Wertes auf die Metabolisierung von Xenobiotika lassen sich Aussagen bezüglich der an den Oxidationsvorgängen beteiligten Monooxygenasen treffen. Für Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen liegt das pH-Optimum in einem Bereich von pH 7,4 bis 7,8, während das der FAD-haltigen über pH 8,3 liegt<sup>43</sup>.

Für die Untersuchungen wurde das Puffermedium bei Raumtemperatur auf verschiedene pH-Werte im Bereich von 7,0 bis 8,6 eingestellt. Unter Betrachtung der Substratabnahme konnte man ein Maximum der Metabolisierung in einem pH-Bereich von 7,8 bis 8,3 feststellen (Abb. 31). Dies deutete auf eine Beteiligung beider Monooxygenasen am Metabolismus des Flezelastins hin. Beschrieben wird diese Tatsache auch für andere sekundäre und tertiäre Amine, wobei das Cytochrom P450 N-Desalkylierungen und die FAD-haltige Monooxygenase N-Oxidationen katalysiert<sup>43</sup>.

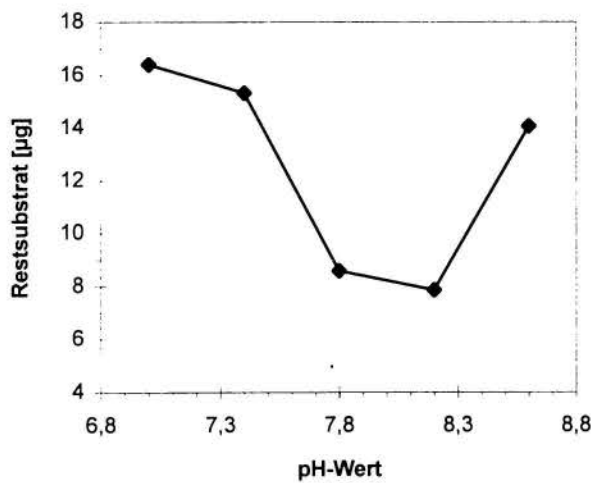


Abb. 31: Bestimmung des Restsubstrats in Abhängigkeit vom pH-Wert

### **6.3 Ergebnisse der Inkubationen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies**

Für Biotransformationsuntersuchungen an subzellulären Systemen standen Mikrosomenpräparationen von Ratte, Rind, Schwein und Mensch zur Verfügung. Die Ergebnisse der Inkubationen sollten neben der Aufklärung des Metabolismus von Flezelastin in verschiedenen Spezies auch durch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Humanmikrosomen aufdecken, welches in vitro Modell am ehesten auf den Menschen übertragen werden kann.

Als Substrate dienten jeweils razemisches Flezelastin sowie die reinen Enantiomere. Eine achirale quantitative Bestimmung der Metaboliten und des Restsubstrats erfolgte an der LiChrospher<sup>®</sup> Si-60-Phase (s. Kap. 5.1). Außerdem wurden nach Inkubation des Razemates die Enantiomerenverhältnisse von **1** und **2** mittels einer HPLC- und einer CZE-Methode vermessen (s. Kap. 8).

#### **6.3.1 Vergleich zwischen induzierten und nichtinduzierten Leberzellfraktionen der Ratte**

Zunächst sollte überprüft werden, welche der Leberzellfraktionen Cytosol, Supernatant oder Mikrosomen die höchste Umsatzrate zeigte. Gleichzeitig wurde auch der Einfluß der Induktion mit Phenobarbital untersucht.

Wie aufgrund der Enzyumdichte der Fraktionen zu erwarten war, ließen sich mit den Mikrosomen die höchsten Metabolisierungsraten erzielen. Das Cytosol setzte nur einen ganz geringen Anteil Flezelastin zu seinen Metaboliten um, während der Supernatant durchaus für Studien eingesetzt werden konnte. Das Metabolitenspektrum war jedoch bei allen drei Präparationen identisch.

Ähnlich verhielt es sich auch mit den Auswirkungen der Induktion auf die Biotransformation von Flezelastin: Bei allen Leberfraktionen war eine gesteigerte Umsetzung zu beobachten, die ebenfalls keine qualitativen Veränderungen bezüglich der gebildeten Metaboliten hervorrief.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die nachfolgenden Untersuchungen jeweils Mikrosomenpräparationen der verschiedenen Spezies - bei der Ratte zusätzlich induzierte - eingesetzt.

### 6.3.2 Inkubationen von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Zur Untersuchung der Biotransformation von Flezelastin (**1**) mit induzierten Rattenlebermikrosomen wurden zunächst zweistündige Inkubationen mit direkter Zugabe von NADPH entsprechend Kap. 6.2.1 durchgeführt. Die chromatographische Auswertung (Abb. 32) zeigte die Bildung von drei Metaboliten. Zwei von ihnen konnten aufgrund ihrer massenspektrometrischen Daten (s. Kap. 7.5.1) als D-21440 (**2**) und D-22258 (**3**) bestätigt werden. Der dritte Metabolit **X** wies in massenspektrometrischen Untersuchungen einen um 16 Masseneinheiten höheren Molekularpeak als **1** auf, so daß es sich um einen hydroxylierten Metaboliten (**4**) oder um das N-Oxid (**5**) handeln könnte. Die weitere Diskussion der Strukturaufklärung erfolgt in Kapitel 7.

Als Substrate der Inkubationen wurden racemisches **1** sowie die reinen Enantiomere eingesetzt. Das (+)-Enantiomer wurde stärker umgesetzt als das (-)-Enantiomer. Des weiteren wurden quantitative Unterschiede in der Bildung der einzelnen Metaboliten sichtbar. Aus (-)-**1** ging mehr **3** und etwas mehr an **2** hervor als aus (+)-**1**, während aus (+)-**1** im Vergleich zum Antipoden eine größere Menge an Metabolit **X** entstand (Abb. 33, 34). Die Umsetzung von *rac*-**1** lieferte Werte, die zwischen denen der einzelnen Enantiomere lagen.

Da der Metabolit **X** nicht als Vergleichssubstanz vorlag, konnten keine absoluten Konzentrationen angegeben werden. Die betreffenden Diagramme zeigen den Peakflächenquotienten aus **X** und dem internen Standard.

Die Basislinie fiel bei der hier noch verwendeten UV-Detektion im analytischen Fenster stark ab. Dies war bei der später verwendeten Fluoreszenzdetektion nicht mehr der Fall (vgl. Abb. 35 auf S.49).

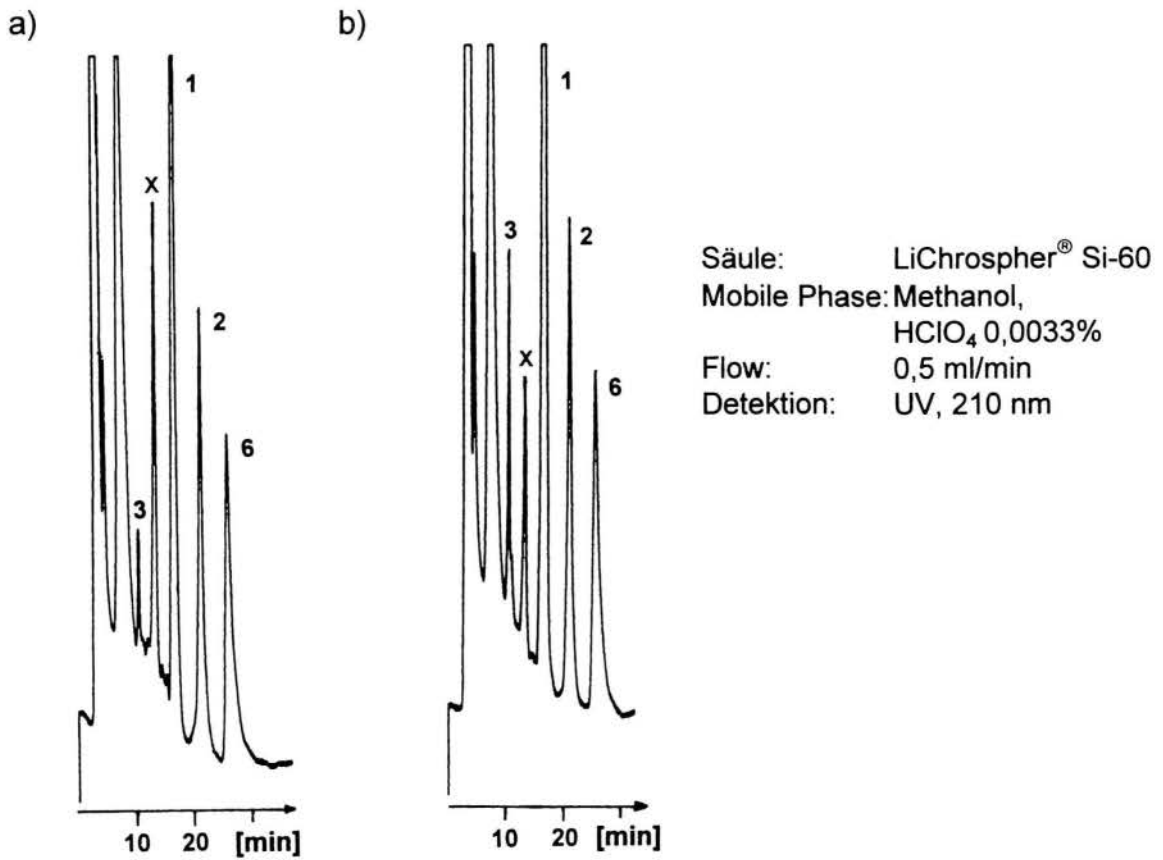


Abb. 32: Chromatogramme nach Inkubation von a) (+)-1 und b) (-)-1 mit induzierten Rattenlebermikrosomen (2 h)

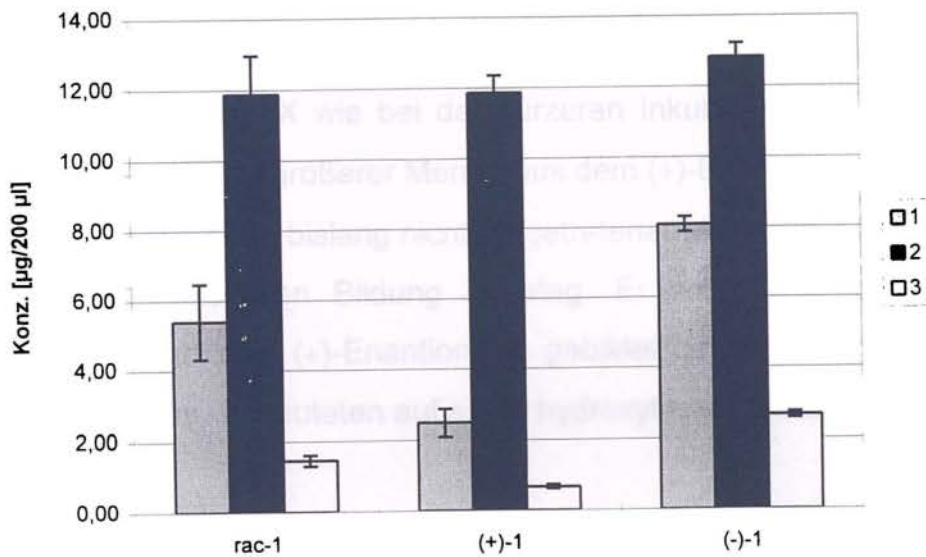


Abb. 33: Quantitative Bestimmung des Restsubstrats 1 und der Metaboliten 2 und 3 nach Inkubation (2 h) von *rac*-, (+)- und (-)-1 mit induzierten Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)



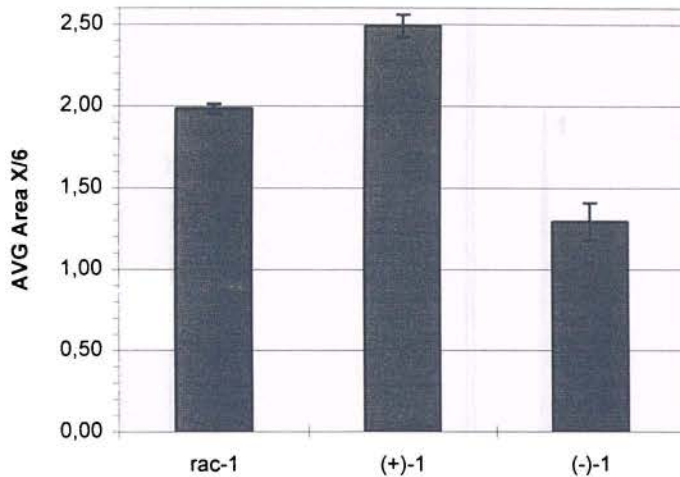


Abb. 34: Bestimmung der Peakflächenverhältnisse des Peaks **X** zum internen Standard **6** nach Inkubation (2 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

Neben Umsetzungen mit einer Dauer von zwei Stunden wurde Flezelastin (**1**) auch 24 Stunden inkubiert (Abb. 35-37). Durch die Verlängerung der Inkubationszeit konnte die Umsetzungsrate gesteigert werden. Ebenso wie bei der zweistündigen Inkubation wurde das (+)-Enantiomer etwas stärker metabolisiert. Während Metabolit **3** nun von beiden Antipoden in gleichem Ausmaß gebildet wurde, entstand Metabolit **X** wie bei der kürzeren Inkubationszeit bevorzugt aus (+)-**1**. Metabolit **2** ging in größerer Menge aus dem (+)-Enantiomer hervor.

Weiterhin konnte ein bislang nicht aufgetretener Metabolit **8** detektiert werden, der einer stereoselektiven Bildung unterlag. Er wurde nur bei Inkubationen des Razemats und des (+)-Enantiomers gebildet. Untersuchungen zur Strukturaufklärung (s. Kap. 7) deuteten auf einen hydroxylierten Metaboliten von **2** hin.

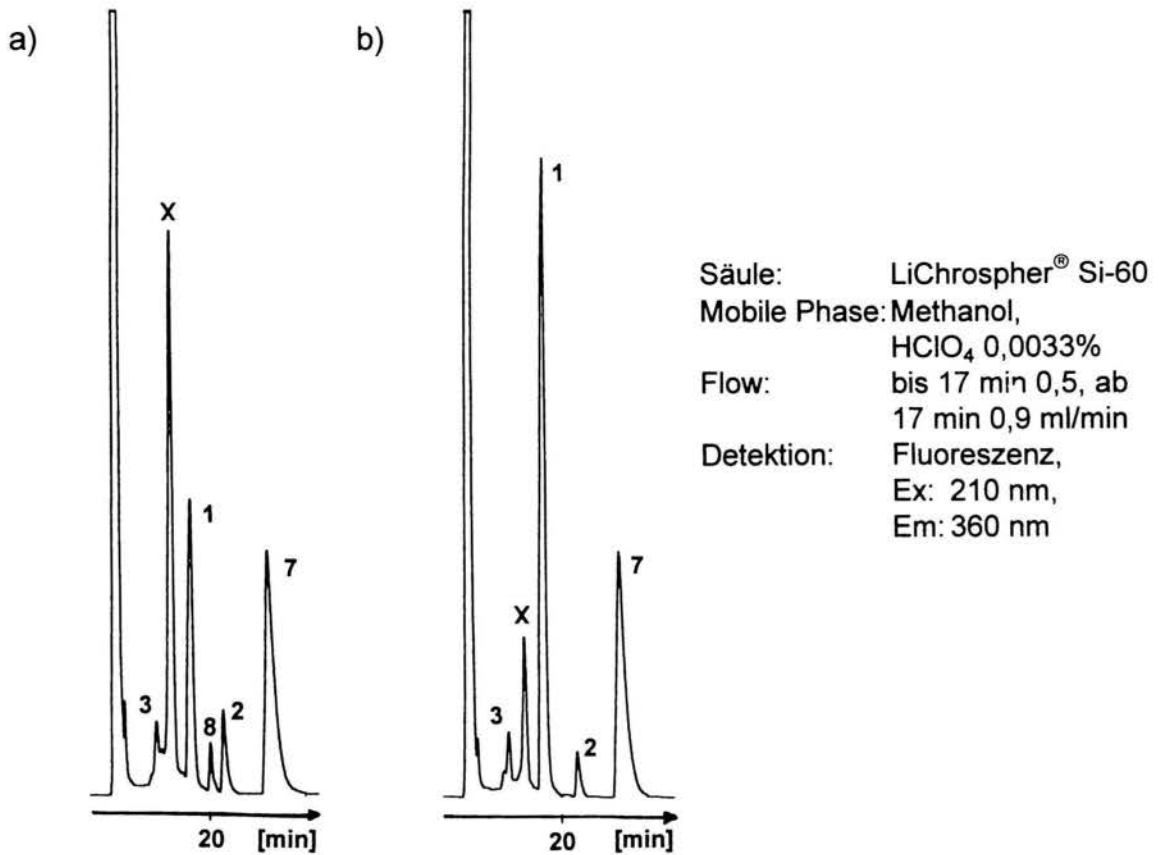


Abb. 35: Chromatogramme nach Inkubation von a) (+)-1 und b) (-)-1 mit induzierten Rattenlebermikrosomen (24 h)

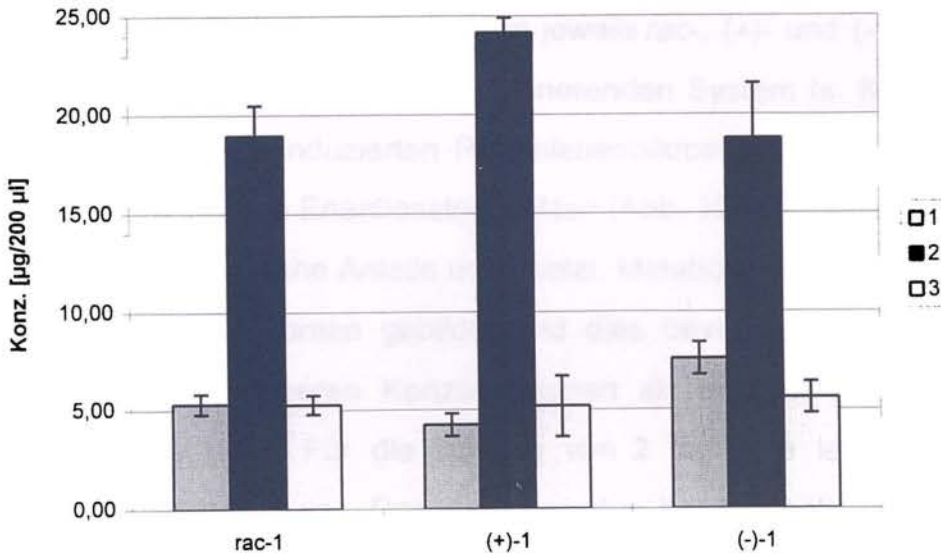


Abb. 36: Quantitative Bestimmung des Restsubstrats 1 und der Metaboliten 2 und 3 nach Inkubation (24 h) von rac-, (+)- und (-)-1 mit induzierten Rattenlebermikrosomen (± SD)

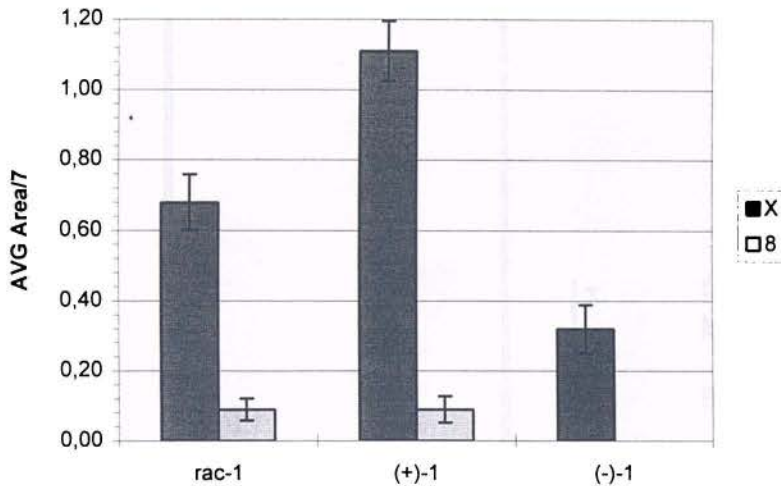


Abb. 37: Bestimmung der Peakflächenverhältnisse der Metaboliten **X** und **8** zum internen Standard **7** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

### 6.3.3 Inkubationen von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen

Für die Untersuchung der möglichen Metabolisierung beim Menschen und der Übertragbarkeit der Ergebnisse anderer *in vitro* Modelle wurden Inkubationen mit Humanlebermikrosomen durchgeführt, die von der Firma ASTA Medica zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden jeweils *rac*-, (+)- und (-)-Flezelastin (**1**) für 24 Stunden mit einem NADPH-regenerierenden System (s. Kap. 6.2.2) inkubiert. Die im Vergleich zu induzierten Rattenlebermikrosomen schlechtere Gesamtumsetzung zeigte andere Enantioselektivitäten (Abb. 38-40). Sowohl von (+)- als auch von (-)-**1** wurden gleiche Anteile umgesetzt. Metabolit **3** wurde in stärkerem Maße als mit Rattenmikrosomen gebildet und dies bevorzugt aus (+)-**1**, wohingegen Metabolit **X** in geringeren Konzentrationen als bei der Ratte auftrat und hier bevorzugt aus (-)-**1**. Für die Bildung von **2** lag eine leichte Präferenz beim (-)-Enantiomer von **1** vor. Das Auftreten des bei Inkubationen mit Rattenmikrosomen stereoselektiv gebildeten Metaboliten **8** konnte nicht beobachtet werden.

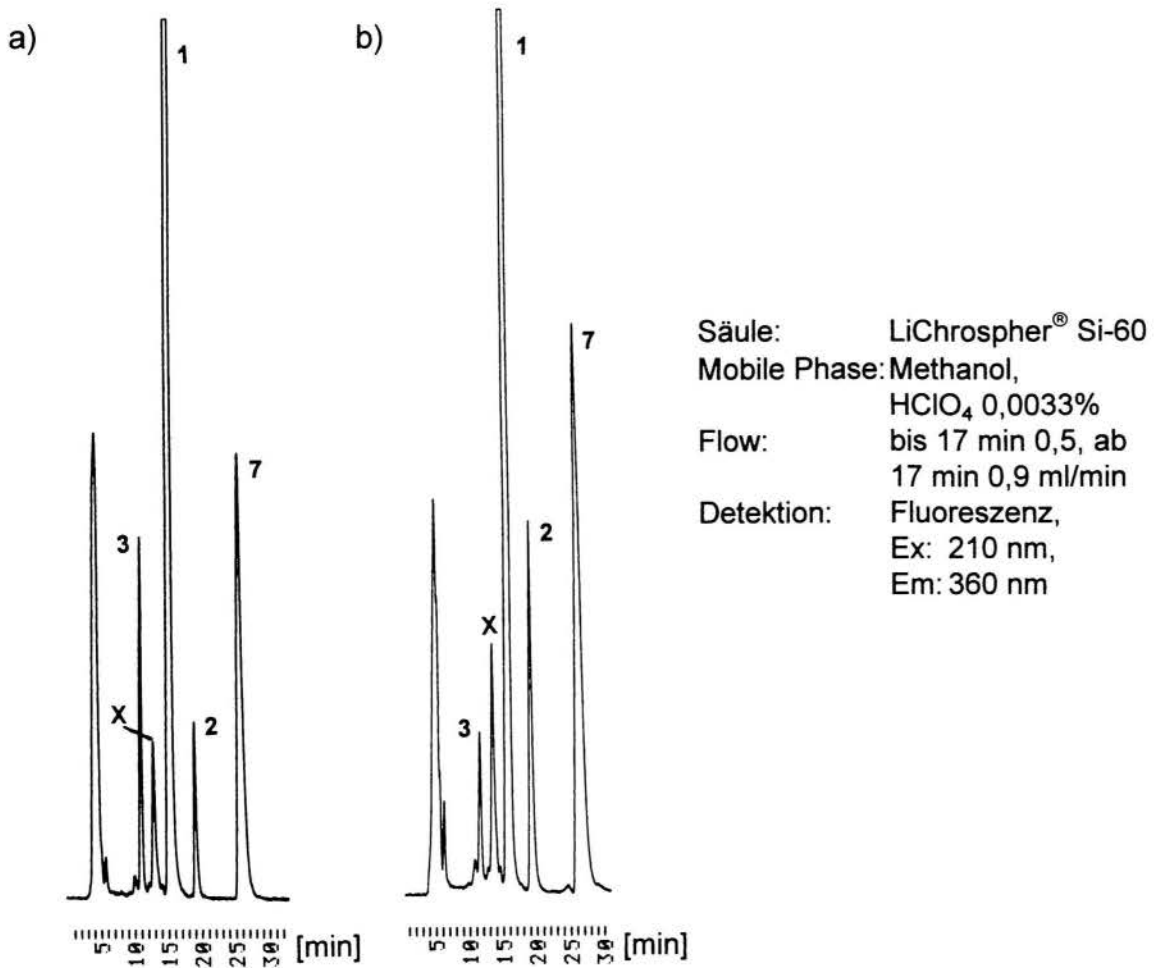


Abb. 38: Chromatogramme nach Inkubation von a) (+)-1 und b) (-)-1 mit Humanlebermikrosomen (24 h)

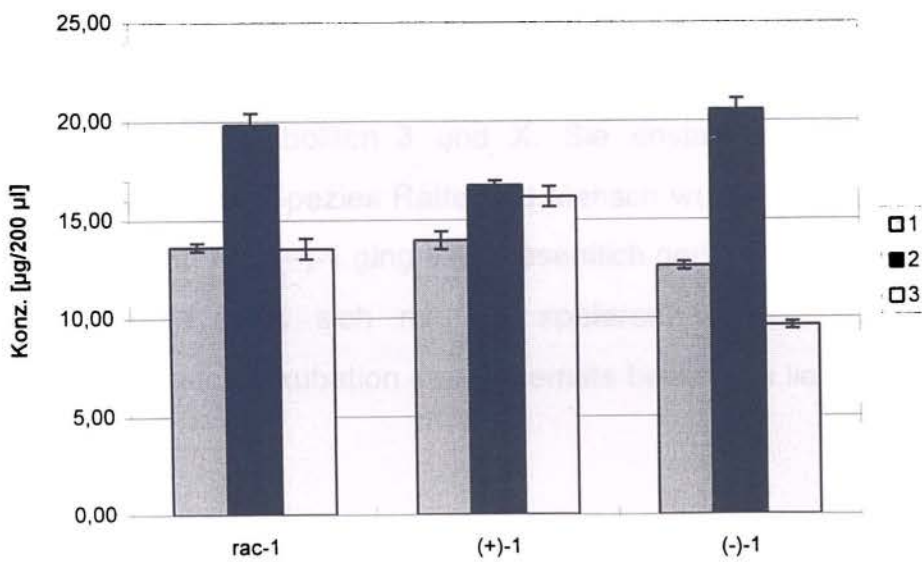


Abb. 39: Quantitative Bestimmung des Restsubstrats 1 und der Metaboliten 2 und 3 nach Inkubation (24 h) von rac-, (+)- und (-)-1 mit Humanlebermikrosomen (± SD)



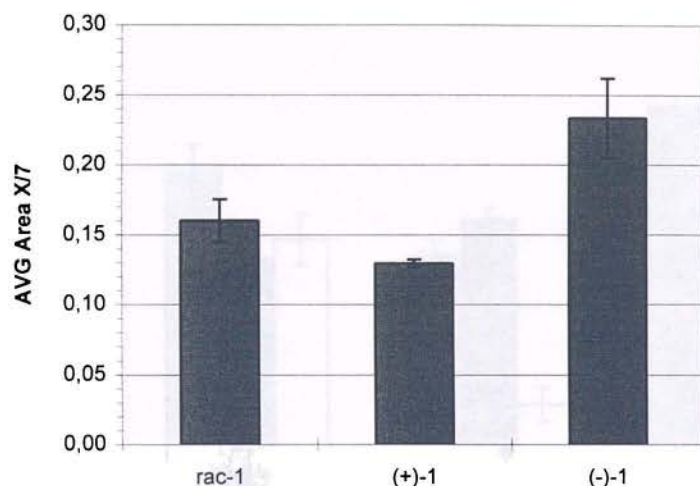


Abb. 40: Bestimmung der Peakflächenverhältnisse des Metaboliten **X** zum internen Standard **7** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit Humanlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

#### 6.3.4 Inkubationen von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen

Die enantioselektive Metabolisierung von Flezelastin (**1**) wurde an einer weiteren Tierspezies untersucht. Es wurden sowohl das Razemat als auch die reinen Enantiomere mit Rinderlebermikrosomen für 24 Stunden inkubiert (Abb. 41, 42). Die quantitative Auswertung der Metabolisierung zeigte eine deutliche Verschiebung zu den Metaboliten **3** und **X**. Sie entstanden bevorzugt aus (-)-**1**. Im Gegensatz zu den Spezies Ratte und Mensch wurde Metabolit **2** nur in geringem Maße gebildet. Aus (-)-**1** ging eine wesentlich geringere Konzentration an **2** hervor als aus (+)-**1**, was sich mit der späteren Vermessung der Enantiomerenverhältnisse nach Inkubation des Razemats bestätigen ließ (s. Kap. 8).

