

# **Neue Analysemethoden für Metabolismusstudien am Beispiel des Calciumantagonisten Verapamil**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades Doktor der  
Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chem. Markus Walles  
geboren am 29. Oktober 1973 in Lingen

**2002**

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Experimente wurden in der Zeit von Januar 1999 bis November 2001 am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Pharmaforschung und klinische Inhalation, Nicolai-Fuchs-Straße, Hannover, durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Gerold Wünsch

Korreferent: Prof. Dr. Karsten Levsen

Tag der Promotion: 19. April 2002

## **Kurzzusammenfassung**

Verapamil ist ein wichtiger Calciumantagonist, der schon seit vielen Jahren als Medikament gegen Herzarrhythmien und Bluthochdruck auf dem Arzneimittelmarkt ist. Der Metabolismus des Arzneistoffs im Körper führt einerseits zu einer pharmakologischen Inaktivierung. Gebildete biologisch aktive Metaboliten andererseits können das Verständnis von Nebenwirkungen erleichtern, die bei der Langzeittherapie mit dem Arzneistoff auftreten. Um Grundlagendaten für alternative Therapiekonzepte und die Ursache der Nebenwirkungen zu ermitteln, wurden die Pharmakokinetik und der Metabolismus des Verapamils sowohl in *in vitro* Zellkulturen verschiedener Organe (Herz, Lunge, Leber) als auch *in vivo* (Plasma, Urin) in verschiedenen Spezies (Ratte, Schwein, Affe, Mensch) untersucht.

In dieser Dissertation wird gezeigt, wie durch off-line und on-line Kombination moderner Probenvorbereitungstechniken mit HPLC-MS<sup>n</sup> eine Identifizierung und Strukturaufklärung der Metaboliten sowie eine Untersuchung der Pharmakokinetik möglich ist.

Zur Untersuchung von Organproben wurde die "Matrix Solid Phase Dispersion" (MSPD), zur Untersuchung von Zellkulturüberständen, Plasma und Urin die "in-tube Solid Phase Microextraction" (in-tube SPME) sowie die Festphasenextraktion mit einem "Restricted Access Material" (RAM) in on-line-Kopplung mit der HPLC-MS<sup>n</sup> eingesetzt. Desweiteren wurde die Verwendung von "Molecular Imprinted Polymers" (MIP) zur selektiveren Extraktion von Metaboliten aus biologischen Matrices erprobt. Während die HPLC-MS<sup>n</sup> (Electrospray) unter Verwendung einer Ionenfalle in günstigen Fällen eine Strukturaufklärung unbekannter Metabolite erlaubt, ist zur eindeutigen Absicherung und für die Differenzierung zwischen Stellungsisomeren die ein- und zweidimensionale <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie erforderlich. Sie wurde off-line und in on-line-Kopplung mit der HPLC (HPLC-NMR) zur Strukturaufklärung von Verapamilmetaboliten im Urin eingesetzt.

**Schlagwörter:** Verapamil, Arzneistoffmetabolismus, LC-NMR/MS<sup>n</sup>

## Abstract

Verapamil is a calcium channel blocker which has been prescribed for many years for