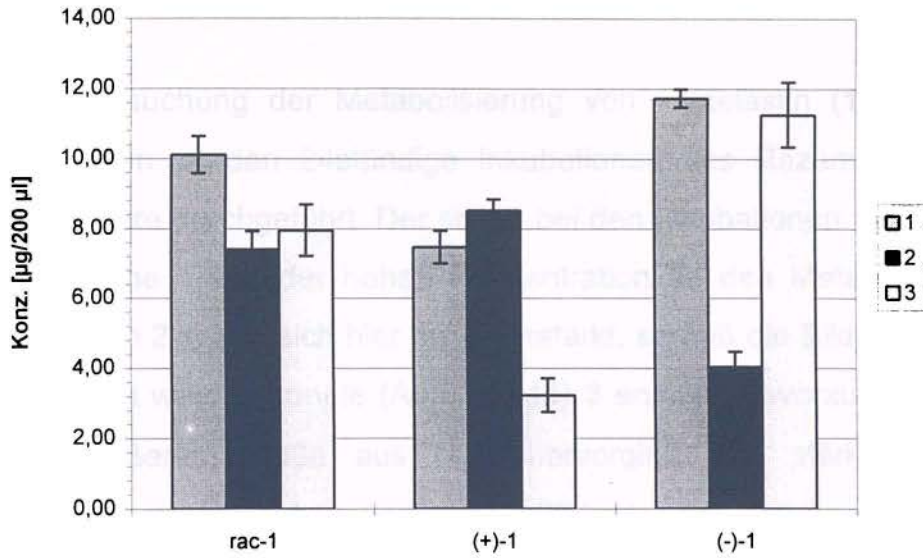


Abb. 41: Quantitative Bestimmung des Restsubstrats **1** und der Metaboliten **2** und **3** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit Rinderlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

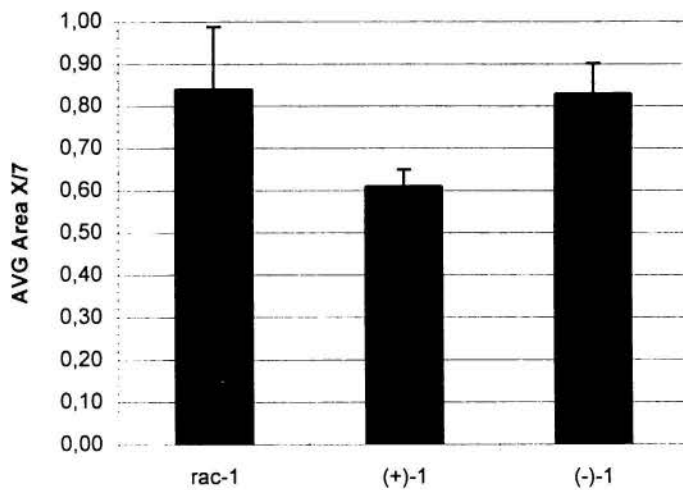


Abb. 42: Bestimmung der Peakflächenverhältnisse des Metaboliten **X** zum internen Standard **7** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit induzierten Rinderlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

### 6.3.5 Inkubationen von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen

Zur Untersuchung der Metabolisierung von Flezelastin (**1**) mit Schweinelebermikrosomen wurden 24stündige Inkubationen des Razemats sowie der reinen Enantiomere durchgeführt. Der schon bei den Inkubationen mit Rindermikrosomen aufgetretene Trend der hohen Konzentration an den Metaboliten **3** und **X** auf Kosten von **2** zeigte sich hier noch verstärkt, so daß die Bildung von **2** nicht mehr beobachtet werden konnte (Abb. 43, 44). **3** entstand bevorzugt aus (-)-**1**, während **X** in größerem Maße aus (+)-**1** hervorging. Die stärkere Umsetzung des (-)-Enantiomers von **1** konnte auch mittels der chiralen Analytik der Inkubationen bestätigt werden (s. Kap. 8).

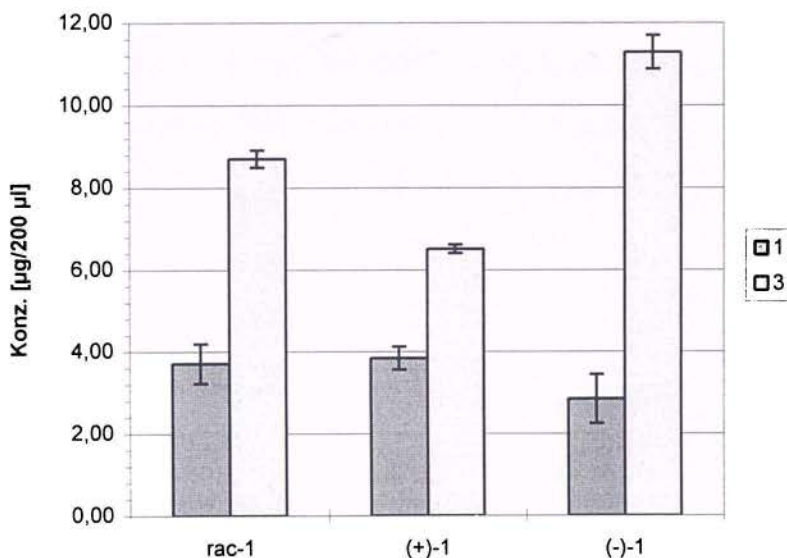


Abb. 43: Quantitative Bestimmung des Restsubstrats **1** und der Metaboliten **2** und **3** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit Schweinelebermikrosomen ( $\pm$  SD)

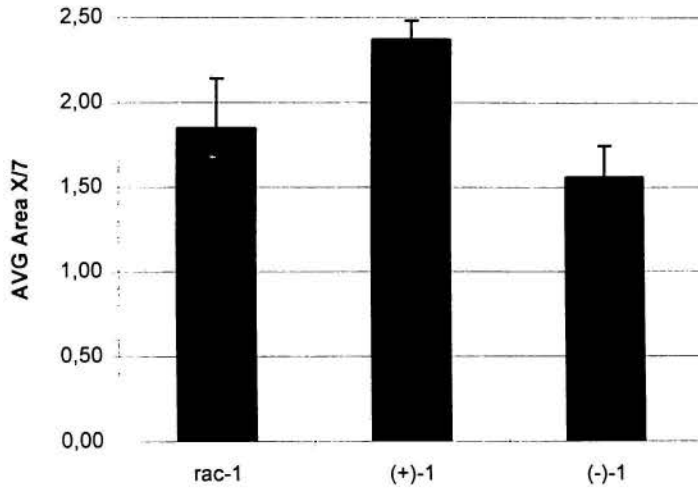


Abb. 44: Bestimmung der Peakflächenverhältnisse des Metaboliten **X** zum internen Standard **7** nach Inkubation (24 h) von *rac*-, (+)- und (-)-**1** mit induzierten Schweinelebermikrosomen ( $\pm$  SD)



## 7 Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Metaboliten

### 7.1 Synthese des Flezelastin-N-Oxids

Zur Strukturaufklärung des in den Inkubationen des Flezelastins (**1**) mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies auftretenden Metaboliten **X** wurde das N-Oxid von **1** (**5**) hergestellt. Es sollte als Vergleichssubstanz für chromatographische sowie massenspektrometrische Messungen dienen.

Die Synthese von **5** erfolgte gemäß allgemeinen Literaturvorschriften für die Oxidation von tertiären Aminen mit Wasserstoffperoxid<sup>44</sup> (Abb. 45). Da sich das entstandene N-Oxid vom nicht umgesetzten Amin bezüglich seiner Polarität und seiner Löslichkeit stark unterschied, konnte die Abtrennung von **1** durch Waschen mit Cyclohexan erzielt werden. Nach Einengen der wäßrigen Phase kristallisierte der verbleibende Rückstand in der Kälte aus.

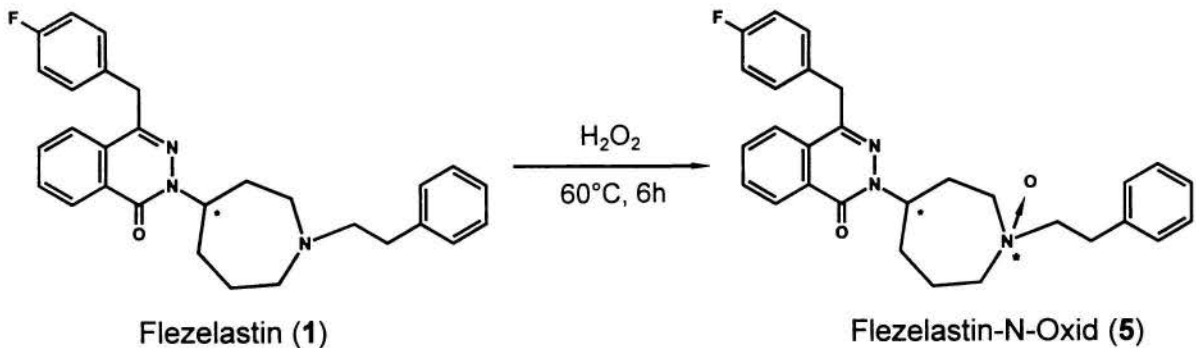


Abb. 45: Synthese des Flezelastin-N-Oxids (**5**)

Das so erhaltene **5** wurde per HPLC auf der LiChrospher<sup>®</sup> Si-60 analysiert. Es zeigte gleiches chromatographisches Verhalten wie der in den Inkubationen gebildete Metabolit **X**.

Durch die Addition des Sauerstoffs an den Stickstoff des Hexahydroazepinringes erhielt **5** ein zusätzliches chirales Zentrum. **5** konnte nur als ein Peak detektiert werden, da entweder die Kieselgelphase keine ausreichende Selektivität besaß, um die entstandenen Diastereomere zu trennen, oder selektiv nur eines der möglichen Diastereomere entstanden war.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen sind in Kap. 7.5.2 beschrieben.

Die Biotransformation von **1** zu seinem N-Oxid (**5**) war insofern wahrscheinlich, als bekannt ist, daß viele andere Pharmaka mit tertiärer Aminfunktion einer N-Oxidation unterliegen<sup>37</sup>. Zudem spielen N-Oxide auch als Intermediate bei der N-Dealkylierung eine Rolle<sup>14,37</sup>. Hingegen schien die Bildung des seitenkettenhydroxylierten Metaboliten **4** weniger wahrscheinlich, da in diesem Fall eine seltene Hydroxylierung in  $\beta$ -Stellung zur Aminogruppe stattfinden müßte<sup>45</sup>.

Weiterhin wurden bei der Untersuchung der Biotransformation von Azelastin (**7**) in Beagle-Hunden die beiden diastereomeren N-Oxide als Metaboliten identifiziert<sup>46</sup>, so daß das Auftreten der N-Oxide des Flezelastins aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zum Azelastin nahelag.

## 7.2 Inkubation von Desphenethylflezelastin mit Rattenlebermikrosomen

In Inkubationsansätzen von Flezelastin-Razemat und seinem (+)-Enantiomer mit induzierten Rattenlebermikrosomen war ein bislang unbekannter Metabolit **8** gefunden worden (s. Kap. 6.3.2), dessen massenspektrometrische Analyse einen Molekularpeak von  $m/z$  368 ergab (s. Kap. 7.5.2). Diese Masse war um 16 größer als diejenige von Desphenethylflezelastin (**2**), so daß es sich bei **8** um einen hydroxylierten Metaboliten von **2** handeln könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Inkubationsansätze entsprechend Kap. 6.2.2 mit **2** als Substrat durchgeführt.

Die chromatographische Auswertung ergab, daß aus **2** tatsächlich der Metabolit **8** hervorging. Dieser stellte den Hauptmetaboliten dar. Zusätzlich wurden noch zwei weitere kleinere Nebenmetaboliten detektiert (Abb. 46), die ebenfalls eine Masse von  $m/z$  368 aufwiesen (s. Kap. 7.5.2).

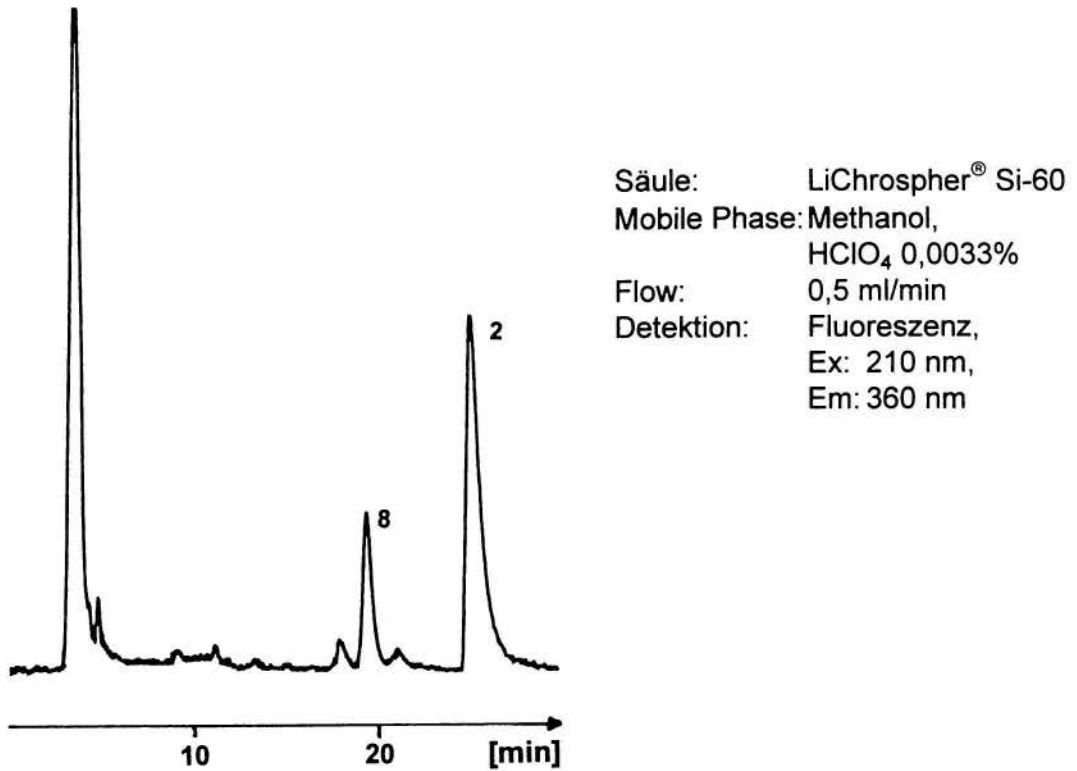


Abb. 46: Inkubation von D-21440 (**2**) mit induzierten Rattenlebermikrosomen

### 7.3 Umsetzungen mit einem Cytochrom P450 Modellsystem zur biomimetischen Monooxygenierung

Als Alternative zu Inkubationen mit Leberzellfraktionen können auch nicht biologische Methoden eingesetzt werden, um die Struktur möglicher Metaboliten aufzuklären. Es handelt sich hierbei um chemisch-katalytische Analogsysteme des Cytochrom P450, die Monooxygenierungen durchführen können<sup>35</sup>. Zu beachten ist, daß diese Systeme nicht allein aussagekräftig zur Vorhersage des Metabolismus von Arzneistoffen sind, da biologische und chemisch katalysierte Umsetzungen prinzipielle Unterschiede aufweisen.

Jedoch lassen sie sich zum Beispiel zur Gewinnung größerer Metabolitenmengen für Vergleichszwecke nutzen, falls gesichert ist, daß die entstandenen Verbindungen mit den physiologisch gebildeten übereinstimmen. Speziell für diese Anwendung wurde der Einsatz eines Modellsystems von LERCH<sup>47</sup> in unserer Arbeitsgruppe etabliert.

Die Modelle orientieren sich am katalytischen Zentrum des Cytochrom P450 und gehen davon aus, daß reaktive Eisen-Sauerstoff-Spezies für die Monooxygenierung verantwortlich sind<sup>48</sup>. Das hier eingesetzte System basierte auf einer Mischform aus den Reaktionen nach Udenfriend und Fenton<sup>49</sup>. D-21440 (**2**) wurde mit Eisen(II)-Sulfat und Ascorbinsäure in einem Puffermedium pH 6 unter Zusatz von Wasserstoffperoxid für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Extraktion erfolgte nach Zusatz von Carbonatpuffer mit Cyclohexan/Ethylacetat und gewährleistete eine Isolierung phenolischer Produkte. Im Chromatogramm der extrahierten Ansätze ließen sich zwei Produkte, die beide vor **2** eluierten, erkennen. Der in größerer Menge gebildete Metabolit stimmte im chromatographischen Verhalten mit dem aufzuklärenden Metaboliten **8** überein. Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, daß es sich bei **8** um einen hydroxylierten Metaboliten von **2** handeln könnte. Da die Fenton-Reaktion bevorzugt aromatische Hydroxylierungen katalysiert<sup>49</sup>, war darüber hinaus eine Hydroxylierung im Phthalazinon-Teil des Moleküls wahrscheinlich.

## 7.4 DAD-Spektren

Der Einsatz der Dioden-Array-Detektion (DAD) in der HPLC ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt eines Chromatogramms UV-Spektren aufzunehmen. Mit Hilfe dieser Spektren sind in einem gewissen Rahmen strukturelle Veränderungen gegenüber dem Grundmolekül zu erkennen. Die Einführung auxochromer Gruppen führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums. So müßte auch die postulierte aromatische Hydroxylgruppe des Metaboliten **8** eine Rotverschiebung bewirken. Inkubationsansätze von Flezelastin (**1**) und D-21440 (**2**) wurden unter Einsatz eines Dioden-Array-Detektors chromatographisch analysiert. Das UV-Spektrum des Metaboliten **8** zeigte gegenüber dem von **2** tatsächlich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums (Abb. 47). Dagegen stimmte das Spektrum des Metaboliten **X** mit dem von **1** überein, so daß in diesem Fall eine aromatische Hydroxylierung eher auszuschließen war.

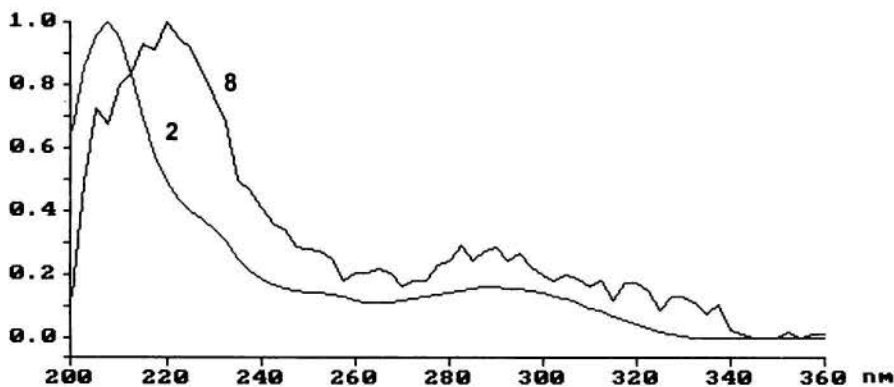


Abb. 47: UV-Spektren von **2** und **8**

## 7.5 Massenspektrometrie

Durch massenspektrometrische Messungen sollte die Identität der bekannten Metaboliten abgesichert sowie die Strukturen der noch nicht identifizierten Metaboliten weiter aufgeklärt werden. Alle folgenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Locher, ASTA Medica, Frankfurt am Main, durchgeführt.

### 7.5.1 Identität der bekannten Metaboliten

Zum Vergleich der Massenspektren der vorliegenden Verbindungen D-21440 (**2**) und D-22258 (**3**) mit denen der in den Inkubationsansätzen gebildeten Metaboliten wurde die Methode der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) herangezogen. Die Ionisation erfolgte mittels Elektrospray. Extrahierte Inkubationen konnten über eine Spritzenpumpe direkt aufgegeben werden, da das erste MS nur Ionen einer einzigen, frei wählbaren Masse durchließ, die dann in das zweite MS eingeleitet wurden und dort in ihre charakteristischen Tochterionen zerfielen. Molekularpeaks sowie Tochterfragmente von **2** und **3** stimmten mit denen der Metaboliten aus den Inkubationen überein (Abb. 48-51). Damit war ein endgültiger Beweis für die Struktur dieser beiden Metaboliten gegeben, die aus **1** in Umsetzungen mit Leberzellfraktionen hervorgegangen waren.

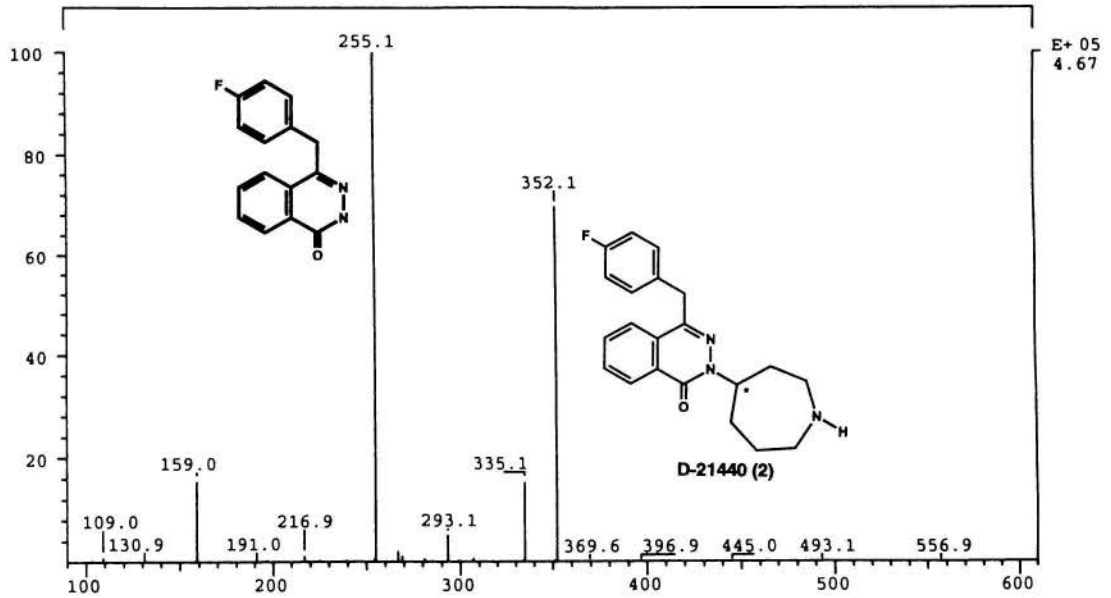


Abb. 48: Massenspektrum der Vergleichssubstanz 2

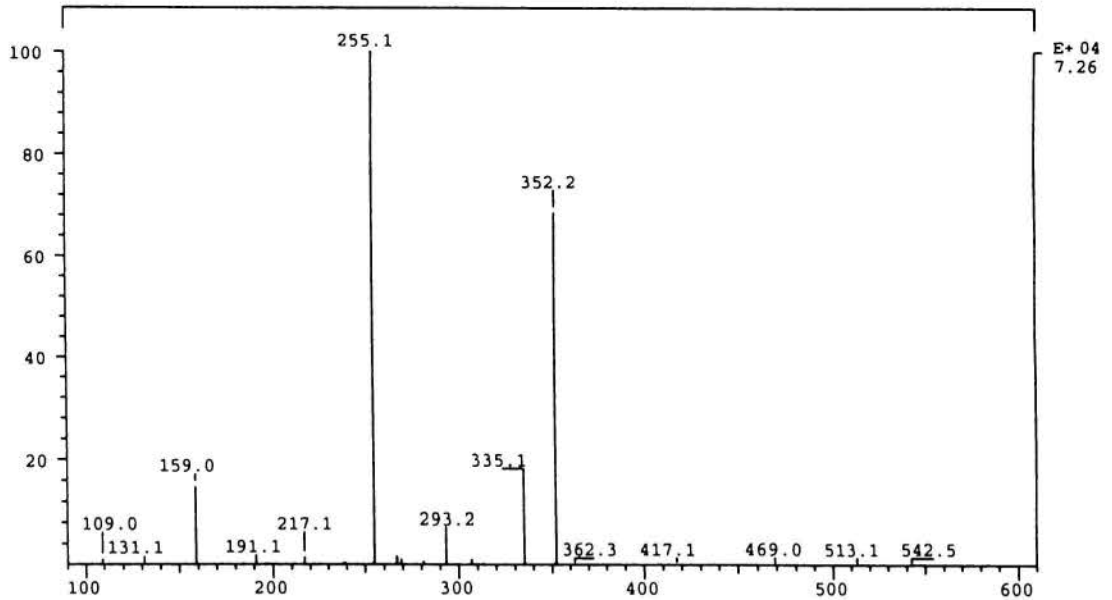


Abb. 49: Massenspektrum von 2 aus biologischer Probe

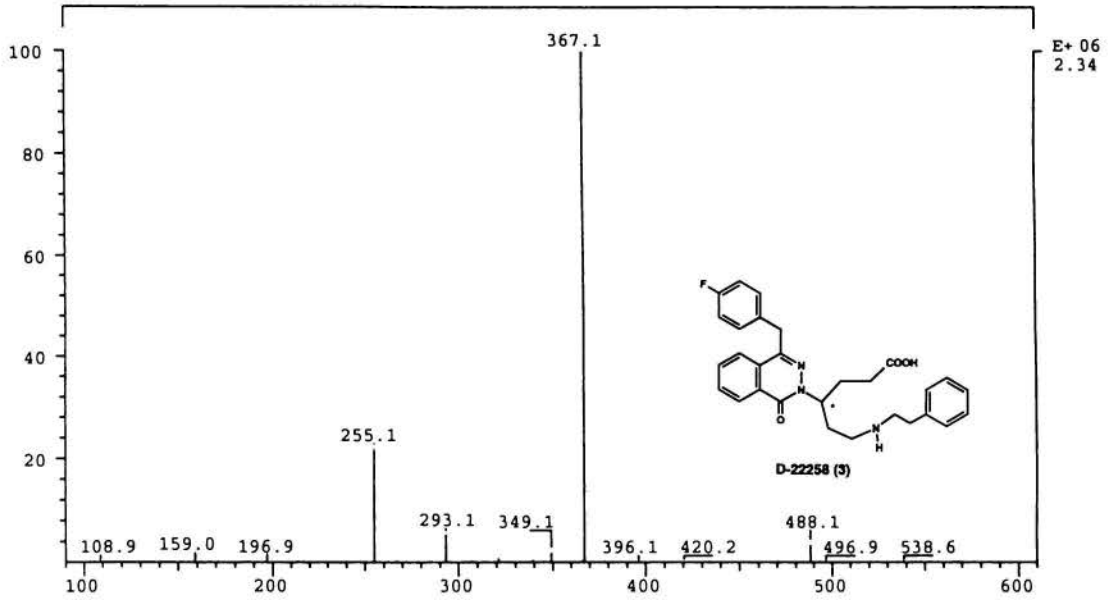


Abb. 50: Massenspektrum der Vergleichssubstanz 3

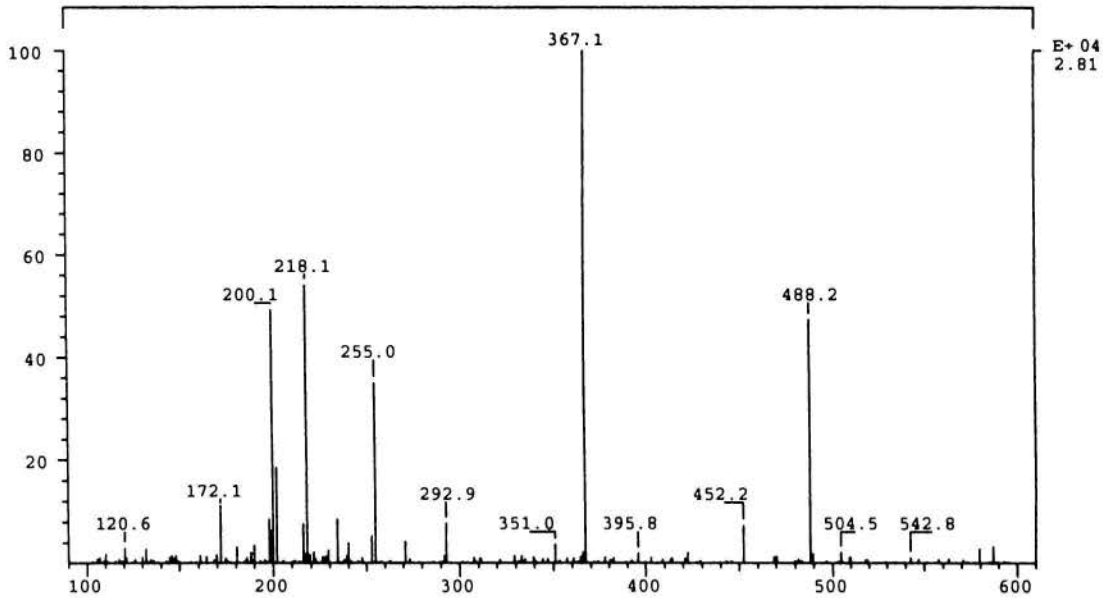


Abb. 51: Massenspektrum von 3 aus biologischer Probe



### 7.5.2 Massenspektrometrische Untersuchungen der unbekanntem Metaboliten

Zur Aufklärung der Identität des Metaboliten **X** war als Vergleichssubstanz das N-Oxid des Flezelastins (**5**) synthetisiert worden (s. Kap. 7.1). Wie zuvor (s. Kap. 7.5.1) wurden MS/MS-Messungen von **5** und vergleichend von einer inkubierten Probe durchgeführt (Abb. 52, 53).

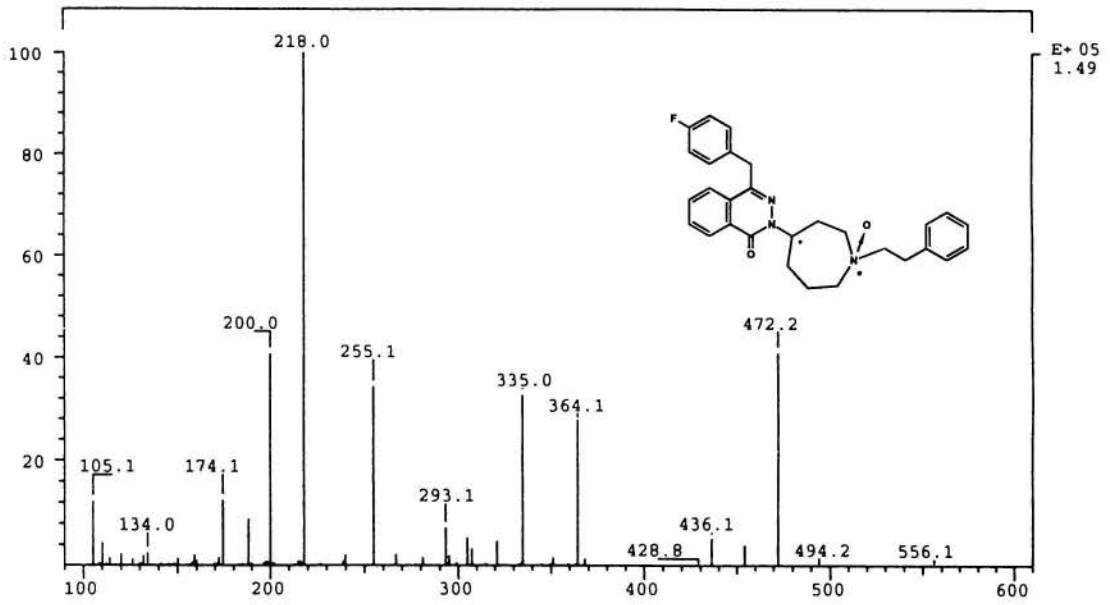


Abb. 52: Massenspektrum der Vergleichssubstanz **5**

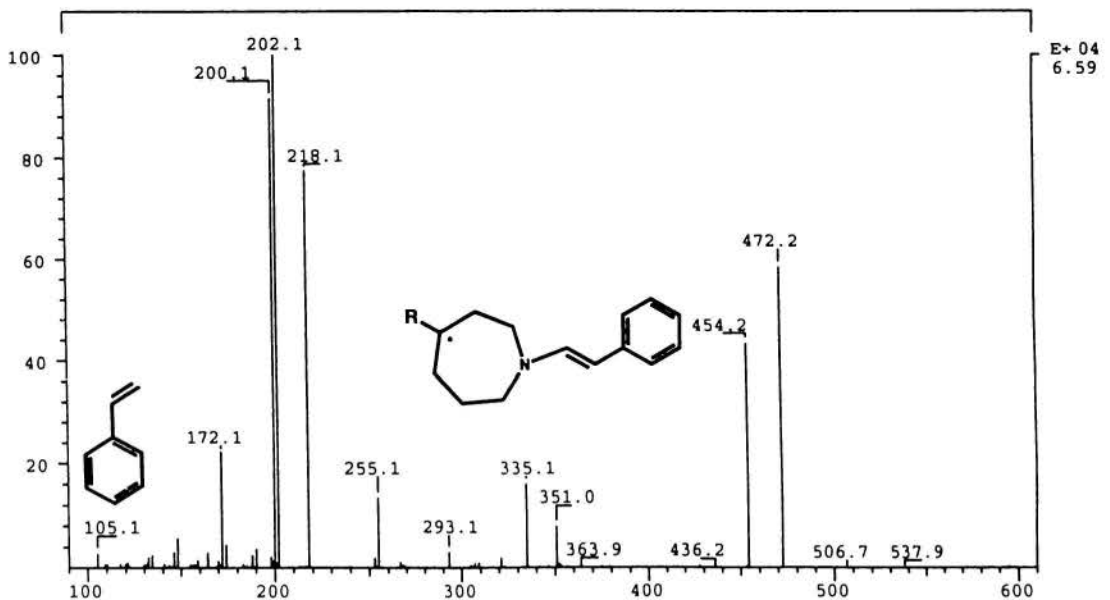


Abb. 53: Massenspektrum des Metaboliten **X** aus biologischem Material

Beide Massenspektren zeigten weitgehende Übereinstimmungen. Neben dem Molekularpeak bei  $m/z$  472 waren die Fragmente  $m/z$  454 und  $m/z$  105 von Bedeutung. Es handelte sich um Dehydroflezelastin und Styrol (s. Abb. 53), die entweder durch die Abspaltung von Wasser aus einem hydroxylierten Metaboliten (**4**) oder durch Cope-Eliminierung aus dem N-Oxid (**5**) hervorgegangen sein könnten. - Die Cope-Reaktion von N-Oxiden, die zu Olefinen führt, kann bemerkenswerterweise auch *in vivo* erfolgen<sup>37</sup>. - Somit ließen auch die Massenspektren keine abschließende Aussage über die Identität des Metaboliten zu. Eine aromatische Hydroxylierung im Phthalazinon-Teil des Moleküls war durch das Auftreten der Masse  $m/z$  255 (vgl. Abb. 48) anstelle der um 16 Einheiten höheren von  $m/z$  271 allerdings auszuschließen.

Zur Strukturaufklärung des Metaboliten **8** wurden Inkubationsansätze von **2** sowie Umsetzungen von **2** mit einem Cytochrom P450 Modellsystem (s. Kap. 7.3) mittels LC-MS analysiert. Bei dieser Variante der MS handelt es sich um eine direkte Kopplung eines Flüssigkeitschromatographen mit einem Massenspektrometer. Neben den Massenspektren erhält man Chromatogramme der Totalionenströme. Die Fließmittel-Zusammensetzung, die für die achirale Analytik an der Kieselgelphase entwickelt worden war (s. Kap. 5.1), wies optimale Voraussetzungen für die LC-MS-Untersuchungen auf: Methanol war vollständig verdampfbar und die in geringen Konzentrationen enthaltene Perchlorsäure führte nicht zu einer Beeinflussung der Messungen.

Die Massenspektren zeigten einen Molekularpeak bei  $m/z$  368, der die Annahme eines hydroxylierten Metaboliten von **2** bestätigte (Abb.54). Den entscheidenden Hinweis auf eine aromatische Hydroxylierung im Phthalazinon-Teil gab das Fragment  $m/z$  271. Gleichzeitig fehlte das nichthydroxylierte Fragment der Masse  $m/z$  255.

Im Totalionenstrom einiger Ansätze waren bis zu drei verschiedene Peaks der Masse  $m/z$  368 zu erkennen, die jeweils vor **2** eluierten. Diese Tatsache deutete auf isomere Metaboliten hin, die sich nur in der Stellung der Hydroxylgruppe am aromatischen System unterschieden. Die genaue Position konnte anhand der MS-Daten nicht aufgeklärt werden.

Für die Biotransformation des Azelastins in Beagle-Hunden sind sowohl eine Hydroxylierung des N-Desmethylmetaboliten in Position 6 des Phthalazinon-Ringes als auch Hydroxylierungen der Muttersubstanz in den Positionen 6 und 7 beschrieben<sup>45</sup>. Eine Bevorzugung der Hydroxylierung in diesen beiden Positionen könnte somit auch für Flezelastin postuliert werden.

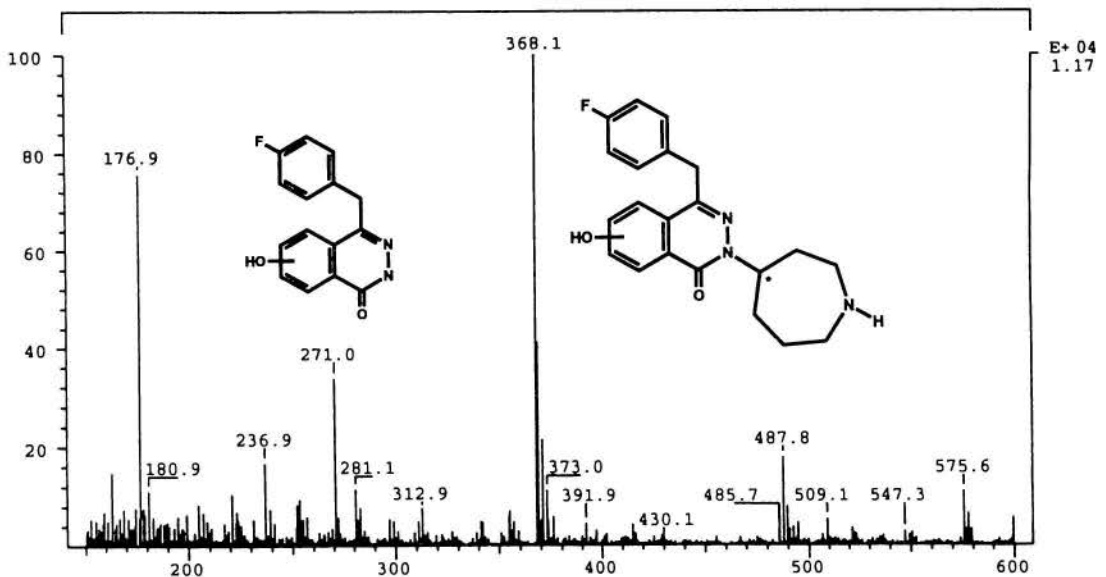


Abb. 54: Massenspektrum des Metaboliten **8** aus biologischer Probe

## **8 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin und Desphenethylflezelastin nach Inkubation mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies**

Bisher waren die Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies von racemischem Flezelastin und seiner reinen Enantiomeren achiral an der LiChrospher® Si-60 vermessen worden (s. Kap. 6). Enantioselektivitäten konnten mittels dieser Analytik nur durch die getrennte Umsetzung der einzelnen Enantiomeren untersucht werden. Parallel dazu war die chirale Vermessung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) und Desphenethylflezelastin (**2**) nach Inkubation des Razemates von großer Relevanz. Aufgrund einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung der Enantiomeren können die Ergebnisse der achiralen und der chiralen Untersuchungen voneinander abweichen.

Für die chirale Analytik wurden zwei unabhängige Verfahren eingesetzt. Zunächst wurden die Inkubationen mittels HPLC an einer Chiralpak AD®-Säule (vgl. Kap. 3.1.5) vermessen. Im Gegensatz zur HPLC-Enantiomerentrennung von Reinsubstanzen ist die Vermessung von biologischen Proben kritischer zu betrachten. Aufgrund von Matrixeffekten wird zumeist die Peakform breiter. Es ist möglich, daß zusätzliche Metaboliten mit den zu analysierenden Peaks koeluieren und so die Analytik beeinflußt wird. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine Meßreihe mit Hilfe der Kapillaronenelektrophorese (CZE) (vgl. Kap. 4) analysiert. Die CZE ermöglicht Trennungen mit sehr schlanken, scharfen Peaks, die die Überlagerung von Metaboliten stark einschränken.

## 8.1 HPLC-Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse an Chiralpak AD<sup>®</sup>

### 8.1.1 Validierung der Methode

Zur Überprüfung der Linearität der Enantiomerenverhältnisse wurden Mischungen von (+)-**1** und (-)-**1** definierter Verhältnisse (10:90 bis 90:10) in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt und chromatographiert. Die Ergebnisse in Abb. 55 zeigen, daß die Linearität über den gesamten Verhältnisbereich gegeben war. Die Meßwerte bedurften demnach keiner Korrektur.

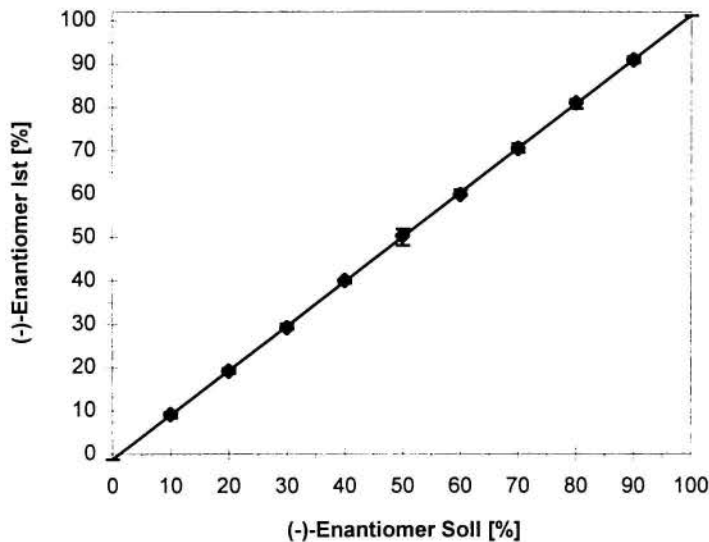


Abb. 55: Ergebnisse der Chromatographie von Enantiomerenmischungen von **1** ( $\pm$  SD)

Zusätzlich wurde auch die Linearität der Enantiomerenverhältnisse nach Extraktion aus biologischem Material überprüft, um eine stereoselektive Adsorption an Matrixbestandteile auszuschließen. Dazu wurden Inkubationsansätze mit drei verschiedenen Enantiomerenmischungen von (+)-**1** und (-)-**1** in zwei Konzentrationen hergestellt. Nach Extraktion gemäß Kap. 5.3.1 wurden sie chromatographiert. Wie Abb. 56 zeigt, traten keine Veränderungen der Enantiomerenverhältnisse während der Extraktion auf.

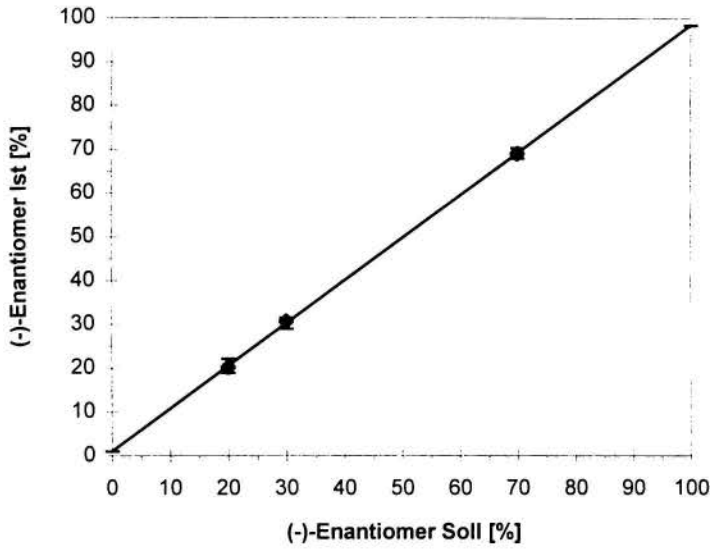


Abb. 56: Ergebnisse der Chromatographie von Enantiomerenmischungen von **1** nach Extraktion aus Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

Da von D-21440 (**2**) keine Enantiomere zur Verfügung standen, wurde hier die Konstanz des Enantiomerenverhältnisses nach Extraktion überprüft. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von **2** zu Inkubationsansätzen zugefügt. Die Chromatographie der Extrakte zeigte, daß **2** in einem konstanten Verhältnis von ca. 50:50 wiedergefunden wurde.



### 8.1.2 Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Die Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) und D-21440 (**2**) wurden nach Inkubation mit Phenobarbital-induzierten Rattenlebermikrosomen gemäß Kap. 6.2.2 über einen Zeitraum von 6 bis 48 Stunden bestimmt (Abb. 57, 58). Weder für die Biotransformation von **1** noch für die Bildung des Metaboliten **2** konnte eine Stereoselektivität festgestellt werden.

Die in den Diagrammen sichtbare leichte Verschiebung der Enantiomerenverhältnisse zugunsten des (+)-Enantiomers ist ein systematischer Fehler, der auch bei der Vermessung der Inkubationen mit Lebermikrosomen anderer Spezies auftrat (s. Kap. 8.1.3 und 8.1.4). Möglicherweise wird die Trennung durch Matrixeffekte oder durch Überlagerungen mit weiteren Metaboliten beeinflusst. Die später durchgeführte kapillarelektrophoretische Vermessung ergab Enantiomerenverhältnisse von 50:50 (vgl. Kap. 8.2). Somit wird **1** nicht stereoselektiv metabolisiert.

Die Trennung von **2** an der Chiralpak AD<sup>®</sup> war unvollständig, so daß die auftretenden Differenzen in den Enantiomerenverhältnissen hierauf zurückgeführt werden konnten. Der Einsatz der CZE-Analytik, die eine bessere Trennung von **1** und **2** ermöglichte, lieferte genauere Ergebnisse (vgl. Kap. 8.2).

Bei der achiralen Analytik der einzeln inkubierten Enantiomere war eine verstärkte Umsetzung des (+)-Flezelastins (**1**) beobachtet worden (s. Kap. 6.3.2), die bei der Vermessung der Enantiomerenverhältnisse nach Inkubation des Razemates nicht auftrat. Dies deutete auf eine gegenseitige Beeinflussung der Enantiomere hin, die ebenfalls bei der Bildung von Desphenethylflezelastin (**2**) deutlich wurde. Die Untersuchung der einzeln inkubierten Enantiomere auf der Kieselgelphase ergab, daß **2** vermehrt aus (+)-**1** entstand. Die Ergebnisse der chiralen HPLC- und CZE-Analytik des inkubierten Razemats von **1** konnten dies nicht bestätigen, sondern zeigten eine gleichmäßige Bildung beider Enantiomere von **2**.

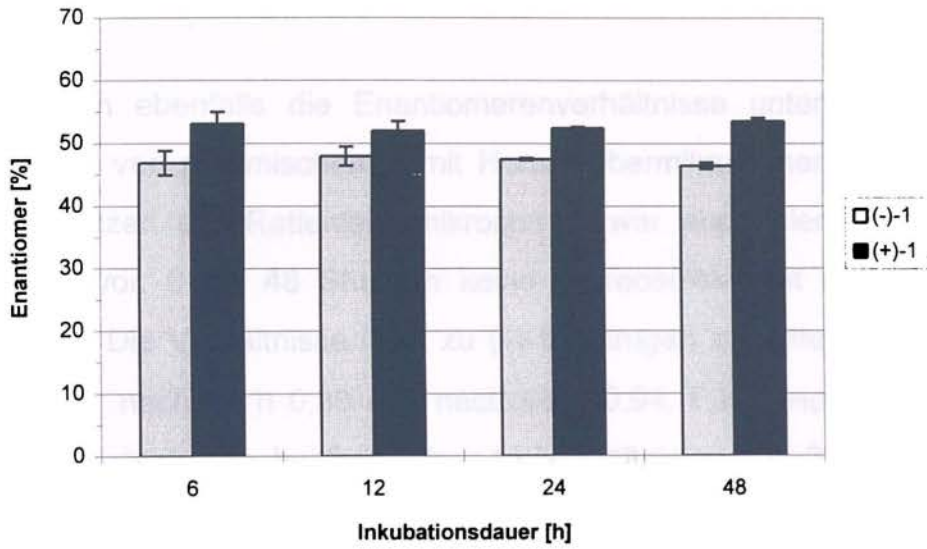


Abb. 57: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **1** nach Inkubation mit induzierten Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

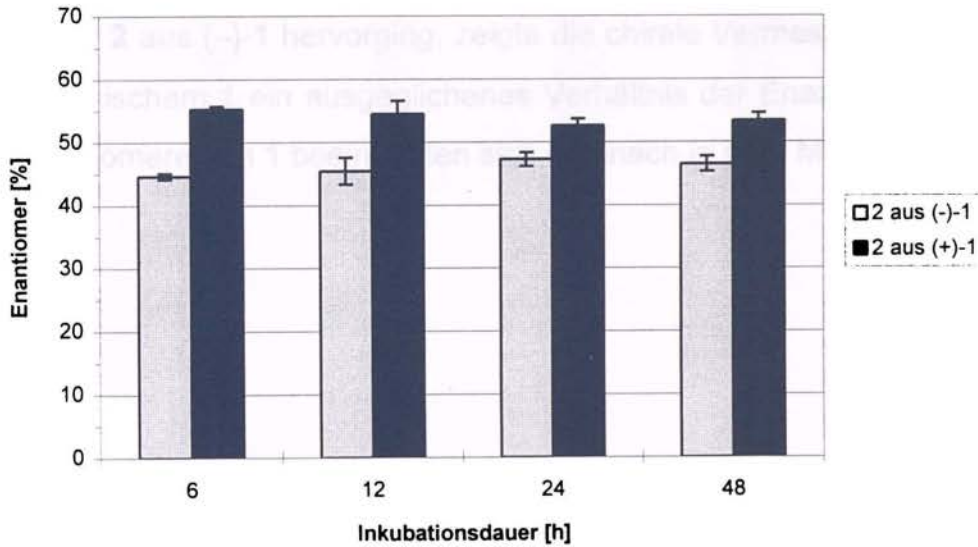


Abb. 58: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **2** nach Inkubation von **1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen ( $\pm$  SD)



### 8.1.3 Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen

Es wurden ebenfalls die Enantiomerenverhältnisse untersucht, die sich nach Inkubation von racemischem **1** mit Humanlebermikrosomen ergaben. Analog zu den Ansätzen der Rattenlebermikrosomen war auch hier über den gesamten Zeitraum von 6 bis 48 Stunden keine Stereoselektivität des Metabolismus zu erkennen. Die Verhältnisse (-)-**1** zu (+)-**1** betragen im Mittel nach 6 h 0,91, nach 12 h 0,91, nach 24 h 0,89 und nach 48 h 0,94. Für Desphenethylflezelastin (**2**) ergaben sich durchschnittlich folgende Verhältnisse von **2** aus (-)-**1** zu **2** aus (+)-**1**: 6 h 0,78, 12 h 0,94, 24 h 0,94 und 48 h 0,97. Bezüglich der nicht exakt 1:1 entsprechenden Verhältnisse gelten die unter Kap. 8.1.2 gemachten Aussagen.

Der Vergleich der erzielten Ergebnisse mit denen der achiralen Vermessung der Inkubationen der reinen Enantiomere zeigte Übereinstimmung in der Verstoffwechslung von **1**. Die Humanmikrosomen setzten auch die einzelnen Enantiomere in gleichem Maße um (s. Kap. 6.3.3). Dagegen ließen sich in der Bildung von **2** Differenzen erkennen. Während bei den Inkubationen von (+)- und (-)-**1** mehr **2** aus (-)-**1** hervorging, zeigte die chirale Vermessung der Inkubationen von racemischem **1** ein ausgeglichenes Verhältnis der Enantiomere von **2** (s. o.). Die Enantiomere von **1** beeinflussten sich demnach in ihrer Metabolisierung.

### 8.1.4 Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen

Im Gegensatz zu den bisher betrachteten Spezies zeigten Inkubationen von **1** mit Rinderlebermikrosomen eine deutliche Stereoselektivität in der Bildung von **2** (Abb. 59). Das (-)-Enantiomer von **1** wurde weitaus weniger zu **2** metabolisiert als das (+)-Enantiomer. Während des gesamten Inkubationszeitraums von 6 bis 48 Stunden veränderte sich das Verhältnis von **2** aus (-)-**1** zu **2** aus (+)-**1** nur unwesentlich und betrug durchschnittlich 0,22.

Die Verstoffwechslung von **1** hingegen unterlag keiner Stereoselektivität. So betragen die Enantiomerenverhältnisse von (-)-**1** zu (+)-**1** nach 12 h 0,94, nach 24 h 0,94 und nach 48 h 0,97.

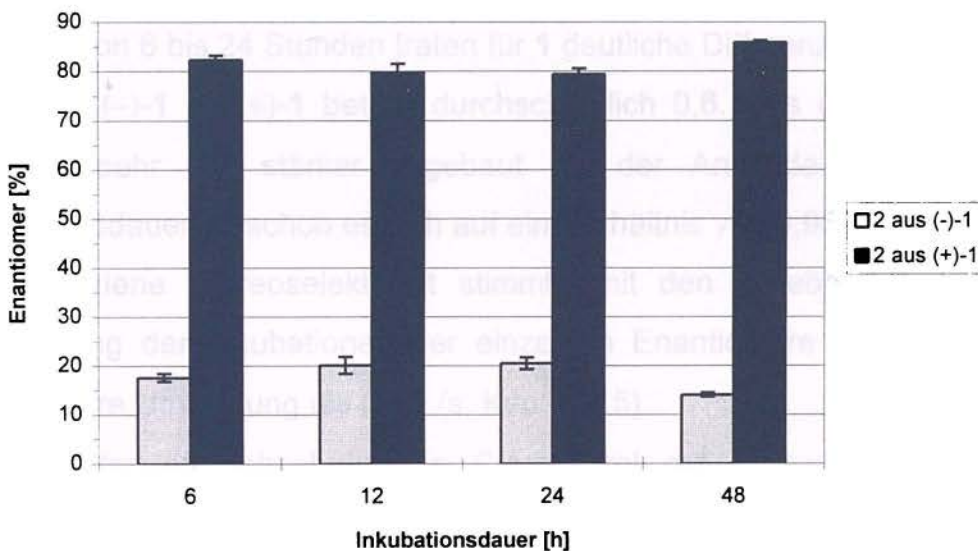


Abb. 59: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **2** nach Inkubation von **1** mit Rinderlebermikrosomen ( $\pm$  SD)

Die bevorzugte Bildung von **2** aus (+)-**1** war bereits bei der Analyse der Inkubationen der einzelnen Enantiomeren auf der Kieselgelphase beobachtet (s. Kap. 6.3.4) worden.

Dagegen wurde eine stärkere Umsetzung von (+)-**1**, die bei den Einzelinkubationen auftrat, bei der chiralen Vermessung des inkubierten Razemates nicht gefunden, so daß auch hier eine gegenseitige Beeinflussung der Enantiomere angenommen werden konnte.

### 8.1.5 Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen

Als viertes *in vitro* Modell zur Untersuchung der Stereoselektivität der Biotransformation von **1** dienten Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen. Da die Umsetzungen nicht zur Bildung von **2** führten (vgl. Kap. 6.3.5), konnten nur die Enantiomerenverhältnisse des Restsubstrats **1** bestimmt werden. Über einen Zeitraum von 6 bis 24 Stunden traten für **1** deutliche Differenzen auf (Abb. 61). Das Verhältnis (-)-**1** zu (+)-**1** betrug durchschnittlich 0,6. Das (-)-Enantiomer wurde zunächst sehr viel stärker abgebaut als der Antipode. Nach 48 Stunden Inkubationsdauer verschob es sich auf ein Verhältnis von 0,95.

Die gefundene Stereoselektivität stimmte mit den Ergebnissen der achiralen Vermessung der Inkubationen der einzelnen Enantiomere überein. (-)-**1** zeigte eine größere Umsetzung als (+)-**1** (s. Kap. 6.3.5).

Bei der Verstoffwechslung von Clenbuterol mit Mikrosomen verschiedener Spezies hatte WENNING<sup>50</sup> in unserer Arbeitsgruppe ähnliche Ergebnisse erzielt. Die Mikrosomen der Spezies Schwein zeigten ebenfalls den ausgeprägtesten stereoselektiven Abbau der Enantiomere.

Das Chromatogramm der Abb. 63 veranschaulicht das Verhältnis der Enantiomere nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden.

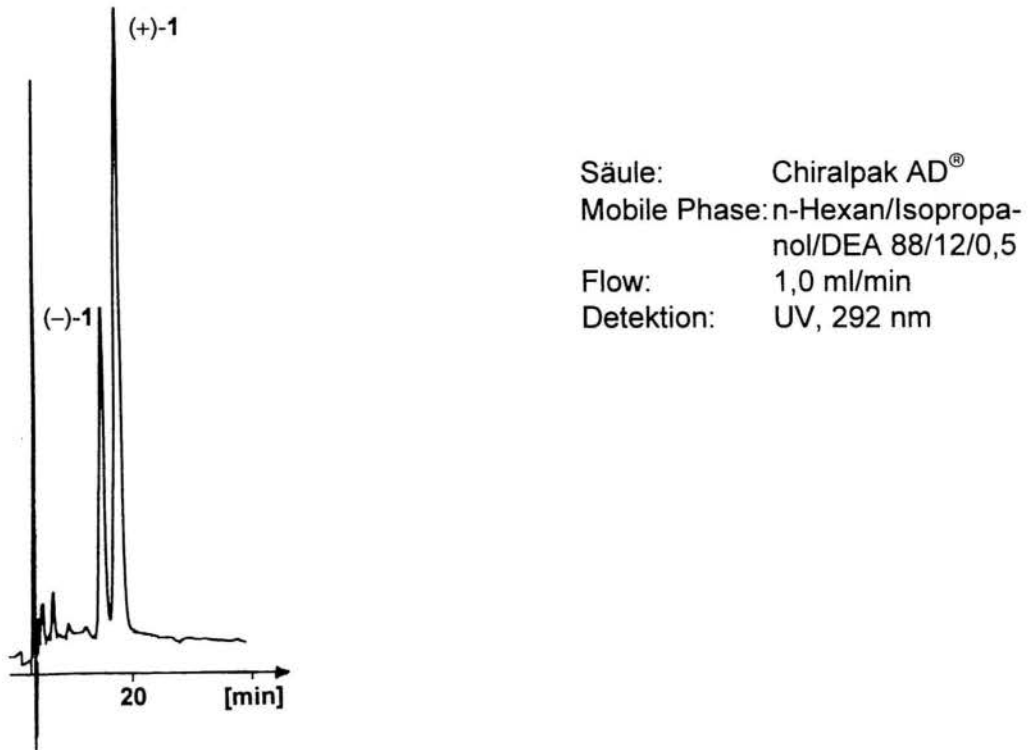


Abb. 60: Bestimmung der Enantiomere von **1** nach Inkubation mit Schweinelebermikrosomen (6 h)

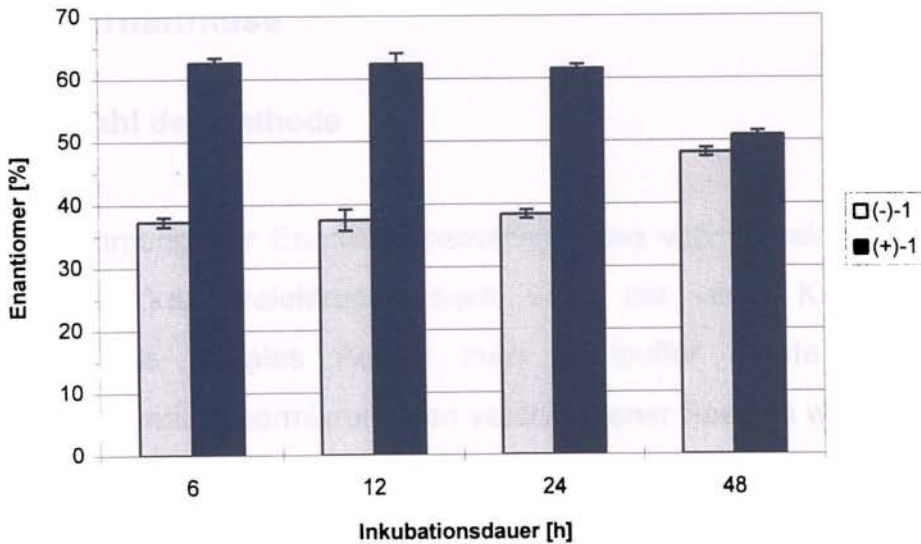


Abb. 61: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **1** nach Inkubation mit Schweinelebermikrosomen ( $\pm$  SD)

### 8.1.6 Überprüfung der Konfigurationsstabilität unter den Inkubationsbedingungen

Kontrollansätze der Inkubationen von *rac*-Flezelastin (**1**) mit Lebermikrosomen, die in Abwesenheit von NADPH durchgeführt wurden, zeigten in der chromatographischen Analyse an der Chiralpak AD<sup>®</sup> ein konstantes Enantiomerenverhältnis von ca. 50:50.

Zur zusätzlichen Bestätigung der Stabilität wurden die einzelnen Enantiomere von **1** sowohl mit Ratten- (vgl. Kap. 3.2.3) als auch mit Rinderlebermikrosomen inkubiert. In den Chromatogrammen konnte jeweils nur das entsprechende Enantiomer sowohl von **1** als auch von D-21440 (**2**) nachgewiesen werden. Somit konnte die Konfigurationsstabilität als gegeben angesehen werden.

Daneben bestätigten die Inkubationen von (+)-**1** und (-)-**1** mit Rindermikrosomen die bevorzugte Bildung von **2** aus (+)-**1**.

## 8.2 Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse

### 8.2.1 Wahl der Methode

Die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) und D-21440 (**2**) erfolgte kapillarelektrophoretisch nach der unter Kap. 4 beschriebenen Methode. Als chirales Additiv zum Laufpuffer diente  $\beta$ -Cyclodextrin. Die Inkubationen mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies wurden analog Kap. 8.1 durchgeführt. Der Rückstand mußte hier allerdings wegen der geringen Konzentrationsempfindlichkeit der CE in einem kleineren Volumen aufgenommen werden. Dazu wurde ein 5 mM Phosphatpuffer mit Methanolzusatz gewählt.

Da der Laufpuffer eine Molarität von 50 mM und der Elektrodenpuffer eine von

100 mM aufwies, kam es zu einer Aufkonzentrierung der Probe direkt bei der Aufgabe. Diese Arbeitsweise wird in der Literatur als „sample stacking“ bezeichnet<sup>51</sup>.

### 8.2.2 Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies

Zum Vergleich und zur Absicherung der Ergebnisse der chiralen HPLC-Analytik auf der Chiralpak AD<sup>®</sup> wurden 24 h-Inkubationen von Flezelastin (**1**) mit Lebermikrosomen von Ratte, Mensch, Rind und Schwein mit der CZE-Methode vermessen (Abb. 62, 63). Die ermittelten Enantiomerenverhältnisse stimmten weitgehend mit denen der HPLC-Methode überein, wobei aufgrund der besseren Trennung der biologischen Proben auf der CZE die Enantiomerenverhältnisse von **1** nach Inkubation mit Ratten- und Humanlebermikrosomen näher an einem ausgeglichenen Verhältnis von 50:50 lagen. Da außerdem die Trennung von Desphenethylflezelastin (**2**) mit Hilfe der CZE-Methode vollständiger war, differierten die Werte besonders bezüglich der Inkubationen mit Rindermikrosomen. Das Verhältnis (-)-**2** zu (+)-**2** verschob sich auf 0,40, während es bei der HPLC-Methode nur 0,22 betrug. Die hier erzielten Ergebnisse sollten aufgrund der besseren Trennung stärker gewichtet werden.

Abb. 64 zeigt als Gegenüberstellung das Chromatogramm und das Elektropherogramm einer Inkubation von **1** mit Humanlebermikrosomen.



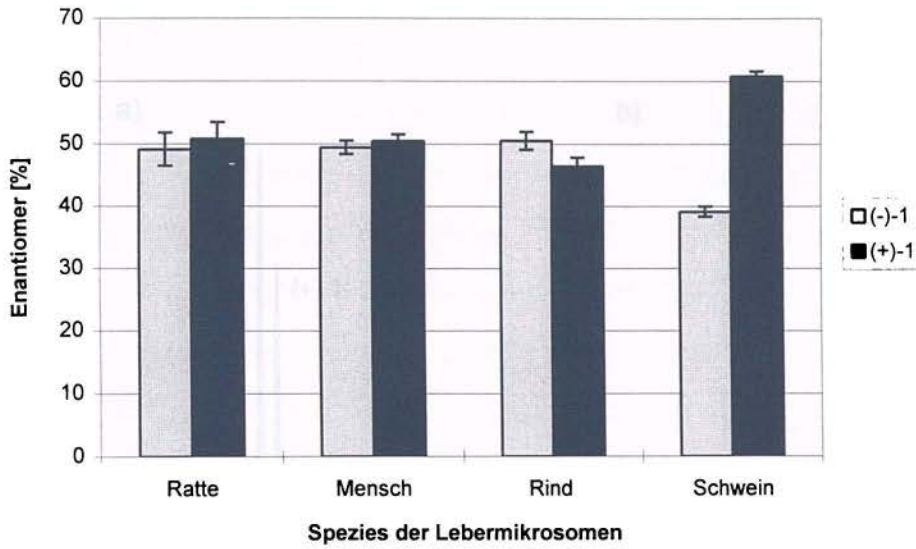


Abb. 62: Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **1** nach 24 h-Inkubation mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

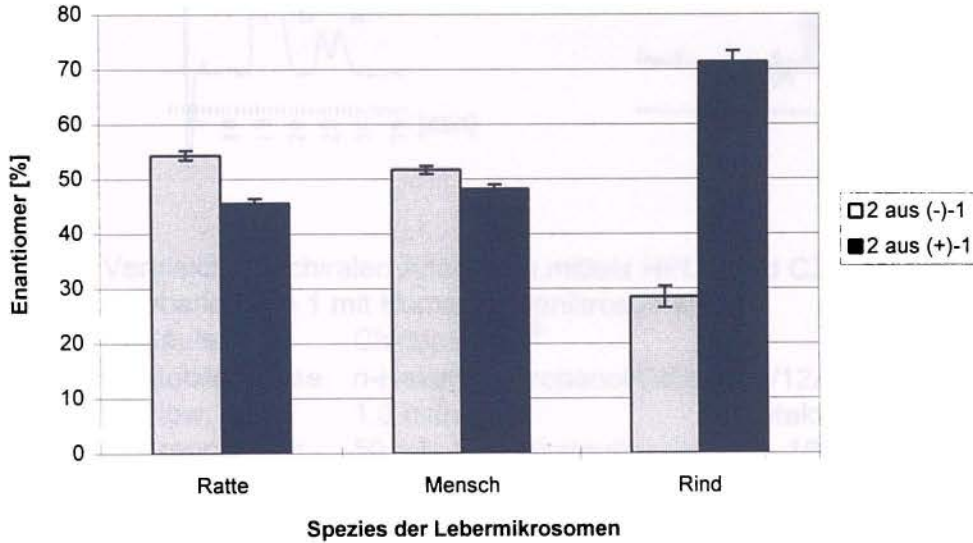


Abb. 63: Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **2** nach 24 h-Inkubation von **1** mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

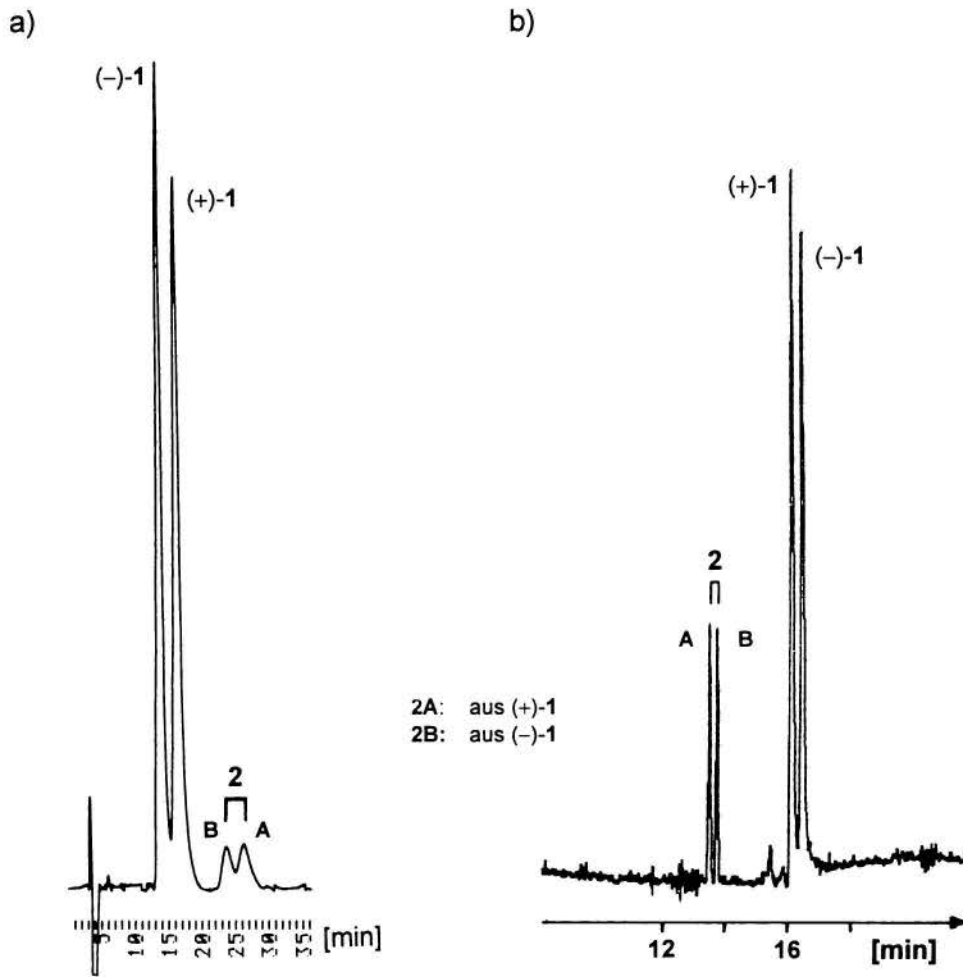


Abb. 67: Vergleich der chiralen Analytiken mittels HPLC und CZE am Beispiel einer Inkubation von 1 mit Humanlebermikrosomen

- a) Säule: Chiralpak AD<sup>®</sup>  
 Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/DEA 88/12/0,5  
 Flow: 1,0 ml/min Detektion: UV, 292 nm
- b) Trennpuffer: 50 mM Phosphatpuffer pH 3,75, 16,3 mM  $\beta$ -CD  
 Feldstärke: 372 V/cm  
 Detektion: UV, 210 nm



### 8.3 Vergleich der Methoden

Die Vorteile der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) gegenüber der HPLC-Methode sind in der verbesserten Trennleistung, den verkürzten Analysenzeiten und dem niedrigeren Lösungsmittelverbrauch zu sehen.

Aufgrund der geringeren Konzentrationsempfindlichkeit der CZE war es nicht möglich, die inkubierten Proben direkt auf die Kapillare zu geben, so daß sie wie für die HPLC-Analytik aufgearbeitet werden mußten. Prinzipiell ist bei ausreichend hohen Konzentrationen der Analyten aber eine Direktaufgabe biologischer Proben praktikierbar.

In unserem Fall konnte die CZE dazu genutzt werden, Ergebnisse, die mittels einer chiralen HPLC-Analytik erzielt worden waren, zu überprüfen. Mit dem Einsatz der CZE wurde eine höhere Präzision in der Analytik von biologischen Proben erzielt, die sich in exakteren Enantiomerenverhältnissen widerspiegelte.

Somit stellt die CZE mit Cyclodextrin-Zusatz zum Laufpuffer eine sehr gute Alternative zur herkömmlichen chiralen HPLC-Analytik dar und bot hier die Möglichkeit, die Ergebnisse der HPLC-Methode abzusichern.

## 9 In vivo Untersuchungen zum Metabolismus von $^{14}\text{C}$ -markiertem Flezelastin in Ratten

Eine in vivo Studie an Ratten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Flezelastin (**1**) wurde herangezogen, um das Metabolitenspektrum mit demjenigen zu vergleichen, das bei in vitro Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen erhalten wurde (s. Kap. 6.3). Die Studie wurde von der Firma ASTA Medica, Frankfurt am Main, durchgeführt. Die Vermessung der radioaktiven Proben erfolgte ebenfalls bei ASTA Medica, da an unserem Institut aufgrund baulicher Maßnahmen der Isotopenbereich nicht genutzt werden konnte.

Sechs männliche Wistar-Ratten erhielten über einen Zeitraum von drei Tagen eine tägliche orale Dosis von 1 mg/kg  $^{14}\text{C}$  **1** ( $\approx 40 \mu\text{Ci/kg}$ ). Urin und Faeces wurden in bestimmten Zeitintervallen gesammelt. Das Plasma wurde nach der tierschutzgerechten Tötung der Ratten gewonnen. Da das hier verwendete radioaktiv markierte **1** eine hohe radiolytische Zersetzung aufwies (die chromatographische Reinheit wurde erst nach der Studie bestimmt und betrug 63%) und unaufgereinigt den Tieren appliziert wurde, können die nachfolgenden Daten nur orientierenden Charakter haben.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Gesamtradioaktivität in den einzelnen Sammelintervallen zeigte, daß im Urin zwischen 2 und 10%, in den Faeces zwischen 69 und 79% und im Plasma nur 0,1% der zuletzt applizierten Dosis nachweisbar waren. Die Ausscheidung von **1** und seinen Metaboliten erfolgte demnach hauptsächlich biliär (vgl. Kap. 2).

Die Plasmaproben konnten wegen der zu geringen Radioaktivität nicht vermessen werden.

Für die chromatographische Analyse wurden die Faeces-Proben aufgearbeitet: Nach Alkalisieren der Proben wurden sie aufeinanderfolgend sowohl mit Diethylether als auch mit einem Gemisch aus n-Hexan/Octanol 99/1 extrahiert. Die Chromatographie wurde analog Kap. 5.1 durchgeführt mit dem Unterschied, daß die Detektion mittels eines Radiomonitors erfolgte. Die Auswertung ergab, daß alle in vitro auftretenden Metaboliten **2**, **3** sowie **X** auch in vivo gebildet wurden. In den

Faeces einiger Tiere war auch ein Metabolit zu detektieren, der in seinem chromatographischen Verhalten dem *in vitro* nur von Rattenmikrosomen gebildeten Metaboliten **8** entsprach. Vergleich man die prozentualen Anteile der einzelnen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität mit den prozentualen Anteilen an der Gesamtfläche aller Peaks von Inkubationen mit induzierten Rattenlebermikrosomen (s. Kap. 6.3.2), zeigten sich leichte Differenzen. *In vivo* war die Bildung von **3** ausgeprägter, wogegen **2** und **X** in kleineren Anteilen entstanden als *in vitro*.

Zur Stereoselektivität konnten keine Aussagen getroffen werden, da die Ratten nur Razemat erhielten und für die radioaktive Analytik die chirale stationäre Phase wegen der Kontaminationsgefahr nicht benutzt werden sollte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die *in vitro* Versuche mit Leberzellfraktionen ein Metabolitenspektrum zeigen, das mit dem *in vivo* gefundenen gut korreliert. Somit sind die in unserer Arbeitsgruppe als Alternative zum Tierversuch genutzten subzellulären Systeme geeignet, grundsätzliche Aussagen über mögliche Metabolisierungswege zu erhalten.

## 10 Ausblick

Im Laufe dieser Arbeit wurde von der Herstellerfirma beschlossen, daß Flezelastin als Nachfolgeverbindung des Azelastins (Allergodil®) vorerst nicht zur Therapie von Asthma und Allergien in den Markt eingeführt werden sollte. Allerdings hat der Arzneistoff noch nichts von seiner Aktualität verloren, denn als weiteres Einsatzgebiet ist die Durchbrechung der multi-drug-resistance (MDR) von Interesse. Die Forschung in diesem Bereich wird noch weiter verfolgt.

Im Anschluß an die vorliegende Dissertation sollen in unserem Arbeitskreis Untersuchungen zum stereoselektiven Metabolismus des Azelastins durchgeführt werden, die spezifischer achiraler und chiraler Analytiken bedürfen. Dabei kann auf die in dieser Arbeit entwickelten Techniken aufgebaut werden.

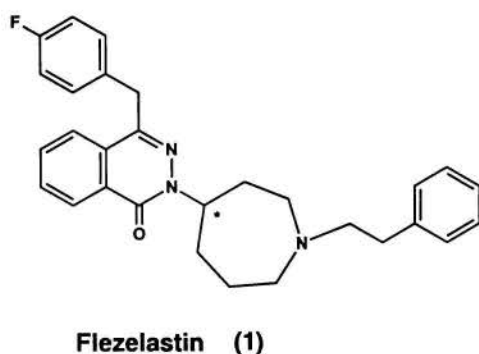
Zu dem bereits in die Therapie eingeführten Azelastin sind noch keine stereoselektiven Untersuchungen beschrieben, die aber besonders für zukünftige Anforderungen und Fragestellungen seitens der Zulassungsbehörden von großer Wichtigkeit sind. Für eine analytische Enantiomerentrennung des Flezelastins sind im Rahmen dieser Arbeit verschiedene HPLC-Methoden und eine CZE-Methode erarbeitet worden, die sich als Basis für die Entwicklung von Trennungen des Azelastins eignen. Somit könnten die zum Flezelastin erzielten Ergebnisse eine über den reinen Arzneistoff hinausgehende Bedeutung erlangen.



## 11 Zusammenfassung

Flezelastin (**1**) ist ein neues Antihistaminikum/Antiasthmatikum, welches als Nachfolgeverbindung des im Handel befindlichen Azelastins (**7**) entwickelt wurde. Für die pharmakologischen Testungen und klinischen Prüfungen wurde bisher nur das Razemat eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine achirale HPLC-Methode an einer Kieselgelphase entwickelt, die zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Flezelastin (**1**), des Desphenethylmetaboliten (D-21440, **2**), des Carboxy metaboliten (D-22258, **3**) sowie dem postulierten Metaboliten **4** oder **5** aus biologischem Material genutzt wurde.

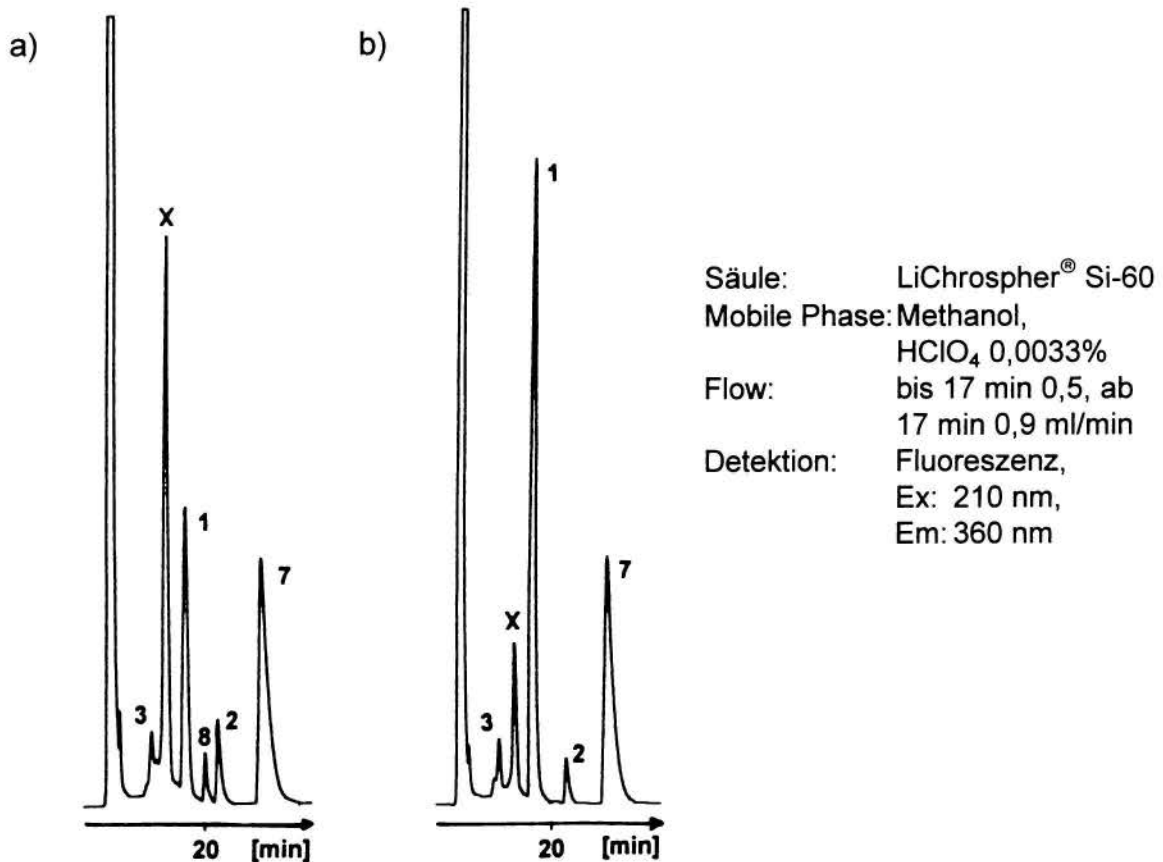


	<b>2</b> <b>D-21440</b>
	<b>3</b> <b>D-22258</b>
	<b>4</b>
	<b>5</b>

Mit dieser HPLC-Methode wurde erstmals die Stereoselektivität der in vitro Biotransformationen untersucht. Dazu standen Leberzellfraktionen der Spezies Ratte, Mensch, Rind und Schwein zur Verfügung. Das Razemat und die einzelnen Enantiomere wurden getrennt inkubiert, ihre Metabolisierungsmuster bestimmt und miteinander verglichen.

Der Metabolit **3** sowie ein weiterer Metabolit, sehr wahrscheinlich das N-Oxid **5**, konnten bei allen vier Spezies nachgewiesen werden. Metabolit **2** wurde vom Schwein nicht gebildet.

Besonders hohe Stereoselektivität der Metabolisierung trat bei Inkubationen mit induzierten Rattenlebermikrosomen auf. Es konnte die Bildung eines bislang unbekanntem Metaboliten **8** beobachtet werden, der nur aus (+)-**1** und dem Razemat hervorging.



Chromatogramme nach Inkubation von a) (+)-**1** und b) (-)-**1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen (24 h)

Ein Speziesvergleich der Biotransformation des Flezelastins zeigte, daß das Metabolisierungsmuster bei den eingesetzten Lebermikrosomen einschließlich Humanlebermikrosomen identisch war - bis auf den fehlenden Desphenethylmetaboliten beim Schwein - sich aber quantitative Unterschiede sowie unterschiedliche Stereoselektivitäten zeigten.

Das etablierte Modell der Rattenlebermikrosomen ist in der Lage, Metabolisierungswege wie beim Menschen aufzuzeigen.

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten wurden mehrere Wege beschrrieben.

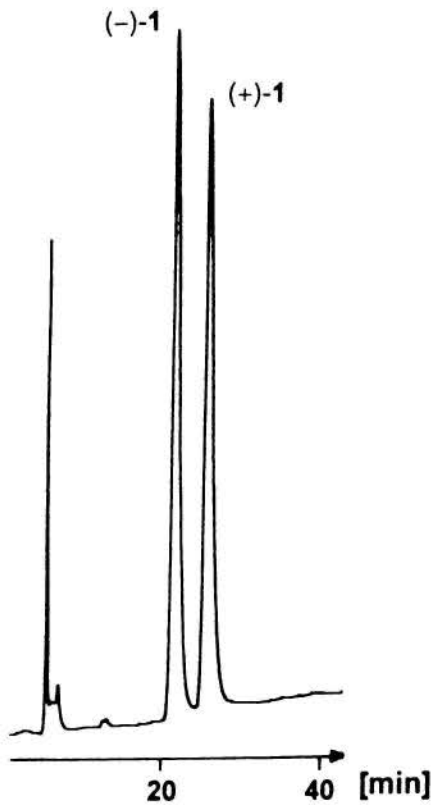
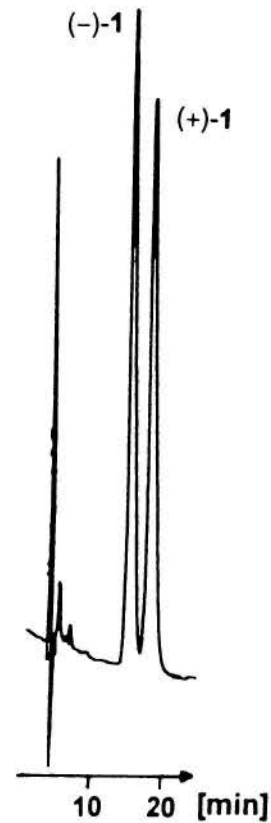
Die Bildung der Metaboliten **2** und **3** konnte durch MS/MS-Untersuchungen erstmals abgesichert werden.

Das N-Oxid **5** wurde synthetisiert und sollte in vergleichenden massenspektrometrischen Untersuchungen zur Aufklärung der Identität eines neuen Metaboliten **X** genutzt werden. Trotz der übereinstimmenden Spektren von **5** mit denen des Metaboliten aus inkubierten Proben konnte das Auftreten des seitenkettenhydroxylierten Metaboliten **4** in den Inkubationsansätzen aber nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Der in Rattenlebermikrosomen stereoselektiv gebildete Metabolit **8** konnte erstmalig als im Phthalazinon-Teil hydroxylierter Metabolit von **2** identifiziert werden. In Inkubationsansätzen, die nur **2** als Substrat enthielten, wurde **8** als Hauptmetabolit gefunden. Umsetzungen von **2** mit einem Cytochrom P450 Modellsystem zur biomimetischen Monooxygenierung führten ebenfalls zur Bildung von **8**. DAD- und LC/MS-Messungen bestätigten die aromatische Hydroxylierung.

Zur Untersuchung der enantioselektiven Metabolisierung von Flezelastin (**1**) wurden zusätzlich Methoden zur direkten Enantiomerentrennung von **1** und seiner Metaboliten **2** und **3** entwickelt. Gute Enantiomerentrennungen konnten mittels HPLC an der Chiralcel OD<sup>®</sup>- und der Chiralpak AD<sup>®</sup>-Säule erzielt werden. Die Chiralpak AD<sup>®</sup>-Säule ermöglichte eine gleichzeitige Trennung von Flezelastin und Desphenethylflezelastin. Die von der Herstellerfirma zunächst entwickelte Trennung an einer Proteinphase zeigte vergleichsweise breite Peakformen und lange Analysenzeiten. Auch Trennversuche an weiteren Proteinphasen erbrachten keine wesentliche Verbesserung.

Beispiele für Enantiomerentrennungen an einer Cellulose- sowie an einer Amylosephase sind nachstehend abgebildet.

a) Chiralcel OD<sup>®</sup>b) Chiralpak AD<sup>®</sup>

Trennung der Enantiomere von 1

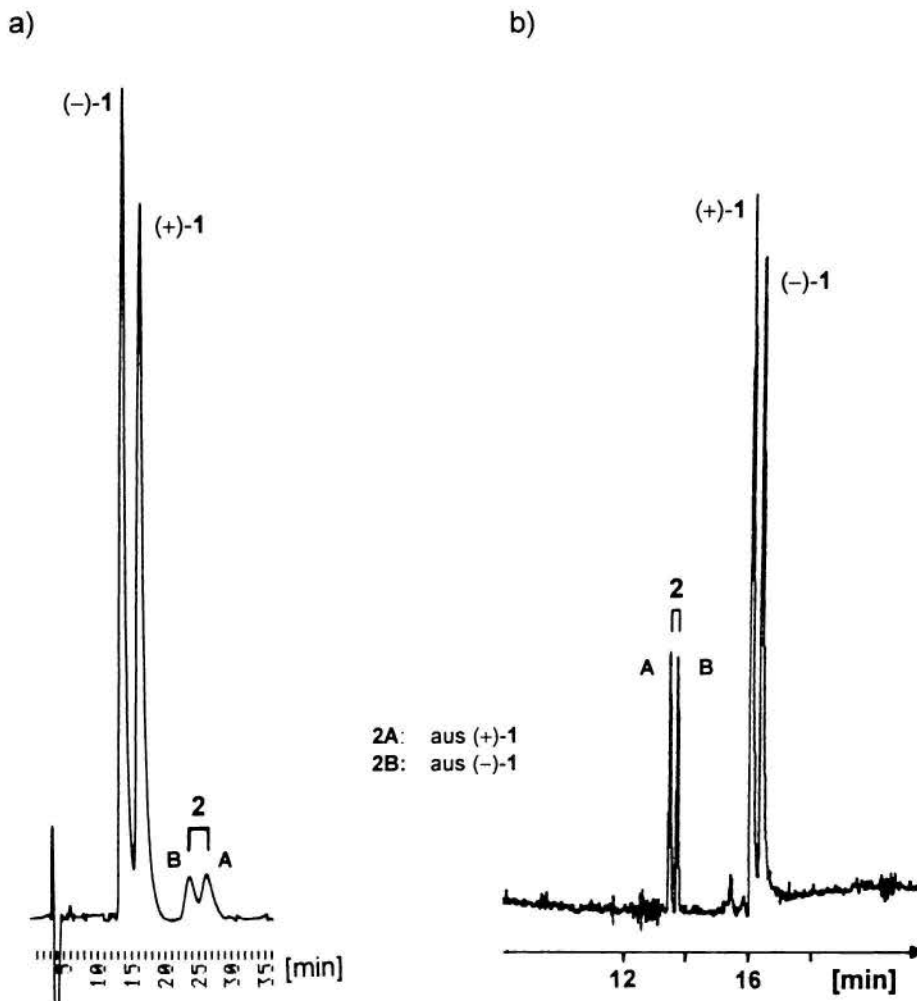
Mobile Phase:	a) n-Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/0,1	b) n-Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/0,5
Flow:	0,7 ml/min	0,9 ml/min
Detektion:	UV, 292 nm	UV, 292 nm

Die Enantiomerentrennung an der Chiralpak AD<sup>®</sup>-Säule wurde genutzt, um die Enantiomerenverhältnisse von **1** und **2** nach Inkubation des Razemats von **1** mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies zu bestimmen. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich eine Kapillarelektrophorese-Methode (CZE) mit Zusatz von  $\beta$ -Cyclodextrin als chirales Additiv zum Laufpuffer entwickelt. Aufgrund der Trennleistung der CZE für Desphenethylflezelastin (**2**) konnte die Genauigkeit der Messungen erhöht werden.



Eine Stereoselektivität im Abbau der einzelnen Enantiomere von **1** zeigte sich nur bei der Umsetzung mit Schweinelebermikrosomen: Das (-)-Enantiomer wurde bevorzugt umgesetzt.

Bei Inkubationen von racemischem **1** mit Rinderlebermikrosomen wurde Metabolit **2** stereoselektiv gebildet. Das Enantiomer, das aus (-)-**1** hervorging, entstand in geringerem Maße als das aus (+)-**1** resultierende Enantiomer.



Vergleich der chiralen Analytiken mittels HPLC und CZE am Beispiel einer Inkubation von **1** mit Humanlebermikrosomen

- |    |               |   |
|----|---------------|---|
| a) | Säule:        | Chiralpak AD <sup>®</sup>                         |
|    | Mobile Phase: | n-Hexan/Isopropanol/DEA 88/12/0,5                 |
|    | Flow:         | 1,0 ml/min Detektion: UV, 292 nm                  |
| b) | Trennpuffer:  | 50 mM Phosphatpuffer pH 3,75, 16,3 mM $\beta$ -CD |
|    | Feldstärke:   | 372 V/cm  |
|    | Detektion:    | UV, 210 nm  |

Die Ergebnisse der Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse nach Inkubation mit Humanlebermikrosomen wiesen die größten Übereinstimmungen mit denen nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen auf. Somit konnte nochmals die Eignung von Leberpräparationen der Ratte zu *in vitro* Untersuchungen, die einer Metabolisierung beim Menschen möglichst nahe kommen, bestätigt werden.

Eine *in vivo* Studie an Ratten mit radioaktiv markiertem Flezelastin (**1**) zeigte, daß die Ausscheidung von **1** und seinen Metaboliten hauptsächlich biliär erfolgt. Das Metabolisierungsmuster in Faecesproben stimmte mit dem bei *in vitro* Umsetzungen erhaltenen überein.

Damit ist erstmals für den neuen Arzneistoff Flezelastin die Stereoselektivität des Metabolismus umfassend und validiert durch HPLC an einer achiralen und einer chiralen stationären Phase sowie zusätzlich durch chirale Kapillarzonen-elektrophorese bestimmt worden.

## Experimenteller Teil

# 1 Allgemeines

## 1.1 Allgemeine Geräte

Abblasgerät:	Hausangefertigtes Gerät mit 10 Ausgängen und Stickstoffanschluß
Analytische Waage:	Typ 2442, Fa. Satorius
Fluoreszenz-Spektrometer:	Shimadzu RF 540
Magnetrührer:	IKA Combi mag RET
Massenspektrometer:	Finnigan MAT TSQ 7000 Varian MAT 44S
Mikrowaage:	Satorius 708501 mit Digitalvoltmeter
pH-Meter:	pH Digi 520, Einstabmesskette E 39, Fa. WTG
Rotationsverdampfer:	Typ Rotavapor, Fa. Büchi
Schmelzpunktbestimmungsgerät:	Kofler Heiztischmikroskop, Fa. Reichert
Schüttler:	IKA-Vibrax-VXR, Fa. Janke & Kunkel
Spektralphotometer:	UV 160 A, Fa. Shimadzu
Ultraschallbad:	Sonorex RK 255H, Fa. Bandelin
Wasserbad:	Typ F3, Fa. Haake
Zentrifuge:	Labofuge 6000, Fa. Heraeus Christ

## 1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Hochdruckflüssigkeitschromatograph:	110B Beckman Solvent Delivery Module Shimadzu LC-6A
Dioden-Array-Detektor:	Merck-Hitachi L 3000 DAD
Fluoreszenzdetektor:	Merck-Hitachi F-1050
UV-Detektor:	Merck-Hitachi 655 A Shimadzu SPD-6A
Injektionssystem:	Probenaufgabeventil 7125 mit 20 µl Injektionsschleife, Fa. Rheodyne
Integrator:	Merck-Hitachi D-2000 Shimadzu C-R6A Chromatopac

## 1.3 Kapillarelektrophorese

Elektrophoresegerät 1:	Beckman Kapillarelektrophorese System P/ACE 2100 und 5510
Detektor:	UV, 200, 214, 254 und 280 nm Beckmann Dioden-Array-Detektor
Datenaufnahme:	System GOLD 7.11 und 8.1 Software
Probenaufgabe:	Stickstoff Überdruck 0,5 PSI
Kapillaren:	fused silica, unbehandelte Oberfläche, 50 µm Innendurchmesser, 360 µm Außendurchmesser
Kapillarkühlung:	Flüssigkühlung der Kapillarkartusche mittels FKW

Elektrophoresegerät 2:	Grom Kapillarelektrophorese System 100
Detektor:	Linear UVIS 200, 190-800 nm
Integrator:	Hewlett-Packard, HP 3396 A
Probenaufgabe:	hydrodynamisch, 10 cm
Kapillaren	fused silica, unbehandelte Oberfläche 50 µm Innendurchmesser, 360 µm Außendurchmesser
Kapillarkühlung:	Gebälse mit Raumluft

#### 1.4 Geräte zur Bereitung von Leberhomogenaten

Homogenisator:	Elvehjem-Potter, Fa. Braun Melsungen
Ultrazentrifuge:	Beckman L8-M
Zentrifuge:	Typ Junior 15000, Fa. Leybold- Heraeus

## 2 Abkürzungen und Erläuterungen

### 2.1 Verbindungen

1. Flezelastin (D-18024)  
4-[(4-Fluorphenyl)methyl]-2-[hexahydro-1-(2-phenylethyl)-1H-azepin-4-yl]-1(2H)-phthalazinon
2. N-Desphenethylflezelastin (D-21440)  
4-[(4-Fluorphenyl)methyl]-2-(hexahydro-1H-azepin-4-yl)-1(2H)-phthalazinon
3. D-22258  
4-[(4-Fluorphenyl)methyl]-2-[5-(2-phenylethyl)amino-1-carboxy-3-pentyl]-1(2H)-phthalazinon
4. Flezelastin-N-Oxid  
4-[(4-Fluorphenyl)methyl]-2-[hexahydro-1-(2-phenylethyl)-1-oxo-1H-azepin-4-yl]-1(2H)-phthalazinon
5. Azelastin (Allergodil®)  
4-[(4-Chlorphenyl)methyl]-2-(hexahydro-1-methyl-1H-azepin-4-yl)-1(2H)-phthalazinon
6. Ketamin  
2-(2-Chlorphenyl)-2-methylaminocyclohexanon

## 2.2 Kenngrößen

### 2.2.1 Chromatographische Kenngrößen

$t_R$	Retentionszeit	
$t_0$	Totzeit	
$k'$ :	Kapazitätsfaktor	$k' = (t_R - t_0) / t_0$
$\alpha$ :	Trennfaktor	$\alpha = k'_2 / k'_1$
$R$ :	Auflösung	$R = 2 \times (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$
$w$ :	Basisbreite des Peaks	

### 2.2.2 Elektrophoretische Kenngrößen

$t_R$ :	Migrationszeit	[min]
$L$ :	Gesamtlänge der Kapillare	[cm]
	Strecke: Anode - Kathode	
$EL$ :	Effektive Länge der Kapillare	[cm]
	Strecke: Anode - Detektionsfenster	
$V$ :	Angelegte Spannung	[V]
$E$ :	Effektive Spannung	$E = V / L$ [V/cm]
$A$ :	Stromstärke	[A]

### 2.2.3 Statistische Kenngrößen

AVG	Mittelwert
$n$ :	Anzahl der Meßwerte
SD:	Standardabweichung der Stichprobe
$SD_{rel}$ :	relative Standardabweichung



r:	Korrelationskoeffizient
m:	Steigung der Kalibriergeraden
b:	Schnittpunkt der Kalibriergeraden mit der y-Achse

### 2.3. Häufig verwendete Abkürzungen

ACN:	Acetonitril
CD:	Cyclodextrin
CE:	Kapillarelektrophorese
CZE:	Kapillarzonenelektrophorese
DAD:	Diodenarraydetektion
DC:	Dünnschichtchromatographie
DEA:	Diethylamin
DMAA:	Dimethylacetamid
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
Em:	Emissionswellenlänge
Ex:	Anregungswellenlänge
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
LC-MS:	HPLC gekoppelt an ein Massenspektrometer
MS:	Massenspektrometrie
MS/MS:	Tandem-Massenspektrometrie
NADP:	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH:	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
n. b.:	nicht bestimmt
rpm:	Umdrehungen pro Minute
TBAH:	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

### 3 Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels HPLC an chiralen stationären Phasen

#### 3.1 Enantiomerentrennung von Flezelastin

##### 3.1.1 Chiral-AGP<sup>®</sup>

Säule: Chiral-AGP<sup>®</sup>, 100 x 4 mm, 5 µm

Detektion: UV, 210 nm

Flow: 0,9 ml/min

Mobile Phase	Phosphatpuffer 0,0125 M	ACN
	TBAH 0,0125 M, pH 4,0 [%]	
A	96	4
B	95	5
C	93	7
D	91	9

Tab 1: Zusammensetzung der mobilen Phasen zur Enantiomerentrennung an Chiral-AGP<sup>®</sup>

Mobile Phase	$t_R (+)-1$ [min]	$t_R (-)-1$ [min]	$k' (+)-1$	$k' (-)-1$	$\alpha$	R
A	21,97	32,19	18,44	27,49	1,49	1,85
B	17,57	24,70	14,65	20,99	1,43	1,64
C	16,71	23,51	13,83	19,86	1,44	1,60
D*	12,08	15,40	7,16	9,41	1,31	1,14

Tab. 2: Abhängigkeit der Razemattrennung von Flezelastin (1) an Chiral-AGP<sup>®</sup> vom ACN-Anteil der mobilen Phase  
\*Flow: 0,7 ml/min

### 3.1.2 Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>

Säule: Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>, 150 x 4 mm, 7 $\mu$ m

Detektion: UV, 210 nm

Mobile Phase	Isopropanol [%]	Phosphatpuffer 0,05 M, pH 5,0 [%]	Flow [ml/min]
A	1	99	0,8
B	0	100	1,5
C	0	100	1,0

Tab 3: Zusammensetzung der mobilen Phasen zur Enantiomerentrennung an Resolvosil-BSA-7<sup>®</sup>

Mobile Phase	$t_R (+)-1$ [min]	$t_R (-)-1$ [min]	$k' (+)-1$	$k' (-)-1$	$\alpha$	R
A	11,44	16,68	5,18	8,02	1,55	1,16
B	9,73	15,57	6,48	10,98	1,69	1,23
C	11,86	18,96	6,80	11,47	1,69	1,35

Tab. 4: Einfluß der mobilen Phase und des Flows auf die Razemattrennung des Flezelastins (1)

### 3.1.3 Chiralcel OD®

Säule: Chiralcel OD®, 250 x 4,6 mm, 10 µm

Detektion: UV, 292 nm

a) Mobile Phase: Hexan/Isopropanol 90/10

Flow [ml/min]	$t_R (-)-1$ [min]	$t_R (+)-1$ [min]	$k' (-)-1$	$k' (+)-1$	$\alpha$	R
0,5	26,52	28,89	3,15	3,54	1,12	0,88
0,7	19,15	20,86	3,88	4,25	1,10	0,67

Tab. 5: Trennversuche an Chiralcel OD® ohne DEA-Zusatz zur mobilen Phase

b) Mobile Phase: Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/0,1

Flow [ml/min]	$t_R (-)$ -1 [min]	$t_R (+)$ -1 [min]	$k' (-)$ -1	$k' (+)$ -1	$\alpha$	R
0,5	29,99	36,30	3,57	4,54	1,21	2,52
0,6	24,66	29,78	3,52	4,46	1,27	2,28
0,7	21,08	25,27	3,50	4,39	1,25	2,01

Tab. 6: Trennversuche an Chiralcel OD<sup>®</sup> mit DEA-Zusatz zur mobilen Phase

### 3.1.4 Chiralcel OD-R<sup>®</sup>

Säule: Chiralcel OD-R<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m

Detektion: UV, 210 nm

Flow: 0,4 ml/min

Mobile Phase: Natriumperchloratpuffer 0,5 M/ACN 40/60

$t_R (+)$ -1 [min]	$t_R (-)$ -1 [min]	$k' (+)$ -1	$k' (-)$ -1	$\alpha$	R
26,24	29,55	2,62	3,08	1,18	1,32

Tab. 7: Enantiomertrennung von Flezelastin (1) an Chiralcel OD-R<sup>®</sup>

### 3.1.5 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Zur Enantiomerentrennung von Flezelastin wurden Fließmittelgemische mit steigendem Basenzusatz eingesetzt.

Säule: Chiralpak AD<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 10 µm  
 Detektion: UV, 292 nm  
 Flow: 0,9 ml/min  
 Mobile Phase: Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/x

DEA [%]	t <sub>R</sub> (-)-1 [min]	t <sub>R</sub> (+)-1 [min]	k' (-)-1	k' (+)-1	α	R
0,1	18,92	22,68	3,61	4,52	1,25	1,28
0,5	14,80	17,48	2,93	3,64	1,24	1,31
0,7	15,43	18,28	3,11	3,87	1,25	1,36
0,8	15,59	18,47	2,76	3,45	1,25	1,42

Tab. 8: Einfluß des Basenzusatzes zur mobilen Phase auf die Enantiomerentrennung von Flezelastin (1) an Chiralpak AD<sup>®</sup>

### 3.1.6 Säulen ohne Trennergebnis

#### Chiralcel OJ<sup>®</sup>

Säule: Chiralcel OJ<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 10 µm  
 Detektion: UV, 292 nm  
 Mobile Phase: Hexan/Isopropanol 90/10  
 Flow: 0,5 ml/min

Flezelastin eluierte unter diesen Bedingungen nach 60 min noch nicht. Bestand die mobile Phase aus reinem Hexan, konnte Flezelastin ungetrennt mit einer Retentionszeit von 11 min detektiert werden. Bereits bei einem 1%igen Isopropanolzusatz eluierte Flezelastin innerhalb von 60 min nicht mehr.

### Ultron ES-OVM<sup>®</sup>

Säule: Ultron ES-OVM, 150 x 4,6 mm

Detektion: UV, 210 nm

Flow: 1,0 ml/min

a) Mobile Phase: Phosphatpuffer 5 mM, pH 5,6/Isopropanol 97,5/2,5  
Flezelastin eluierte innerhalb von 60 Minuten nicht.

b) Mobile Phase: Phosphatpuffer 5 mM, pH 5,6/Isopropanol 77,5/22,5  
Es gelang eine Antrennung. Die Peaks eluierten nach 11,08 und 13,41 min.

c) Mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mM, pH 5,6/Isopropanol 80/20  
Es gelang eine Antrennung. Die Peaks eluierten nach 9,64 und 11,80 min.

d) Mobile Phase: Phosphatpuffer 10 mM, pH 4,0/Ethanol 90/10  
Flezelastin zeigte eine Antrennung bei 27,28 und 34,47 min.

e) Mobile Phase: Phosphatpuffer 0,0125 M, TBAH 0,0125 M, pH 4,0/  
Isopropanol 75/25  
Flezelastin eluierte ungetrennt nach 4,33 min. Eine Herabsetzung des Flows auf 0,5 ml/min ließ Flezelastin ebenfalls ungetrennt nach 9,04 min eluieren.

f) Mobile Phase: Phosphatpuffer 0,0125 M, TBAH 0,0125 M, pH 4,0/ACN  
90/10

Flezelastin eluierte ungetrennt nach 46,51 min. Nach Erhöhen des pH-Wertes auf 5,6 eluierte Flezelastin ebenfalls ungetrennt nach 55,59 min.

## 3.2 Enantiomerentrennung von Desphenethylflezelastin

### 3.2.1 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Säule: Chiralpak AD<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m  
 Detektion: UV, 292 nm  
 Flow: 0,9 ml/min  
 Mobile Phase: Hexan/Isopropanol/DEA 90/10/x

DEA [%]	$t_{R1}$ [min]	$t_{R2}$ [min]	$k'1$	$k'2$	$\alpha$	R
0,1	35,89	41,79	8,42	9,97	1,18	0,87
0,5	31,72	37,20	7,44	8,89	1,20	1,05
0,8	26,52	30,69	5,98	7,08	1,18	1,10

Tab. 9: Einfluß des Basenzusatzes zur mobilen Phase auf die Enantiomerentrennung von D-21440 (**2**) an Chiralpak AD<sup>®</sup>



**Testung weiterer Fließmittelgemische:**

- a) Mobile Phase: Hexan/Ethanol 90/10  
Flow: 0,7 ml/min  
D-21440 eluiert ungetrennt nach 64,60 min.  
0,1%iger DEA-Zusatz und Erhöhung des Flows auf 0,9 ml/min beschleunigte die Elution des ungetrennten D-21440 auf 31,39 min.
- b) Mobile Phase: Hexan/2-Butanol/DEA 90/10/0,1  
Flow: 0,9 ml/min  
D-21440 eluierte angetrennt und mit starkem Tailing nach 46,11 und 51,41 min.
- c) Mobile Phase: Hexan/Isopropanol/2-Butanol/DEA 90/5/5/0,1  
Flow: 0,9 ml/min  
D-21440 zeigte eine gute Antrennung ( $R = 0,74$ ). Die Peaks eluierten bei 31,40 und 35,96 min.

**3.2.2 Weitere getestete Säulen****Chiral-AGP<sup>®</sup>**

Chromatographische Bedingungen: gemäß Kap. 3.1.1

a) mobile Phase: 4 Teile ACN

D-21440 eluierte ungetrennt mit dem Lösungsmittelpeak.

b) mobile Phase: ohne Modifier

D-21440 zeigte eine Antrennung. Die Peaks eluierten bei 5,65 und 7,15 min.

Alle weiteren in Kap. 3.1 angeführten stationären Phasen zeigten keine ausreichende Selektivität, so daß D-21440 von allen Säulen ungetrennt eluierte.

### 3.2.3 Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere des Desphenethylflezelastins

Von den Enantiomeren und dem Razemat des Flezelastins wurden Stammlösungen hergestellt, die 800 µg/ml (+)- bzw. (-)-Flezelastin-HCl enthielten. Aliquots wurden in Normalschliffgläser pipettiert und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Die Inkubationen wurden mit induzierten Rattenlebermikrosomen gemäß Kap. 6.2.1 durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte gemäß Kap. 5.3.1.

Inkubationsansatz:

- |    |         |   |
|----|---------|---|
| 1) | 100 µg  | Substrat                                      |
| 2) | 1000 µl | Tris-Puffer pH 7,8                            |
| 3) | 100 µl  | MgCl <sub>2</sub> 0,06 M                      |
| 4) | 250 µl  | induzierte Rattenlebermikrosomen, Charge 5/93 |
| 5) | 200 µl  | NADPH-Lösung (8 mg/ml)                        |

Chromatographische Bedingungen:

Vorsäule:	Chiralpak AD <sup>®</sup> , 50 x 4,6 mm, 10 µm	
Hauptsäule:	Chiralpak AD <sup>®</sup> , 250 x 4,6 mm, 10 µm	
Mobile Phase:	Hexan/Isopropanol/DEA	90/10/0,8
Flow:	0,9 ml/min	
Detektion:	UV, 292 nm	

Substrat	Flezelastin (1)		D-21440 (2)	
	$t_R (-)-1$ [min]	$t_R (+)-1$ [min]	$t_{R1} 2$ [min]	$t_{R2} 2$ [min]
<i>rac</i> -1	17,80	20,81	30,96	34,77
(-)-1	17,68	-	30,80	-
(+)-1	-	21,51	-	35,39

Tab. 10: Bestimmung der Elutionsreihenfolge nach Inkubation der einzelnen Enantiomere des Flezelastins (1)

### 3.3 Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten

#### 3.3.1 Chiralpak AD<sup>®</sup>

Säule: Chiralpak AD<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 10  $\mu$ m

Detektion: UV, 292 nm

Flow: 1,0 ml/min

Mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/Ameisensäure 98% 80/20/1

$t_{R1} 3$ [min]	$t_{R2} 3$ [min]	$k'1$	$k'2$	$\alpha$	R
19,71	25,24	4,19	5,64	1,35	1,32

Tab. 11: Enantiomerentrennung von D-22258 (3) an Chiralpak AD<sup>®</sup>

Flezelastin lies sich unter diesen Bedingungen auch in die Enantiomere auftrennen ( $t_R$  (+)-**1**: 34,10 min;  $t_R$  (-)-**1**: 46,23 min). Allerdings waren die Peaks sehr breit und wiesen starkes Tailing auf.

D-21440 (**2**) koeluierte ungetrennt mit dem zweiten Peak des D-22258-Razemates (**3**).

### 3.3.2 Chiral-AGP<sup>®</sup>

Säule: Chiral-AGP<sup>®</sup>, 100 x 4 mm, 5  $\mu$ m

Detektion: UV, 210 nm

Flow: 0,7 ml/min

Mobile Phase: Phosphatpuffer 0,0125 M, TBAH 0,0125 M, pH 4,0/ACN

96/4

$t_{R1}$ <b>3</b> [min]	$t_{R2}$ <b>3</b> [min]	$k'1$	$k'2$	$\alpha$	<b>R</b>
18,94	32,21	9,64	17,10	1,77	1,97

Tab. 12: Enantiomerentrennung von D-22258 (**3**) an Chiral-AGP<sup>®</sup>

Unter diesen Bedingungen koeluierte Flezelastin (**1**) mit D-22258 (**3**).

### 3.4 Überprüfung der Enantiomerenreinheit

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Flezelastin wurde die chirale Trennung an der Chiralcel OD<sup>®</sup> genutzt. Es wurden sowohl Lösungen der einzelnen Enantiomere in der mobilen Phase mit einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml als auch Lösungen, die Zumischungen von 1 bzw. 2% Razemat enthielten, hergestellt.

Chromatographische Bedingungen:

Säule:	Chiralcel OD <sup>®</sup> , 250 x 4,6 mm, 10µm	
Mobile Phase:	Hexan/Isopropanol/DEA	90/10/0,1
Flow:	0,7 ml/min	
Detektion:	UV, 292 nm	
Probe:	20 µl der jeweiligen Lösung	

## 4 Direkte Enantiomerentrennung von Flezelastin und zwei seiner Metaboliten mittels Kapillaronenelektrophorese

### 4.1 Enantiomerentrennung von Flezelastin

#### 4.1.1 Herstellung der Lauf- und Elektrodenpuffer

Als Standardpuffer für die Trennversuche wurde Phosphatpuffer eingesetzt. Es wurde eine Stammlösung hergestellt, die nach Verdünnen mit Aqua bidest. auf die jeweiligen Molaritäten eingestellt werden konnte. 0,1 M Phosphorsäure diente zur Einstellung der pH-Werte.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 M (13,61 g/l)
$\text{H}_3\text{PO}_4$	0,1 M (2,61 g $\text{H}_3\text{PO}_4$ 85% ad 100 ml)

Folgende Cyclodextrine wurden getestet:

Cyclodextrin	Abkürzung	Molare Substitution
$\alpha$ -Cyclodextrin	$\alpha$ -CD	-
$\beta$ -Cyclodextrin	$\beta$ -CD	-
$\gamma$ -Cyclodextrin	$\gamma$ -CD	-
Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin	HP- $\beta$ -CD	0,9
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	ME- $\beta$ -CD	1,8

Tab. 13: Getestete Cyclodextrine zur Enantiomerentrennung von Flezelastin

Zur Herstellung der Laufpuffer wurde eine entsprechende Menge des jeweiligen Cyclodextrins in 50 mM Phosphatpuffer pH 3,5 im Ultraschallbad gelöst.

Als Elektrodenpuffer diente 100 mM Phosphatpuffer pH 3,5.

Alle Puffer wurden vor Verwendung filtriert (0,46  $\mu\text{m}$ ) und im Ultraschallbad 10 min entgast.

Die Kapillare wurde vor jeder Analyse 1 min mit 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und anschließend 2 min mit dem cyclodextrinhaltigen Laufpuffer gespült.

#### 4.1.2 Ergebnisse der Trennversuche

System:	Grom
Kapillare:	59 cm L, 42 cm EL, 50 $\mu\text{m}$ ID
Effektive Spannung:	339 V/cm
Probenaufgabe:	10 s hydrodynamisch, 10 cm
Probenlösung:	Flezelastin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50 mM Phosphatpuffer, pH 3,5/ Methanol 90/10
Detektion:	UV, 210 nm

CD	mM	$t_R (+)-1$ [min]	$t_R (-)-1$ [min]	$\alpha$	R
$\alpha$ -CD	16,3	10,45	10,45	-	-
$\alpha$ -CD	30,0	11,60	11,60	-	-
$\beta$ -CD	16,3	15,77	16,13	1,02	1,44
$\gamma$ -CD	16,3	12,67	12,79	1,01	0,96
$\gamma$ -CD*	30,0	22,02	22,25	1,00	0,91
HP- $\beta$ -CD	16,3	15,60	15,75	1,01	0,94
ME- $\beta$ -CD	16,3	16,43	16,61	1,01	1,06

Tab. 14: Enantiomerentrennung von Flezelastin mit unterschiedlichen CD  
\*Effektive Spannung: 254 V/cm

## 4.2 Gleichzeitige Enantiomerentrennung von Flezelastin, Desphenethylflezelastin und des Carboxymetaboliten

### 4.2.1 Enantiomerentrennung von Desphenethylflezelastin

Desphenethylflezelastin (**2**) ließ sich durch Zusatz von  $\beta$ -CD zum Laufpuffer unter den gleichen Bedingungen wie Flezelastin (s. Kap. 4.1.2) in die Enantiomere auftrennen. Die parallele Trennung von Flezelastin war aufgrund der ausreichenden Differenz der Migrationszeiten möglich.

Probenlösung: D-21440 50  $\mu$ g/ml in 50 mM Phosphatpuffer, pH 3,5/  
Methanol 90/10

CD	mM	$t_{R1}$ <b>2</b> [min]	$t_{R2}$ <b>2</b> [min]	$\alpha$	R
$\beta$ -CD	16,3	10,80	10,63	0,98	1,63

Tab. 15: Enantiomerentrennung von D-21440 (**2**) mit  $\beta$ -CD



### 4.2.2 Enantiomerentrennung des Carboxymetaboliten

Elektropherographische Bedingungen: s. Kap. 4.1.2

Probenlösung: D-22258 50 µg/ml in 50 mM Phosphatpuffer, pH 3,5/  
Methanol 90/10

pH	$t_{R1}$ <b>3</b> [min]	$t_{R2}$ <b>3</b> [min]	$\alpha$	R
2,45	13,08	13,24	1,01	1,11
3,75	20,32	20,57	1,01	1,03
4,3	19,89	19,89	-	-

Tab. 16: Einfluß des pH-Wertes auf die Enantiomerentrennung von D-22258 (**3**)

pH	D-22258 ( <b>3</b> )		Flezelastin ( <b>1</b> )	
	$t_{R1}$ <b>3</b> [min]	$t_{R2}$ <b>3</b> [min]	$t_R$ (+)- <b>1</b> [min]	$t_R$ (-)- <b>1</b> [min]
2,45	13,08	13,24	13,05	13,42

Tab. 17: Vergleich der Migrationszeiten von D-22258 (**3**) und Flezelastin (**1**) bei pH 2,45

## 5 Achirale chromatographische Bestimmung von Flezelastin und seinen Metaboliten aus biologischer Matrix

### 5.1 Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Verfahrens

#### 5.1.1 Trennung an einer RP 18-Phase

Säule: LiChrospher® 100 RP 18, 250 x 4 mm, 5µm  
 Mobile Phase: Phosphatpuffer 50 mM, pH 3,5/ACN 60/40  
 Flow: 1,2 ml/min  
 Detektion: UV, 210 nm

Verbindung	$t_R$ [min]	$t_R'$ [min]	$k'$
1	35,23	33,57	20,22
2	6,02	4,36	2,63
3	14,33	12,67	7,63
4/5	20,33	18,67	11,25

Tab. 18: Trennung der Verbindungen 1-5 an LiChrospher® RP 18

### 5.1.2 Trennung an einer Si-60-Phase

Säule:	LiChrospher® Si-60, 250 x 4 mm, 5 µm	
Vorsäule:	LiChrospher® Si-60, 4 x 4 mm, 5 µm	
Mobile Phase:	Methanol/HClO <sub>4</sub> 60%	100/0,0025-0,0075
Flow:	0,5 ml/min	
Detektion:	UV, 210 nm	

Verbindung	t <sub>R</sub> [min]	t <sub>R</sub> ' [min]	k'
<b>1</b>	16,11	13,75	5,83
<b>2</b>	25,57	23,21	9,83
<b>3</b>	10,11	7,75	3,28
<b>4/5</b>	12,87	10,51	4,45

Tab. 19: Trennung der Verbindungen **1-5** an LiChrospher® Si-60

Der Einsatz eines Flow-Gradienten (bis 17 min 0,5, ab 17 min 0,9 ml/min) bewirkte für D-21440 (**2**) eine Verkürzung der Retentionszeit auf 21,56 min. Diese Variation der Methode wurde für die Fluoreszenzdetektion gewählt (s. Kap. 5.2.2).

## 5.2 Wahl des internen Standards

Chromatographische Bedingungen:

Säule:	LiChrospher® Si-60, 250 x 4 mm, 5 µm	
Vorsäule:	LiChrospher® Si-60, 4 x 4 mm, 5 µm	
Mobile Phase:	Methanol/HClO <sub>4</sub>	100/0,0025-0,0075
Flow:	0,5 ml/min	

### 5.2.1 Wahl des internen Standards für die UV-Detektion

Detektion: UV, 210 nm

Folgende Substanzen wurden getestet:

Substanz	t <sub>R</sub> [min]
Bamethan	10,35
Halofantrin	10,57
Meclozin	12,80
Anilin	14,64
Diphenhydramin	17,89
Miconazol	17,96
Codein	18,16
Ketamin	20,69
Vincamin	29,27
Diclofensin	33,10
Mianserin	42,13
Methixen	46,23
Bamipin	> 60

Tab. 20: Testung verschiedener stickstoffhaltiger Substanzen auf ihre Eignung zum internen Standard bei UV-Detektion

Aufgrund seines chromatographischen Verhaltens wurde Ketamin als interner Standard ausgewählt. Es eluierte nach Flezelastin (1) und vor D-21440 (2). Alle anderen getesteten Substanzen fielen entweder mit Metaboliten zusammen oder eigneten sich wegen ihrer zu langen Verweildauer auf der Säule nicht.

### 5.2.2 Wahl des internen Standards für die Fluoreszenzdetektion

Detektion: Fluoreszenz, Ex: 210 nm, Em: 260 nm

Da Ketamin keine Eigenfluoreszenz aufweist, mußte für die fluorimetrische Detektion ein neuer interner Standard gefunden werden.

Folgende Substanzen wurden getestet:

Substanz	$t_R$ [min]
Benoxaprofen	5,82
Trimethoprim	5,86
Naproxen	6,17
Theobromin	23,04
Nomifensin	31,56
Azelastin	38,43
Zolpidem	43,08
Zopiclon	> 45
Chinin	> 45
Chinidin	> 45
Cinchonidin	> 45

Tab. 21: Testung verschiedener fluoreszierender Substanzen auf ihre Eignung zum internen Standard bei Fluoreszenzdetektion

Von den eingesetzten Substanzen kamen aufgrund ihrer Retentionszeiten nur Nomifensin und Azelastin in Frage. Alle übrigen koeluierten mit Metaboliten oder mit Interferenzen aus der biologischen Matrix. Die Strukturverwandtschaft zum Flezelastin legte die Wahl des Azelastins zum internen Standard nahe. Der Nachteil bestand in der späten Elution. Dieser wurde durch den Einsatz eines Flow-Gradienten ausgeglichen.

Flow-Gradient:            0-17 min:    0,5 ml/min  
                                  ab 17 min:    0,9 ml/min

Unter diesen Bedingungen eluierte Azelastin nach 29,56 Minuten.

## 5.3 Extraktionsverfahren

### 5.3.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zur Findung eines geeigneten Extraktionsverfahrens für Flezelastin, D-21440 und D-22258 wurden Inkubationsansätze mit Rattenlebersupernatant (s. Kap. 6.2) mit den Reinsubstanzen versetzt und mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen extrahiert.

Zunächst erfolgte Alkalisierung der Proben mit 0,1 N NaOH auf pH 10. Danach wurden die Proben 2 mal mit je 3 ml des jeweiligen Extraktionsmittels 10 min geschüttelt. Nach jeder Extraktion wurden die Ansätze 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol aufgenommen, 20 µl chromatographiert.

Folgende Extraktionsmittel wurden getestet:

Diethylether	
n-Hexan	
tert. Butylmethylether	
Diethylether/Ethylacetat	4/1
n-Hexan/Diethylether	7/3
n-Hexan/Ethylacetat	4/1
n-Hexan/Isoamylalkohol	95/5
Cyclohexan/Ethylacetat	7/3
Cyclohexan/Ethylacetat	4/1

Als geeignet erwies sich die Mischung aus Cyclohexan/Ethylacetat 4/1, die eine ausreichende Wiederfindung mit guter Reinheit der Proben verbindet.

Neben der Alkalisierung der wäßrigen Phase wurde auch eine Ansäuerung mit 0,1 N HCl auf pH 2 vorgenommen. Diese bewirkte eine reduzierte Wiederfindung und Reinheit der Proben.

### **Versuche zur Proteinfällung**

Die oben angeführte Extraktionsmethode beinhaltete keine gesonderte Abtrennung der in den biologischen Proben vorhandenen Proteine. Diese setzten sich nach Zentrifugation als eine zusammenhängende Schicht zwischen der wäßrigen und der organischen Phase ab, so daß das Extraktionsmittel problemlos abgenommen werden konnte.

Testung der Proteinfällung vor Extraktion:

- a) Ansätze für 15 min bei 60°C im Wasserbad belassen
- b) Zugabe von eiskaltem Acetonitril (halbes Volumen der Gesamtmenge)

Die koagulierten Proteine wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser wie oben angeführt extrahiert.

Die Chromatogramme der so behandelten Proben wiesen eine große Reinheit auf. Sie zeigten weniger Störpeaks als die der ohne vorherige Proteinfällung extrahierten Ansätze. Allerdings ging dies aufgrund der starken Proteinbindung von **1** und seinen Metaboliten mit einer verringerten Wiederfindung einher.



### Chromatographie ohne vorherige Extraktion

Um von einem Inkubationsansatz ohne weitere Extraktionsschritte ein Aliquot direkt analysieren zu können, mußte dessen Volumen zunächst verringert werden.

Es wurden folgende Ansätze hergestellt:

Ansatz	Tris 0,05 M, pH 7,8/ MgCl <sub>2</sub> 0,1 M 20/1 [µl]	Rattenlebermikro- somen [µl]	NADPH 8 mg/ml [µl]
1	100	200	100
2	50	100	50

Tab. 22: Volumenverringerte Inkubationsansätze zur Direktinjektion

Nach der 1stündigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden die Proteine mit eiskaltem ACN (Ansatz 1: 200 µl, Ansatz 2: 100 µl) gefällt. 20 µl des wäßrigen, nach Zentrifugation erhaltenen Überstands wurden chromatographiert.

#### 5.3.2 Festphasenextraktion

a) Isolute® C18, Fa. ict, 500 mg

Konditionieren: 1 x 1 ml ammoniakalischer Methanol, pH 9  
2 x 1 ml Aqua bidest.

Probenaufgabe: Inkubationsansatz + 500 µl ACN/Aqua bidest 50/50

Waschen: 3 x 1 ml Aqua bidest.

2 x 1 ml Aqua bidest./Methanol 70/30

Trocknen: 15 min i. Vak.  
Elution: 2 x 1 ml ammoniakalisches Methanol, pH 9  
oder 2 x 1 ml Cyclohexan/Ethylacetat

b) Isolute<sup>®</sup> SCX (Benzolsulfonsäure), Fa. ict, 500 mg

Konditionieren: 2 x 1 ml Methanol  
1 x 1 ml Aqua bidest.  
1 x 1 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM  
Probenaufgabe: Inkubationsansatz + 500 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM  
Waschen: 1 x 1 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM  
1 x 1 ml Methanol  
Elution: 2 x 1 ml ammoniakalisches Methanol, pH 9  
oder 2 x 1 ml Cyclohexan/Ethylacetat

Das Elutionsmittel wurde unter Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt und in 200 µl Methanol gelöst.

Bei der direkten Aufgabe von Mikrosomeninkubationen auf die Festphasensäulen entstand das Problem, daß letztere sich sehr schnell zusetzten, so daß kein Spülvorgang mehr möglich war. Wenn die Proteine vor Aufgabe abgetrennt wurden, war aber wiederum die Wiederfindung reduziert (vgl. Kap. 5.3.1).

## 5.4 Validierung des analytischen Verfahrens

### 5.4.1 Validierung der Analytik mit UV-Detektion

#### 5.4.1.1 Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion

Zur Überprüfung der Linearität der Vergleichssubstanzen gegenüber dem internen Standard wurden Stammlösungen in Methanol hergestellt.

Flezelastin (1):	449,4 µg/ml
D-21440 (2):	135,0 µg/ml
D-22258 (3):	66,2 µg/ml
Ketamin (6):	854,7 µg/ml

Aus diesen Stammlösungen wurden jeweils Aliquots entnommen, die direkt oder nach Verdünnen mit Methanol in 10 ml Normalschliffgläser überführt und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt wurden. Die einzelnen Ansätze enthielten unterschiedliche Konzentrationen von **1**, **2** und **3** und eine immer konstante Menge an internem Standard **6** (10,0 µg/200 µl). Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol aufgenommen. 20 µl dieser Lösung wurden wie in Kap. 5.1.2 chromatographiert. Die Anzahl der Messungen pro Kalibrierpunkt betrug 3. Das Verhältnis der Peakflächen von **1**, **2** und **3** zum internen Standard **6** wurde gegen die Konzentration aufgetragen, wobei sich ein linearer Zusammenhang ergab.

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 1/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
40,221	10,080	0,181	1,80
24,986	7,125	0,053	0,74
10,022	2,736	0,046	1,68
4,988	1,532	0,023	1,50
2,494	0,851	0,008	0,94

Tab. 23: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Flezelastin (1) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 1/6 vor Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 2/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
29,970	11,171	0,295	2,64
19,980	7,498	0,037	0,49
9,990	3,167	0,025	0,79
4,995	1,834	0,046	2,51
2,498	0,897	0,011	1,23

Tab. 24: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-21440 (2) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 2/6 vor Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 3/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
4,965	1,0807	0,0297	2,75
2,516	0,6190	0,0144	2,33
1,000	0,2413	0,0067	2,78
0,500	0,1265	0,0011	0,87
0,250	0,0820	0,0046	5,61

Tab. 25: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-22258 (3) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 3/6 vor Extraktion

Parameter der linearen Regression:

- 1:  $f(x) = 0,250016 x + 0,328791$   $r = 0,992889$   
 2:  $f(x) = 0,378343 x - 0,189817$   $r = 0,995655$   
 3:  $f(x) = 0,215319 x + 0,032837$   $r = 0,994483$

#### 5.4.1.2 Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion

Zur Überprüfung der Linearität nach Extraktion wurden unterschiedliche Mengen der Stammlösungen **1-3** in 10 ml Normalschliffgläser pipettiert und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Hinzugefügt wurden 1100 µl Tris-Puffer pH 7,8, 100 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 250 µl Rattenlebermikrosomen und jeweils 11,7 µl der Standardlösung (**6**). Diese Zusammensetzung entsprach einem Standardinkubationsansatz ohne NADPH. Die Extraktion erfolgte nach Kap. 5.3.1 mit Cyclohexan/Ethylacetat 4/1. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol aufgenommen. 20 µl dieser Lösung wurden gemäß Kap. 5.1.2 chromatographiert.

Konz. [µg/200 µl]	AVG Area 1/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
49,973	21,0941	0,1006	0,48
30,020	14,4401	0,7723	5,35
10,022	6,4747	0,2187	3,38
4,988	3,4108	0,0841	2,47
2,494	1,4169	0,1203	8,49

Tab. 26: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Flezelastin (**1**) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 1/6 nach Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 2/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
39,960	2,4374	0,0058	0,24
20,007	1,0983	0,0719	6,55
10,004	0,6737	0,0602	8,94
4,995	0,4155	0,0126	3,03
2,498	0,1879	0,0025	1,33

Tab. 27: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-21440 (2) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 2/6 nach Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 3/6	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
10,009	1,8717	0,0114	0,61
4,998	0,8438	0,0217	2,57
2,502	0,6719	0,0196	2,92
1,000	0,2807	0,0132	4,70
0,500	0,1318	0,0024	1,82

Tab. 28: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-22258 (3) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 3/6 nach Extraktion

Parameter der linearen Regression:

- 1:  $f(x) = 0,405089 x + 1,468079$   $r = 0,986162$   
 2:  $f(x) = 0,058279 x + 0,059573$   $r = 0,989614$   
 3:  $f(x) = 0,174338 x + 0,097155$   $r = 0,978781$

## 5.4.2 Validierung der Analytik mit Fluoreszenzdetektion

### 5.4.2.1 Linearität im Vergleich zum internen Standard vor Extraktion

Zunächst wurden neue Stammlösungen der Vergleichssubstanzen und des internen Standards für die Fluoreszenzdetektion hergestellt.

Flezelastin (1):	774,4 µg/ml
D-21440 (2):	219,3 µg/ml
D-22258 (3):	38,6 µg/ml
Azelastin (7):	339,3 µg/ml

Die weitere Vorgehensweise entspricht der unter Kap. 5.4.1.1 angegebenen. Die Anzahl der Messungen pro Kalibrierpunkt betrug 6.

Konz. [µg/200 µl]	AVG Area 1/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
60,016	9,5477	0,7522	7,88
50,026	8,5605	0,1734	2,03
29,969	4,8089	0,4386	9,12
9,990	1,8274	0,1323	7,24
4,995	0,8120	0,0768	9,46
2,498	0,3888	0,0326	8,38

Tab. 29: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Flezelastin (1) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 1/7 vor Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 2/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
40,000	3,5173	0,1872	5,32
20,000	1,6356	0,1066	6,52
10,000	0,8502	0,0456	5,36
5,000	0,4322	0,0253	5,85
2,500	0,2113	0,0043	2,04
1,750	0,0993	0,0026	2,62

Tab. 30: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-21440 (2) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 2/7 vor Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 3/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
15,015	2,6934	0,0856	3,18
9,997	1,7869	0,1171	6,55
5,003	0,8886	0,0350	3,94
2,999	0,4929	0,0480	9,74
1,999	0,3790	0,0260	6,86
0,502	0,0856	0,0067	7,83

Tab. 31: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-22258 (3) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 3/7 vor Extraktion

Parameter der linearen Regression:

- 1:  $f(x) = 0,162720 x + 0,050036$   $r = 0,983299$   
 2:  $f(x) = 0,087829 x - 0,033863$   $r = 0,993193$   
 3:  $f(x) = 0,178802 x - 0,005958$   $r = 0,990545$



## 5.4.2.2 Linearität im Vergleich zum internen Standard nach Extraktion

Da die Fluoreszenzdetektion primär zur Analytik der Inkubationen genutzt wurde, die mit einem NADPH-regenerierenden System gemäß Kap. 6.2.2 durchgeführt wurden, mußte das Volumen der einzelnen Ansätze modifiziert werden. Zu den eingeeengten Aliquots der Stammlösungen 1-3 wurden 500 µl Tris-Puffer pH 7,8 und 200 µl Rattenlebermikrosomen pipettiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter Kap. 5.4.1.2 beschrieben. Die Zugabe von 29,5 µl der Standardlösung fand allerdings erst nach der Extraktion statt, da Azelastin (7) sich unter den angegebenen Bedingungen nicht ausreichend und reproduzierbar genug extrahieren ließ.

Konz. [µg/200 µl]	AVG Area 1/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
60,016	7,2896	0,5356	7,35
50,026	6,5968	0,2263	3,43
29,969	4,7236	0,2089	4,42
9,990	1,5702	0,1077	6,86
4,995	0,7401	0,0625	8,44
2,498	0,3887	0,0323	8,31

Tab. 32: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Flezelastin (1) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 1/7 nach Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 2/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
40,000	0,2662	0,0071	2,67
20,000	0,0984	0,0076	7,72
10,000	0,0623	0,0057	9,15
5,000	0,0215	0,0018	8,37
2,500	0,0141	0,0013	9,22
1,750	0,0105	0,0010	9,52

Tab. 33: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-21440 (2) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 2/7 nach Extraktion

Konz. [ $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ]	AVG Area 3/7	SD	SD <sub>rel</sub> [%]
15,015	0,2096	0,0061	2,91
9,997	0,1412	0,0107	7,58
5,003	0,0621	0,0028	4,51
2,999	0,0404	0,0037	9,16
1,999	0,0271	0,0012	4,43
0,502	0,0070	0,0007	10,00

Tab. 34: Zusammenhang zwischen der Konzentration von D-22258 (3) und dem Peakflächenquotienten AVG Area 3/7 nach Extraktion

Parameter der linearen Regression:

- 1:  $f(x) = 0,124196 x + 0,276002$   $r = 0,971162$   
 2:  $f(x) = 0,006547 x - 0,007229$   $r = 0,976210$   
 3:  $f(x) = 0,014028 x - 0,001829$   $r = 0,985114$

### 5.4.3 Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wurde die kleinste Konzentration des Analyten, die noch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 ergab, angesehen. Das Injektionsvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ .

	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Nachweisgrenze UV</b> <b>[<math>\mu\text{g}/20 \mu\text{l}</math>]</b>	10	n.b.
<b>Nachweisgrenze</b> <b>Fluoreszenz [<math>\mu\text{g}/20 \mu\text{l}</math>]</b>	2,5	5

Tab. 35: Nachweisgrenzen von 1 und 2

## 6 In-vitro-Untersuchungen zum Metabolismus des Flezelastins mit Hilfe von Leberzellfraktionen verschiedener Spezies

### 6.1 Herstellung und Charakterisierung der Leberhomogenate

Zur Gewinnung induzierter Rattenleberhomogenate erhielten männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 250-350 g über 6 Tage eine tägliche Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital (Luminal® Injektionslösung, Fa. Bayer) intraperitoneal. Am 6. Tag erfolgte zusätzlich Nahrungskarenz. Am 7. Tag wurden die Ratten tierschutzgerecht getötet und die Lebern entnommen. Nicht-induzierte Tiere wurden, bis auf die Injektionen, identisch behandelt. Das durchschnittliche Gewicht der induzierten Lebern war mit Werten zwischen 12 und 14 g deutlich höher als das der nichtinduzierten mit ca. 10 g.

Rinder- und Schweinelebern wurden direkt nach der tierschutzgerechten Schlachtung der Tiere von einer Schlachtereier (Fa. Erpenbeck, Glandorf) bezogen. Der Transport bis zur Aufarbeitung im Institut erfolgte in der unten angegebenen Pufferlösung auf Eis.

Die Humanmikrosomen wurden von ASTA Medica, Frankfurt am Main, bereitgestellt.

Die gesamte weitere Aufarbeitung der Organe erfolgte bei einer Raumtemperatur von 4°C. Alle benötigten Geräte und Lösungen befanden sich bereits über Nacht in diesem Labor.

Die vorliegenden Lebern wurden zuerst mit folgender Pufferlösung pH 7,4 blutfrei gewaschen:

Saccharose:	0,2500 M
Tris-HCl:	0,0050 M
EDTA:	0,0005 M

Daraufhin wurden die Lebern gewogen und mit einem Skalpell möglichst fein zerkleinert. Die eigentliche Homogenisierung erfolgte unter Zugabe von Puffer mit einem Elvehjem-Potter. Das so erhaltene Homogenat wurde mit weiterer Pufferlösung auf eine Konzentration von ca. 38% (G/V) eingestellt und anschließend 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden ca. 2 ml abgenommen und das Pellet mit Hilfe von Pasteurpipetten aufgewirbelt. Anschließend wurde ein zweites Mal bei 10.000 g zentrifugiert und beide Überstände vereinigt zur Supernatantfraktion. Der größte Teil des Supernatants wurde zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion 90 min bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand (= Cytosol) wurde abgetrennt und das Pellet (= Mikrosomen) unter Zugabe von Puffer resuspendiert. Die Mikrosomenfraktion wurde mit Puffer weiter verdünnt, so daß ca. 3 ml Suspension 1 g Leber (Frischgewicht) entsprachen. Die einzelnen Leberzellfraktionen wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration diente die Methode nach BRADFORD<sup>40</sup>. Hiernach wurde zuerst eine Stammlösung von kristallinem Boviserin<sup>®</sup> (Fa. Sigma), die 1 mg/ml enthielt, hergestellt, deren Gehalt photometrisch bei 280 nm überprüft wurde. Von der Stammlösung wurden Verdünnungen angesetzt, denen das Bradford-Farbreagens (Coomassie Brilliant-Blue G-250, Fa. Bio Rad Laboratories) zugefügt wurde. Aus den photometrischen Messungen bei 595 nm wurde eine Kalibriergerade erstellt. Die Proben der Leberzellfraktionen wurden mit Puffer so verdünnt, daß der Proteingehalt zwischen 0,2 und 1,0 mg/ml lag. Aliquots dieser Lösungen wurde ebenfalls das Farbreagens zugesetzt. Der Proteingehalt konnte anhand der Kalibriergeraden berechnet werden.

Spezies	Fraktion	Induktion	Proteingehalt [mg/ml]	Charge
Ratte	M	ja	5,14	5/93
Ratte	S	ja	31,37	5/93
Ratte	C	ja	16,91	5/93
Ratte	M	ja	7,49	2/94
Ratte	S	ja	28,4	2/94
Ratte	C	ja	n.b.	2/94
Ratte	M	nein	9,00	2/94
Ratte	S	nein	31,70	2/94
Ratte	C	nein	10,51	2/94
Rind	M	nein	9,62	9/94
Rind	S	nein	36,88	9/94
Rind	C	nein	29,36	9/94
Schwein	M	nein	7,70	10/94
Schwein	S	nein	56,08	10/94
Schwein	C	nein	44,72	10/94
Mensch	M	nein	1,00	10/93

Tab. 36: Charakterisierung der Leberzellfraktionen  
M: Mikrosomen, S: Supernatant, C: Cytosol

## 6.2 Inkubationsbedingungen

### 6.2.1 Inkubationen mit direkter Zugabe von NADPH

Von einer Flezelastin-Stammlösung in Methanol wurden Aliquots abgenommen, die etwa 0,11  $\mu\text{mol}$  (50,0  $\mu\text{g}$ ) entsprachen, und in 10 ml Normalschliffgläser überführt. Unter Stickstoffstrom wurde zur Trockne eingengt.

Für die Inkubationen wurden folgende Lösungen hergestellt:

Tris-Puffer 0,1 M pH 7,8 (20°C):	Tris-Base	0,986 g
	Tris-HCl	2,660 g
	Aqua bidest. ad	500,0 ml

Der pH-Wert wurde mit Phosphorsäure auf pH 7,8 eingestellt.

MgCl<sub>2</sub>-Lösung: 0,06 M in Aqua bidest.

NADPH-Lösung: 8 mg/ml in Tris-Puffer pH 7,8

Diese Lösung wurde stets kurz vor Verwendung frisch angesetzt.

In die Substrat-enthaltenden Normalschliffgläser wurden die einzelnen Lösungen in folgender Reihenfolge pipettiert:

- 1000  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer
- 100  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub>-Lösung
- 250  $\mu\text{l}$  Leberzubereitung
- 100  $\mu\text{l}$  NADPH-Lösung

Nach Zugabe von Magnetkernen, die während der Inkubation eine ständige Durchmischung und Belüftung der Proben ermöglichten, wurden die Ansätze in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gestellt. Gleichzeitig wurden Kontrollansätze ohne Substrat, ohne Leberpräparation oder ohne NADPH-Zusatz mitinkubiert.



Zum Abstoppen aller enzymatischer Reaktionen wurden die Proben in Behälter mit Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Extraktion gemäß Kap. 5.3.1.

### 6.2.2 Inkubationen mit einem NADPH-regenerierenden System

Für den größten Teil der Untersuchungen des Metabolismus von Flezelastin mit Hilfe von Leberzellfraktionen wurde ein NADPH-regenerierendes System eingesetzt, welches auch Langzeitinkubationen ohne weitere Kofaktorzugabe erlaubte. Das bereits verbrauchte NADPH wurde aus NADP und Isocitronensäure durch Einwirken der Isocitratdehydrogenase wieder regeneriert. Die Menge an NADP wurde so gewählt, daß sie bei einer eingesetzten Substratmenge von 0,11  $\mu\text{mol}$  als ca. 10facher Überschuß vorhanden war. Dies entsprach einem Standardinkubationsansatz mit direkter Zugabe von NADPH.

Das regenerierende System setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

EDTA · 2 H <sub>2</sub> O:	5,75 mmol, 2,14 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O:	28,8 mmol, 5,85 g
NADP:	2,33 mmol, 1,94 g
Isocitronensäure:	46,6 mmol, 13,7 g
Isocitratdehydrogenase:	672 U/l, 960 mg (Sigma: 0,7 U/mg) in H <sub>2</sub> O/Glycerin (24/24 ml)
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4	ad 1000,0 ml

Direkt nach der Herstellung wurde die Lösung zu je 4 bzw. 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurde die jeweils benötigte Menge aufgetaut.



Ein Standardinkubationsansatz bestand aus:

- ca. 0,11  $\mu\text{mol}$  Substrat
- 0,5 ml NADPH-regenerierendes System
- 200  $\mu\text{l}$  Leberzellpräparation

Die weitere Behandlung der Ansätze erfolgte wie unter Kap. 6.2.1 beschrieben.

### 6.2.3 Variation der Inkubationszeit

Um die Abhängigkeit der Umsetzung von Flezelastin mit Rattenlebermikrosomen von der Inkubationsdauer zu überprüfen, wurden je 2 Ansätze 0,5, 1, 2, 3 und 4 h unter den in Kap. 6.2.1 angegebenen Bedingungen inkubiert.

Als Enzymquelle dienten induzierte Rattenlebermikrosomen der Charge 5/93. Die Substratmenge pro Ansatz betrug 49,97  $\mu\text{g}$  ( $\approx 0,11 \mu\text{mol}$ ).

Inkubationszeit [h]	unmetabolisiertes 1 [ $\mu\text{g}$ ]	Restsubstrat [%]
0,5	8,43	16,87
1	6,17	12,35
2	4,98	9,97
3	5,10	10,21
4	6,02	12,05

Tab. 37: Abhängigkeit der Umsetzung von *rac*-Flezelastin (1) von der Inkubationszeit

#### 6.2.4 Variation der Proteinmenge

Es wurden Inkubationsansätze gemäß Kap. 6.2.1 mit unterschiedlichen Volumina an Rattenlebermikrosomen hergestellt. Die Mikrosomen stammten aus der Charge 5/93, die 5,14 mg/ml Protein enthielt. Die Volumendifferenz der einzelnen Proben wurde durch Addition von Tris-Puffer ausgeglichen. Die Substratmenge betrug wiederum 49,97 µg. Die Anzahl der Proben pro Meßpunkt war 2. Die Proben wurden für 2 h inkubiert.

Proteinmenge [mg]	unmetabolisiertes 1 [µg]	Restsubstrat [%]
0,2	16,56	33,14
0,5	14,57	29,16
0,8	11,97	23,95
1,285	9,48	19,97

Tab. 38: Abhängigkeit der Umsetzung von *rac*-Flezelastin (1) von der Proteinmenge im Inkubationsansatz

#### 6.2.5 Variation des NADPH-Zusatzes

Inkubationsansätze gemäß Kap. 6.2.1, die 0,11 µmol Flezelastin enthielten, wurden mit ansteigenden Vielfachen von 0,11 µmol NADPH versetzt. Dazu dienten NADPH-Lösungen einer Konzentration von 4 bzw. 8 mg/ml in Tris-Puffer. Die Volumina wurden durch Zugabe von Tris-Puffer ausgeglichen. Enzymquelle waren induzierte Rattenlebermikrosomen der Charge 5/93. Die Anzahl der Ansätze betrug 2. Die Inkubationszeit belief sich auf 2 h.

<b>NADPH molarer Überschuß</b>	<b>unmetab. 1 [µg]</b>	<b>2 [µg]</b>	<b>3 [µg]</b>	<b>Restsubstrat [%]</b>
1fach	44,88	1,84	0,044	89,81
2fach	36,84	3,93	0,417	73,72
3fach	33,48	6,11	1,301	67,00
5fach	32,23	13,13	1,530	64,50
7fach	31,65	19,75	1,979	63,34
10fach	22,7	20,55	3,225	45,43
15fach	14,11	22,01	4,285	28,24

Tab. 39: Einfluß der NADPH-Menge auf die Metabolisierung von *rac*-Flezelastin (1)

### 6.2.6 Variation des pH-Wertes des Inkubationsmediums

Der pH-Wert des Tris-Puffers wurde bei Raumtemperatur zwischen 7,0 und 8,6 variiert. Die 2stündigen Inkubationen wurden nach Kap. 6.2.1 durchgeführt, wobei induzierte Rattenlebermikrosomen der Charge 5/93 eingesetzt wurden. Pro pH-Wert wurden 2 Ansätze ausgewertet.

<b>pH-Wert</b>	<b>unmetabolisiertes 1 [µg]</b>	<b>Restsubstrat [%]</b>
7,0	16,40	32,82
7,4	15,33	30,68
7,8	8,58	17,17
8,2	7,86	15,73
8,6	14,07	28,16

Tab. 40: Einfluß des pH-Wertes des Inkubationsmediums auf die Umsetzung von *rac*-Flezelastin (1)

### 6.3 Ergebnisse der Inkubationen mit Leberhomogenaten verschiedener Spezies

#### 6.3.1 Vergleich zwischen induzierten und nichtinduzierten Leberzellfraktionen der Ratte

Es sollte überprüft werden, welche Leberfraktion, Cytosol, Supernatant oder Mikrosomen, am besten für Metabolismusstudien eignet war. Gleichzeitig wurde der Einfluß der Induktion mit Phenobarbital betrachtet.

Es wurden je 3 Inkubationsansätze gemäß Kap. 6.2.1 hergestellt. Pro Ansatz wurden 250 µl der induzierten und nicht induzierten Rattenleberpräparationen der Charge 2/94 und 50,02 µg Flezelastin eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2 h.

Leberpräparation	1 [µg]	SD	2 [µg]	SD	3 [µg]	SD
C	43,114	0,333	< 2,5	-	< 0,5	-
S	36,587	1,024	9,161	0,306	< 0,5	-
M	22,879	0,128	10,648	0,072	1,23	0,065

Tab. 41: Inkubation von *rac*-Flezelastin (1) mit nicht induzierten Leberpräparationen der Ratte; C = Cytosol, S = Supernatant, M = Mikrosomen

Leberpräparation	1 [µg]	SD	2 [µg]	SD	3 [µg]	SD
C	31,216	1,123	0,544	0,079	< 0,5	-
S	15,126	2,705	12,087	2,430	1,468	0,085
M	7,382	1,867	13,021	1,734	2,534	0,229

Tab. 42: Inkubation von *rac*-Flezelastin (1) mit induzierten Leberpräparationen der Ratte; C = Cytosol, S = Supernatant, M = Mikrosomen

### 6.3.2 Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Zur Untersuchung der Enantioselektivität des Metabolismus von Flezelastin (**1**) in Rattenlebermikrosomen wurden jeweils 3 Inkubationsansätze mit *rac*-, (+)- und (-)-**1** nach Kap. 6.2.1.1 hergestellt.

Bedingungen: *rac*-, (+)-, (-)-**1**: 50 µg bzw. 0,11 µmol  
 Mikrosomen: 250 µl (= 1,285 mg Protein), Charge 5/93  
 Inkubationsdauer: 2 h

Substrat	unmetabol. 1 [µg]	SD	2 [µg]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	5,404	1,072	11,884	1,092
(+)- <b>1</b>	2,493	0,392	11,874	0,485
(-)- <b>1</b>	8,083	0,211	12,830	0,393

Substrat	3 [µg]	SD	4/5 [AVG Area/6]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	1,465	0,154	1,986	0,029
(+)- <b>1</b>	0,674	0,061	2,491	0,067
(-)- <b>1</b>	2,656	0,088	1,298	0,114

Tab. 43: Inkubation des Razemates und der Enantiomere von **1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Des weiteren wurden **Langzeitinkubationen** über 24 h durchgeführt. Als Inkubationsmedium diente hierbei das NADPH-regenerierende System (s. Kap. 6.2.2). Die Anzahl der verschiedenen Ansätze war jeweils 4.

Bedingungen: *rac*-, (+)-, (-)-**1**: 50 µg bzw. 0,11 µmol  
 Mikrosomen: 200 µl (= 1,498 mg Protein), Charge 2/94

Unter diesen Inkubationsbedingungen trat bei der Analyse der Proben im Chromatogramm ein neuer Metabolit (**8**) auf, der nur vom Razemat und dem (+)-Enantiomer aber nicht vom (-)-Enantiomer gebildet wurde.

Substrat	unmetabol. <b>1</b> [µg]	SD	<b>2</b> [µg]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	5,317	0,481	18,465	1,526
(+)- <b>1</b>	4,258	0,553	24,157	0,755
(-)- <b>1</b>	7,620	0,835	18,783	2,809

Substrat	<b>3</b> [µg]	SD	<b>4/5</b> [AVG Area/7]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	5,287	0,481	0,683	0,079
(+)- <b>1</b>	5,200	1,534	1,111	0,085
(-)- <b>1</b>	5,610	0,799	0,324	0,067

Substrat	<b>8</b> [AVG Area/7]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	0,0694	0,0072
(+)- <b>1</b>	0,0676	0,0036
(-)- <b>1</b>	-	-

Tab. 44: Langzeitinkubation (24 h) des Razemates und der Enantiomere von **1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen

### 6.3.3 Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen

Flezelastin (**1**) und seine Enantiomere wurden für 24 h mit dem NADPH-regenerierenden System und Humanlebermikrosomen in Analogie zu den Ansätzen mit Rattenlebermikrosomen (s. Kap. 6.3.2) inkubiert. Es wurden jeweils 4 Proben angesetzt. Die Bildung des bei den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen aufgetretenen neuen Metaboliten (**8**) konnte hier nicht beobachtet werden.

Bedingungen: *rac*-, (+)-, (-)-**1**: 50 µg bzw. 0,11 µmol  
 Mikrosomen: 200 µl (= 0,20 mg Protein), Charge 10/93

Substrat	unmetabol. <b>1</b> [µg]	SD	<b>2</b> [µg]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	13,658	0,201	19,848	0,591
(+)- <b>1</b>	13,982	0,446	16,773	0,566
(-)- <b>1</b>	12,661	0,204	20,565	0,220

Substrat	<b>3</b> [µg]	SD	<b>4/5</b> [AVG Area/7]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	13,573	0,523	0,1605	0,0152
(+)- <b>1</b>	16,191	0,511	0,1297	0,0029
(-)- <b>1</b>	9,613	0,188	0,2338	0,0284

Tab. 45: Inkubation des Razemates und der Enantiomere von **1** mit Humanlebermikrosomen

### 6.3.4 Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen

Es wurden je 4 Ansätze mit nichtinduzierten Rinderlebermikrosomen für 24 h nach Kap. 6.2.2 inkubiert.

Bedingungen: *rac*-, (+)-, (-)-**1**: 50 µg bzw. 0,11 µmol  
 Mikrosomen: 200 µl (= 1,924 mg Protein), Charge 9/94

Substrat	unmetabol. <b>1</b> [µg]	SD	<b>2</b> [µg]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	10,120	0,540	7,423	0,516
(+)- <b>1</b>	7,483	0,467	8,525	0,316
(-)- <b>1</b>	11,273	0,921	4,047	0,428

Substrat	<b>3</b> [µg]	SD	<b>4/5</b> [AVG Area/7]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	7,960	0,735	1,215	0,148
(+)- <b>1</b>	3,243	0,479	1,388	0,040
(-)- <b>1</b>	11,273	0,922	0,841	0,072

Tab. 46: Inkubation des Razemates und der Enantiomere von **1** mit Rinderlebermikrosomen



### 6.3.5 Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen

Für die Inkubationen mit nichtinduzierten Schweinelebermikrosomen wurden je 4 Ansätze gemäß Kap. 6.2.2 durchgeführt.

Bedingungen: *rac*-, (+)-, (-)-**1**: 50 µg bzw. 0,11 µmol  
 Mikrosomen: 200 µl (= 1,540 mg Protein), Charge 9/94

Substrat	unmetabol. <b>1</b> [µg]	SD	<b>3</b> [µg]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	3,717	0,486	8,713	0,209
(+)- <b>1</b>	3,847	0,282	6,517	0,104
(-)- <b>1</b>	2,853	0,595	11,297	0,411

Substrat	<b>4/5</b> [AVG Area/7]	SD
<i>rac</i> - <b>1</b>	1,845	0,292
(+)- <b>1</b>	2,372	0,114
(-)- <b>1</b>	1,557	0,185

Tab. 47: Inkubation des Razemates und der Enantiomere von **1** mit Schweinelebermikrosomen

## 7 Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Metaboliten

### 7.1 Synthese des Flezelastin-N-Oxids

Für vergleichende chromatographische und massenspektrometrische Messungen wurde das N-Oxid des Flezelastins (**5**) hergestellt.

10 mg Flezelastin wurden in 2 ml Methanol gelöst, das zuvor mit Ammoniak 25% alkalisiert wurde (pH 8). 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% wurden langsam zugetropft. Danach wurde der Reaktionsansatz im Wasserbad bei 60°C 6 h unter Rückfluß erhitzt. Nach der Umsetzung erfolgte die Reduktion des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Zugabe von MnO<sub>2</sub>, bis der Test mit Jod-Stärke-Papier nicht mehr ansprach. Nach Abfiltrieren des Ansatzes wurde dieser mit dem 4fachen Volumen H<sub>2</sub>O (= 48 ml) verdünnt. Aufgrund des Polaritäts- und Löslichkeitsunterschieds zwischen dem N-Oxid und Flezelastin war eine Reinigung des N-Oxids von nicht umgesetztem Ausgangsprodukt durch Waschen mit einem unpolaren Lösungsmittel möglich. Es wurde 2mal mit je 35 ml Cyclohexan ausgeschüttelt und die organische Phase jeweils verworfen. Die wäßrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, bis ein öliges Rückstand übrig blieb. Dieser kristallisierte bei Aufbewahrung in der Kälte.

Die Umsetzung wurde mittels DC an einer Kieselgelphase (60 F<sub>254</sub>) kontrolliert.

Fließmittel:	Ethylacetat/Isopropanol/Ammoniak 25%	60/30/3
Rf-Werte:	Flezelastin:	0,90
	N-Oxid:	0,51

Das N-Oxid (**5**) zeigte in der HPLC-Analyse das gleiche chromatographische Verhalten wie der Metabolit **4/5**, der durch Mikrosomeninkubationen gebildet wurde. Zu den Ergebnissen der MS-Messungen siehe Kap. 7.5.2.

## 7.2 Inkubation von D-21440 mit Rattenlebermikrosomen

Zur Strukturaufklärung des Metaboliten, der in Inkubationsansätzen von *rac*- und (+)-Flezelastin mit Rattenlebermikrosomen zu finden war (vgl. Kap. 6.3.2), wurden Inkubationen mit D-21440 als Substrat durchgeführt.

Bedingungen:        50 µg D-21440 bzw. 0,14 µmol  
                          0,5 ml NADPH-regenerierendes System  
                          200 µl Mikrosomen (= 1.285 mg Protein), Charge 2/94  
Inkubationszeit:    24 h

Die chromatographische Auswertung zeigte, daß neben einem Hauptmetaboliten, der in der Retentionszeit mit dem gesuchten übereinstimmte, in geringem Maße noch zwei weitere Produkte gebildet wurden, die kurz vor und kurz nach dem Hauptmetaboliten eluierten. Die dazugehörigen MS-Untersuchungen sind in Kap. 7.5.2 beschrieben.

## 7.3 Umsetzungen mit einem Cytochrom P450 Modellsystem zur biomimetischen Monooxygenierung

D-21440 (**2**) wurde mit dem Cytochrom P450 Modellsystem umgesetzt, um zu klären, ob es sich bei dem unbekanntem Metaboliten **8** um ein hydroxyliertes Produkt von **2** handelte. Von der Stammlösung in Methanol wurden Aliquots in 10 ml Normalschliffgläser pipettiert und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt.

Das System bestand pro Ansatz aus:

ca. 50 µg Substrat (D-21440)	
Ascorbinsäure	142 µmol, 25 mg
FeSO <sub>4</sub>	15 µmol, 10 mg
EDTA	80 µmol, 30 mg

Die Komponenten wurden in 2,8 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 gelöst.

Zusätzlich wurde zu den Ansätzen 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% hinzugefügt.

Nach Zugabe von Magnetkernen wurden die Proben unter ständigem Rühren für 3 h im Wasserbad bei 37°C belassen. Vor der 2maligen Extraktion mit je 4 ml Cyclohexan/Ethylacetat (4:1) wurden die Ansätze zur Alkalisierung mit je 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Die organische Phase wurde jeweils nach Zentrifugation abgenommen und unter Stickstoffbegasung eingeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 100 µl Methanol aufgenommen und 20 µl dieser Lösung in das HPLC-System (s. Kap. 5.1.2) injiziert. Im Chromatogramm des inkubierten D-21440 konnten zwei Produkte erkannt werden, von denen nur eines in zur Fraktionierung ausreichenden Mengen anfiel. Die Daten zu den jeweiligen MS-Messungen finden sich in Kap. 7.5.2.

## 7.4 DAD-Spektren

Um weitere Hinweise auf eine aromatische Hydroxylierung des Metaboliten **8** zu erhalten, der in Inkubationsansätzen von *rac*- und (+)-Flezelastin sowie von D-21440 entstand, sollten UV-Spektren dieser Substanz aufgenommen werden. Hierzu wurde der Fluoreszenzdetektor des HPLC-Systems durch einen Dioden-Array-Detektor ersetzt. Es wurden Inkubationen von jeweils 50 µg *rac*-Flezelastin und D-21440 entsprechend Kap. 6.2.2 durchgeführt. Der verbleibende Rückstand wurde in 100 µl Methanol aufgenommen und 20 µl gemäß Kap. 5.1.2 chromatographiert.

## 7.5 Massenspektrometrie

### 7.5.1 Identität der bekannten Metaboliten

Mit dem Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sollte bestätigt werden, daß die als Vergleichssubstanzen vorliegenden Metaboliten D-21440 (**2**) und D-22258 (**3**) tatsächlich in den Inkubationsansätzen gebildet wurden. Es wurden Lösungen der Substanzen - ca. 50 µg/ml - in Methanol hergestellt, die über eine Spritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 5 µl/min injiziert wurden. Zum Vergleich wurde eine Inkubationsprobe von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen in 30 µl Methanol gelöst und ebenfalls aufgegeben.

Elektrosprayionisation (20 eV):

Vergleichssubstanzen:

Flezelastin ( <b>1</b> ) m/z (%)	456 (25) [M] <sup>+</sup> , 364 (1) [C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> FN <sub>3</sub> O] <sup>+</sup> , 293 (2) [C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 255 (5) [C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 202 (100) [C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N] <sup>+</sup>
D-21440 ( <b>2</b> ) m/z (%)	352 (69) [M] <sup>+</sup> , 293 (5) [C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 255 (100) [C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
D-22258 ( <b>3</b> ) m/z (%)	488 (4) [M] <sup>+</sup> , 367 (100) [C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 255 (21) [C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>

Inkubationsansatz:

Flezelastin (1) m/z (%)	456 (26) $[M]^+$ , 293 (2) $[C_{18}H_{14}FN_2O]^+$ , 255 (6) $[C_{15}H_{12}FN_2O]^+$ , 202 (100) $[C_{14}H_{20}N]^+$
D-21440 (2) m/z (%)	352 (68) $[M]^+$ , 293 (6) $[C_{18}H_{14}FN_2O]^+$ , 255 (100) $[C_{15}H_{12}FN_2O]^+$
D-22258 (3) m/z (%)	488 (47) $[M]^+$ , 367 (100) $[C_{21}H_{20}FN_2O_3]^+$ , 255 (34) $[C_{15}H_{12}FN_2O]^+$

### 7.5.2 Massenspektrometrische Untersuchungen der unbekanntem Metaboliten

Zur Aufklärung der Struktur des Metaboliten **4/5** wurden wie unter Kap. 7.5.1 beschrieben MS/MS-Messungen durchgeführt. Die Spektren des synthetisierten Flezelastin-N-Oxids wurden mit denen der inkubierten Probe verglichen.

Elektrosprayionisation (20 eV):

N-Oxid (5) m/z (%)	472 (40) $[M]^+$ , 454 (4) $[C_{29}H_{29}FN_3O]^+$ , 364 (28) $[C_{22}H_{23}FN_3O]^+$ , 293 (8) $[C_{18}H_{14}FN_2O]^+$ , 255 (34) $[C_{15}H_{12}FN_2O]^+$ , 218 (100) $[C_{14}H_{20}NO]^+$ , 200 (40) $[C_{14}H_{18}N]^+$ , 105 (12) $[C_8H_9]^+$
inkub. Probe m/z (%)	472 (57) $[M]^+$ , 454 (42) $[C_{29}H_{29}FN_3O]^+$ , 364 (2) $[C_{22}H_{23}FN_3O]^+$ , 293 (3) $[C_{18}H_{14}FN_2O]^+$ , 255 (13) $[C_{15}H_{12}FN_2O]^+$ , 218 (76) $[C_{14}H_{20}NO]^+$ , 200 (90) $[C_{14}H_{18}N]^+$ , 105 (3) $[C_8H_9]^+$

Zur Strukturaufklärung des Metaboliten **8**, der während Inkubationen von *rac*- und (+)-**1** sowie von **2** entstand, wurden LC-MS-Messungen mit Elektrosprayionisation herangezogen. Es wurden sowohl gesamte Inkubationsansätze als auch fraktionierte Proben der Umsetzungen von **2** mit Mikrosomen und mit dem Oxidationssystem analysiert. Die Fraktionierung erfolgte mittels HPLC (s. Kap. 5.1.2). Das Fließmittel wurde unter Stickstoffbegasung entfernt.

Bedingungen:

Säule: LiChrospher<sup>®</sup> Si-60, 125 x 4mm, 5 µm  
Fließmittel: Methanol/HClO<sub>4</sub> 100/0,003  
Flow: 0,4 ml/min

Im Totalionenstrom zeigte die gesuchte Substanz eine Retentionszeit von ca. 11 min, während **2** nach ca. 12 min eluierte.

Alle aufgenommenen Spektren wiesen einen Molekularpeak bei *m/z* 368 auf. Dies deutete auf einen hydroxylierten Metaboliten von **2** hin. In einigen inkubierten Ansätzen von **2** waren im Totalionenstrom 3 Substanzen der Masse 368 zu erkennen.

Metabolit **8** *m/z* (%)      368 (100) [C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 313 (8) [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>,  
271 (30) [C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>



## 8 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin und D-21440 nach Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies

### 8.1 HPLC-Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse an Chiralpak AD<sup>®</sup>

#### 8.1.1 Validierung der Methode

Für die Bestimmung der Verhältnisse der Enantiomere des Flezelastins (**1**) wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

(+)- <b>1</b> :	1400 µg/10 ml
(-)- <b>1</b> :	1400 µg/10 ml

Von den Stammlösungen wurden Aliquots in ein 10 ml Normalschliffglas pipettiert, um, ausgehend von 30 und 50 µg Gesamtmenge an **1**, 9:1- bis 1:9-Gemische herzustellen. Diese wurden unter Stickstoffstrom eingengt, in 200 µl mobiler Phase aufgenommen und davon 20 µl chromatographiert.

Säule:	Chiralpak AD <sup>®</sup> , 250 x 4,6 mm, 10 µm	
Vorsäule:	Chiralpak AD <sup>®</sup> , 30 x 4,6 mm, 10 µm	
Detektion:	UV, 292 nm	
Flow:	1,0 ml/min	
Mobile Phase:	n-Hexan/Isopropanol/DEA	88/12/0,5

Pro Konzentration und Meßpunkt wurden jeweils 3 Proben analysiert, so daß sich die statistischen Angaben auf n = 6 beziehen.



Enantiomerenzusammensetzung Soll [%]		Enantiomerenzusammensetzung gefunden [%]		SD	SD <sub>rel</sub> [%]
(-)-1	(+)-1	(-)-1	(+)-1		
10	90	9,20	90,80	0,677	7,36
20	80	19,18	80,82	0,600	3,13
30	70	29,23	70,77	0,684	2,34
40	60	40,06	59,94	0,369	0,92
50	50	50,35	49,65	1,901	3,78
60	40	59,77	40,23	0,651	1,09
70	30	70,44	29,56	1,030	1,46
80	20	81,00	19,00	1,057	1,30
90	10	90,94	9,06	0,781	0,86

Tab. 48: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **1** vor Extraktion

Parameter der linearen Regression:

$$(-)\text{-1: } f(x) = 1,024524 x - 1,197625 \quad r = 0,998614$$

$$(+)\text{-1: } f(x) = -1,024524 x + 101,197625 \quad r = 0,998614$$

Für die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses nach Extraktion wurden, wie oben beschrieben, aus den Stammlösungen 3 verschiedene Gemische mit wiederum 2 verschiedenen Gesamtmengen an **1** (30 und 50 µg) hergestellt. Die Ansätze mit Rattenlebermikrosomen entsprachen denen der Kalibration der achiralen Analytik gemäß Kap. 5.4.2.2. Der erhaltene Rückstand wurde in 200 µl mobiler Phase gelöst und 20 µl dieser Lösung chromatographiert. Entsprechend der Meßreihe vor Extraktion war n = 6.

Enantiomerenzusammensetzung Soll [%]		Enantiomerenzusammensetzung gefunden [%]		SD	SD <sub>rel</sub> [%]
(-)-1	(+)-1	(-)-1	(+)-1		
20	80	20,20	79,80	1,582	7,83
30	70	30,80	69,20	1,279	4,15
70	30	69,18	30,82	1,135	1,64

Tab. 49: Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von **1** nach Extraktion aus Rattenlebermikrosomen

Parameter der linearen Regression:

$$(-)\text{-1: } f(x) = 0,974539 x + 1,051064 \quad r = 0,995830$$

$$(+)\text{-1: } f(x) = -0,974539 x + 98,948936 \quad r = 0,995830$$

Von D-21440 (**2**) konnten keine entsprechenden Kalibriergeraden aufgestellt werden, da es nur als Razemat vorlag. Betrachtet wurde stattdessen die Konstanz des razemischen 50:50-Verhältnisses nach Extraktion aus Rattenlebermikrosomen. Es wurden je 3 Ansätze mit 30, 50 und 70 µg Razemat, wie oben beschrieben, hergestellt und analysiert.

D-21440 [µg]	Enantiomerenzusammensetzung [%]		SD <sub>rel</sub> [%]
	1. Enantiomer	2. Enantiomer	
30	46,48	53,52	4,53
50	47,08	52,92	3,69
70	46,55	53,45	3,26

Tab. 50: Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von **2** nach Extraktion aus Rattenlebermikrosomen

### 8.1.2 Inkubation von Flezelastin mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Die Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) und D-21440 (**2**) wurden nach Inkubation mit Phenobarbital-induzierten Rattenlebermikrosomen (Charge 2/94) bestimmt. Die Inkubationsdauer variierte von 6 bis 48 h. Die Inkubationen wurden analog Kap. 6.2.2 durchgeführt.

Als Substrat diente 50 µg *rac*-Flezelastin. Pro Inkubationsdauer wurden 3-4 Ansätze bearbeitet.

Inkubationsdauer [h]	(-)- <b>1</b> [%]	(+)- <b>1</b> [%]	(-)- <b>1</b> /(+)- <b>1</b>	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	46,89	53,11	0,8829	1,922	4,10	4
12	47,99	52,01	0,9227	1,535	3,20	4
24	47,54	52,46	0,9062	0,190	0,40	4
48	46,47	53,53	0,8681	0,544	1,17	4

Tab. 51: Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit induzierten Rattenlebermikrosomen

Inkubationsdauer [h]	2 aus (-)-1 [%]	2 aus (+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	44,69	55,31	0,8080	0,446	1,00	3
12	45,49	54,51	0,8345	2,095	4,61	3
24	47,32	52,68	0,8983	1,091	2,31	4
48	46,56	53,44	0,8713	1,211	2,60	4

Tab. 52: Enantiomerenverhältnisse von D-21440 (**2**) nach Inkubation von **1** mit induzierten Rattenlebermikrosomen

### 8.1.3 Inkubation von Flezelastin mit Humanlebermikrosomen

Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) und D-21440 (**2**) beim Menschen konnten als in vitro Modell Inkubationen mit Humanlebermikrosomen herangezogen werden. Inkubiert wurden je 50 µg **1** zwischen 6 und 48 h gemäß der in Kap. 6.2.2 beschriebenen Methode. Die Zahl der Ansätze belief sich auf 3 bis 6.

Inkubationsdauer [h]	(-)-1 [%]	(+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	47,87	52,13	0,9183	0,837	1,75	4
12	47,62	52,38	0,9091	0,595	1,25	5
24	46,49	53,51	0,8688	0,584	1,26	6
48	48,11	51,89	0,9272	0,161	0,33	4

Tab. 53: Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit Humanlebermikrosomen

Inkubationsdauer [h]	2 aus (-)-1 [%]	2 aus (+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	47,66	52,34	0,9106	1,900	3,99	4
12	47,60	52,40	0,9084	0,835	1,75	3
24	47,20	52,80	0,8939	2,154	4,56	6
48	48,43	51,57	0,9391	1,241	2,56	4

Tab. 54: Enantiomerenverhältnisse von D-21440 (**2**) nach Inkubation von **1** mit Humanlebermikrosomen

#### 8.1.4 Inkubation von Flezelastin mit Rinderlebermikrosomen

Zur Untersuchung des enantioselektiven Metabolismus des Flezelastins (**1**) in verschiedenen Spezies wurden auch Inkubationen mit Rinderlebermikrosomen (Charge 9/94) durchgeführt. Die Inkubationszeiten wurden zwischen 6 und 48 h gewählt. 3 bis 5 Ansätze mit je 50 µg **1** wurden gemäß Kap. 6.2.2 bearbeitet.

Inkubationsdauer [h]	(-)-1 [%]	(+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	43,79	56,21	0,7790	0,988	2,26	4
12	48,33	51,67	0,9354	0,794	1,64	4
24	48,41	51,59	0,9384	0,408	0,84	5
48	49,15	50,85	0,9666	0,544	1,11	4

Tab. 55: Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit Rinderlebermikrosomen

Inkubationsdauer [h]	2 aus (-)-1 [%]	2 aus (+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	17,64	82,36	0,2142	0,863	4,89	4
12	20,16	79,84	0,2525	1,721	8,54	3
24	20,57	79,43	0,2590	1,187	5,77	4
48	14,09	85,91	0,1640	0,431	3,06	4

Tab. 56: Enantiomerenverhältnisse von D-21440 (**2**) nach Inkubation von **1** mit Rinderlebermikrosomen

### 8.1.5 Inkubation von Flezelastin mit Schweinelebermikrosomen

Des weiteren wurden die Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit Schweinelebermikrosomen (Charge 10/94) bestimmt. 4 bis 6 Inkubationsansätze mit 50 µg Substrat wurden entsprechend Kap. 6.2.2 durchgeführt. Die Inkubationsdauer variierte von 6 bis 48 h. Da **1** bei den Inkubationen nicht zu D-21440 (**2**) umgesetzt wurde, folgen an dieser Stelle nur die Ergebnisse der chiralen Vermessung von nicht umgesetztem **1**.

Inkubationsdauer [h]	(-)-1 [%]	(+)-1 [%]	(-)-1/(+)-1	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
6	37,34	62,66	0,5960	0,767	2,05	4
12	37,57	62,43	0,6018	1,695	4,51	4
24	38,40	61,60	0,6234	0,685	1,78	6
48	48,15	50,86	0,9467	0,682	1,42	4

Tab. 57: Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit Schweinelebermikrosomen

### 8.1.6 Überprüfung der Konfigurationsstabilität unter den Inkubationsbedingungen

Die Konstanz des Enantiomerenverhältnisses unter Inkubationsbedingungen wurde durch Kontrollansätze ohne Protein- oder Enzymquelle überprüft. Die folgende Tabelle zeigt die Daten einer 24 h-Inkubation von 50 µg Flezelastin (**1**) mit Rattenlebermikrosomen ohne Enzymzusatz.

Inkubationsdauer [h]	(-)- <b>1</b> [%]	(+)- <b>1</b> [%]	(-)- <b>1</b> /(+)- <b>1</b>	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
24	48,73	51,27	0,9505	0,689	1,41	5

Tab. 58: Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von **1** nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen ohne Enzymzusatz

Die Konfigurationsstabilität nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen wurde bereits bei der Bestimmung der Elutionsreihenfolge der Enantiomere von D-21440 in Kap. 3.2.2 bestätigt. Nach Inkubation der reinen Enantiomere konnten in der HPLC-Analyse nur ihre jeweiligen Peaks detektiert werden.

Zusätzlich wurden 24 h-Inkubationen gemäß Kap. 6.2.2 von (+)-**1** und (-)-**1** mit Rinderlebermikrosomen durchgeführt, da hier gleichzeitig die stereoselektive Bildung von D-21440 (**2**) betrachtet werden sollte. Die Auswertung der Chromatogramme zeigte, daß der jeweils andere Antipode von **1** nicht auftrat. Weiterhin konnte bestätigt werden, daß bei der Inkubation von (-)-**1** weniger **2** entstand als bei der Inkubation von (+)-**1**.

## 8.2 Elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse

### 8.2.1 Wahl der Methode

Die elektropherographische Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse basierte auf der in Kap. 4.1 erarbeiteten Methode. Die chirale Erkennung wurde durch Zusatz von  $\beta$ -CD zum Laufpuffer erzielt.

Die Inkubationen von 50  $\mu\text{g}$  *rac*-Flezelastin mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies erfolgten nach Kap. 6.2.2. Der zur Trockne eingedampfte Rückstand wurde in 10  $\mu\text{l}$  Methanol und 40  $\mu\text{l}$  5 mM Phosphatpuffer pH 3,75 aufgenommen und ein Aliquot auf die Trennkapillare gegeben.

Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse dienten zwei Kapillarelektrophoresegeräte unter folgenden Bedingungen:

System:	Grom
Kapillare:	fused silica 59 cm L, 42 cm EL, 50 $\mu\text{m}$ ID
Effektive Spannung:	339 V/cm
Probenaufgabe:	10 s hydrodynamisch, 10 cm
Detektion:	UV, 210 nm

System:	Beckmann Kapillarelektrophorese System P/ACE 5510
Kapillare:	fused silica 47 cm L, 40 cm EL, 50 $\mu\text{m}$ ID
Effektive Spannung:	372 V/cm
Probenaufgabe:	5 s Stickstoffüberdruck 0,5 psi
Detektion:	UV, 210 nm



Elektrodenpuffer: 100 mM Phosphatpuffer pH 3,75  
 Laufpuffer: 50 mM Phosphatpuffer pH 3,75  
 16,3 mM  $\beta$ -CD

### 8.2.2 Inkubationen mit Leberzellfraktionen verschiedener Spezies

Für den Vergleich der CE-Methode mit der HPLC-Analytik auf der Chiralpak AD<sup>®</sup> wurden 24 h-Inkubationen von 50  $\mu$ g *rac*-Flezelastin (**1**) analog Kap. 6.2.2 durchgeführt. Als Proteinquelle kamen Ratten-, Human-, Rinder- sowie Schweinelebermikrosomen zum Einsatz.

Spezies	(-)- <b>1</b> [%]	(+)- <b>1</b> [%]	(-)- <b>1</b> /(+)- <b>1</b>	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
Ratte	49,17	50,83	0,9673	2,652	5,39	4
Mensch	49,48	50,52	0,9794	1,060	2,14	5
Rind	50,54	49,46	1,0218	1,414	2,80	6
Schwein	39,16	60,84	0,6437	0,792	2,02	5

Tab. 59: Enantiomerenverhältnisse von Flezelastin (**1**) nach Inkubation mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

Spezies	<b>2 aus</b> (-)- <b>1</b> [%]	<b>2 aus</b> (+)- <b>1</b> [%]	(-)- <b>1</b> /(+)- <b>1</b>	SD	SD <sub>rel</sub> [%]	n
Ratte	54,39	45,61	1,1925	0,872	1,60	4
Mensch	51,73	48,27	1,0717	0,755	1,46	5
Rind	28,55	71,45	0,3996	1,956	6,85	4

Tab. 60: Enantiomerenverhältnisse von D-21440 (**2**) nach Inkubation von **1** mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies

## 9 In-vivo-Untersuchungen zum Metabolismus von $^{14}\text{C}$ -markiertem Flezelastin in Ratten

### 9.1 Durchführung der Studie

Die Studie wurde im Februar 1995 von der Firma ASTA Medica, Frankfurt am Main, durchgeführt. Sechs männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 400 und 470 g erhielten über drei Tage oral eine Dosis von 1 mg/kg ( $\approx 40 \mu\text{Ci/kg}$ )  $^{14}\text{C}$ -Flezelastin. Urin und Faeces wurden über die unten angegebenen Zeitintervalle gesammelt. Plasma wurde nach der tierschutzgerechten Tötung gewonnen.

Folgende Lösungen wurden hergestellt:

Stammlösung aktiv:	$^{14}\text{C}$ -Flezelastin (spezifische Aktivität: 84 $\mu\text{Ci/mg}$ ) 10 mg/ml DMAA
Stammlösung inaktiv:	Flezelastin 10 mg/ml DMAA
Applikationslösung:	160 $\mu\text{l}$ Stammlösung aktiv 160 $\mu\text{l}$ Stammlösung inaktiv 2880 $\mu\text{l}$ DMAA 64 $\mu\text{l}$ Essigsäure 96% 28,736 ml Leitungswasser
Applikationsvolumen:	10 ml/kg Körpergewicht
Applikationszeitpunkte:	0, 24, 48 h
Urinsammelintervalle:	0-6, 6-24, 24-48, 48-72 h
Faecessammelintervalle:	0-24, 24-48, 48-72 h

## 9.2 Auswertung der Studie

Die folgenden Tabellen enthalten Angaben über den prozentualen Anteil an Radioaktivität in den verschiedenen Körperflüssigkeiten bezogen auf die jeweils letzte Gabe an  $^{14}\text{C}$ -Flezelastin. Von den Proben wurde je ein Aliquot mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und mit einem  $\beta$ -Counter dreimal vermessen. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte der Ergebnisse von sechs Tieren.

	<b>Urinsammelintervalle</b>			
	<b>0-6 h</b>	<b>6-24 h</b>	<b>24-48 h</b>	<b>48-72 h</b>
<b>Anteil der letzten Dosis [%]</b>	2,21	2,88	6,19	10,53

Tab. 61: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen der Urinsammelintervalle

	<b>Faecessammelintervalle</b>		
	<b>0-24 h</b>	<b>24-48 h</b>	<b>48-72 h</b>
<b>Anteil der letzten Dosis [%]</b>	69,15	76,82	79,42

Tab. 62: Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen der Faecessammelintervalle

	<b>Plasma 0-72 h</b>
<b>Anteil der letzten Dosis [%]</b>	0,115

Tab. 63: Ergebnis der Radioaktivitätsbestimmung des Plasmas

Die Aufarbeitung und Analytik der Proben erfolgte während eines Aufenthaltes im März 1995 bei der Firma ASTA Medica, Frankfurt am Main.

Zur Bestimmung der prozentualen Verteilung der ausgeschiedenen Radioaktivität auf die einzelnen Metaboliten wurden die Faecesproben aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. Die Analytik erfolgte gemäß Kap. 5.1.2. Abweichend hiervon wurde mit einem Radiomonitor detektiert.

Die Probenaufarbeitung wurde nach folgender, bei ASTA Medica entwickelter Methode durchgeführt:

Faecesaliquot, dessen Radioaktivität ca. 0,5  $\mu\text{Ci}$  entsprach

+ 200  $\mu\text{l}$  1 N NaOH

+ 5 ml Diethylether

10 min schütteln

5 min zentrifugieren bei 3500 rpm

150  $\mu\text{l}$  0,01 M HCl in ein 10 ml Normalschliffglas vorlegen

3 ml der Etherphase überführen

Faeces nochmals extrahieren mit 5 ml n-Hexan/Octanol 99/1

10 min schütteln, 5 min zentrifugieren

3 ml der organischen Phase abnehmen

Faeces nochmals extrahieren mit 3 ml n-Hexan/Octanol 99/1

10 min schütteln, 5 min zentrifugieren

3 ml der organischen Phase abnehmen

vereinigte organische Phasen wurden unter Stickstoffstrom zur Trockne eingeeengt

+ 100  $\mu\text{l}$  mobile Phase

40  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen

Da die aktive Reinsubstanz von Beginn der Studie an zwei radiolytische Zersetzungsprodukte aufwies, können die folgenden Ergebnisse nur einen orientierenden Charakter haben. Die chromatographisch bestimmte Reinheit des  $^{14}\text{C}$ -Flezelastins betrug 63%. Die Tabellen zeigen die prozentualen Anteile der Metaboliten an der Gesamtaktivität der Probe.

Sammelintervall [h]	unmetabol. 1 [%]	2 [%]	3 [%]	4/5 [%]	n
0-24	21,91	5,43	13,40	29,56	11
24-48	24,77	7,27	n.b.	n.b.	7
48-72	23,95	6,30	18,89	n.b.	5

Tab. 64: Prozentualer Anteil von **1** und seinen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität in Faecesproben der Ratte

Ebenfalls konnte vor allem bei den späteren Sammelintervallen ein Metabolit beobachtet werden, der in seinem chromatographischen Verhalten dem Metaboliten **8** entsprach, der auch in Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen gebildet wurde (s. Kap. 6.3.2).

Sammelintervall [h]	8 [%]	n
0-24	1,71	5
24-48	2,26	4
48-72	2,01	4

Tab. 65: Prozentualer Anteil von **8** an der Gesamtradioaktivität in Faecesproben der Ratte

Für den in vitro/in vivo Vergleich wurden die prozentualen Anteile von Flezelastin (1) und seinen Metaboliten an der Gesamtfläche der Chromatogramme von 24 h-Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen (s. Kap. 6.3.2) herangezogen.

<b>unmetabol.</b> <b>1 [%]</b>	<b>2</b> <b>[%]</b>	<b>3</b> <b>[%]</b>	<b>4/5</b> <b>[%]</b>	<b>8</b>	<b>n</b>
35,29	8,56	5,18	46,84	4,14	4

Tab. 66: Prozentualer Anteil von Flezelastin (1) und seinen Metaboliten an der Gesamtfläche von Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen

**Literaturverzeichnis**

- 1 R. Thesen, *Pharm. Ztg.* **1992**, *49*, 46-48.
- 2 J. Engel, I. Fleischhauer, *Pharm. Ztg.* **1993**, *40*, 9-20.
- 3 I. Fleischhauer, B. Kutscher, J. Engel, U. Achterrath-Tuckermann, H. O. Borbe, J. Schmidt, I. Szelenyi, G. Camuglia, *Chirality* **1993**, *5*, 366-369.
- 4 D. McTavish, E. M. Sorkin, *Drugs* **1989**, *38* (5), 778-800.
- 5 J. Engel, B. Kutscher, I. Fleischhauer, S. Szelenyi, P. Metzenauer, U. Werner (ASTA Medica AG). EP 0590551 A2. **1994**.
- 6 W. Meindl, *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 493-497.
- 7 A. Ramu, N. Ramu, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 423-430.
- 8 J. Caldwell, *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 39-48.
- 9 R. Crossley, *Tetrahedron* **1992**, *48* (38), 8155-8178.
- 10 E. J. Ariens, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 68-75.
- 11 Physikochemischer Substanzpaß von Flezelastinhydrochlorid **1994**, ASTA Medica AG, Frankfurt am Main.
- 12 V. E. Adsumalli, K. K. Wong, N. Kucharczyk, R. D. Sofia, *Drug Metab. Disp.* **1992**, *20* (4), 530-535.
- 13 K. Tatsumi, T. Ou, H. Yamada, H. Yoshimura, *Japan. J. Pharmacol.* **1980**, *30*, 37-48.
- 14 J. T. Yang, K. K. Wong, N. Kucharczyk, R. D. Sofia, *Drug Metab. Disp.* **1992**, *20* (4), 536-540.
- 15 M. Elgert, *Diplomarbeit*, Univ. Frankfurt am Main, **1993**.
- 16 Persönliche Mitteilung der ASTA Medica AG, Frankfurt am Main.
- 17 K. Brandt, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 1-14.
- 18 J. Hermansson, *J. Chromatogr.* **1983**, *269*, 71-80.
- 19 M. Lienne, M. Caude, R. Rosset, A. Tambuté, *J. Chromatogr.* **1989**, *472*, 265-270.



- 20 S. Allenmark, B. Bomgren, H. Borén, *J. Chromatogr.* **1984**, 316, 617-624.
- 21 Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr.* **1986**, 363, 173-186.
- 22 Firmenschrift Chiralcel OD-R<sup>®</sup>, Daicel Chemical Industries, **1992**.
- 23 Firmenschrift Ultron ES-OVM<sup>®</sup>, Rockland Technologies, **1992**.
- 24 A. Terhechte, *Dissertation*, Univ. Münster, **1993**.
- 25 Application Guide for chiral column selection, Second Edition, Daicel Chemical Industries.
- 26 S. Terabe, K. Otsuka, H. Nishi, *J. Chromatogr. A* **1994**, 666, 295-319.
- 27 H. Nishi, Y. Kokusenya, T. Miyamoto, T. Sato, *J. Chromatogr. A* **1994**, 659, 449-457.
- 28 S. Pálmarsdóttir, L.-E. Edholm, *J. Chromatogr. A* **1994**, 666, 337-350.
- 29 D. Belder, G. Schomburg, *J. Chromatogr. A* **1994**, 666, 351-365.
- 30 H. H. Maurer, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1990**, 531, 369-405.
- 31 D. L. Massart, M. R. Detaevernier, *J. Chromatogr. Sci.* **1980**, 18, 139-143.
- 32 J. R. Cashman, Z.-C. Yang, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1990**, 532, 405-410.
- 33 P. Haefelfinger, *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 73-81.
- 34 G. W. Peng, W. L. Chiou, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1990**, 531, 3-50.
- 35 Standardarbeitsanweisung für Validierung von Analysemethoden für pharmakokinetische Untersuchungen, ASTA Medica **1993**.
- 36 A. Langner, *Pharm. Unserer Zeit* **1995**, 4, 207-218.
- 37 S. Pfeifer, P. Pffegel, H.-H. Borchert, *Grundlagen der Biopharmazie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1984**, Kapitel 7 und 8.
- 38 P. Dayer, R. Gasser, J. Gut, T. Kronbach, G.-M. Robertz, M. Eichelbaum, U. A. Meyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 125, 374-380.



- 39 Y. Funae, S. Imaoka in *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 105*, J. B. Schenkman, H. Greim (Eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1993**, Chapter 15
- 40 M. M. Bradfort, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- 41 M. Sattler, F. P. Guengerich, C.-H. Yun, U. Christians, K.-F. Sewing, *Drug Metab. Dispos.* **1992**, 20, 753-761.
- 42 G. G. Gibson, P. Skett, *Introduction to Drug Metabolism*, Chapman and Hall, London, **1986**, Chapter 8.3.
- 43 R. A. Prough, *Prog. bas. clin. Pharmac.* **1988**, 1, 103-131.
- 44 K. Doser, R. Hemmer in *Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band E16a*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1990**.
- 45 M. Donike, R. Iffland, L. Jaenicke, *Arzneim.-Forsch.* **1974**, 4, 556-560.
- 46 Interner Bericht **1987**, ASTA Medica AG, Frankfurt am Main.
- 47 C. Lerch, *geplante Dissertation*, Univ. Münster, **1996**.
- 48 S. Zbaida, R. Kariv, *Biopharm. Drug Dispos.* **1989**, 10, 431-442.
- 49 H. Masumoto, K. Takeuchi, S. Ohta, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37 (7), 1788-1794.
- 50 E. Wenning, *Dissertation*, Univ. Münster, **1995**.
- 51 D. N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, **1992**, Chapter 4.1.3.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1993 bis September 1995 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Prof. Dr. Gottfried Blaschke durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Blaschke danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die mir gegebenen Anregungen und Unterstützungen während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. J. Verspohl und Mitarbeitern, Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, danke ich für die Hilfe und die Einweisung bei der Herstellung der Leberhomogenate.

Herrn Dr. M. Locher danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während der experimentellen Arbeit und für das Ermöglichen eines praktischen Aufenthaltes bei ASTA Medica, Frankfurt am Main.

Der Abteilung Biochemische Forschung der ASTA Medica, insbesondere Herrn S. Leisenheimer, gilt mein Dank für die außerordentliche Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Aufnahme während meines dortigen Gastaufenthaltes.

Frau C. Weinz, Frau C. Lerch, Frau Dr. B. Bräutigam und Herrn Dr. E. Wenning danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und für zahlreiche Diskussionen während der experimentellen Arbeit.

Frau M. Grönheim möchte ich besonders danken für ihre stete und kompetente Hilfsbereitschaft nicht nur in technischen Fragen.

Besonderer Dank gilt Frau C. Weinz, Frau C. Lerch und Herrn Dr. E. Wenning für die Anregungen und die Unterstützung während der Zusammenschrift der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich den Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die wertvolle und angenehme Zusammenarbeit und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.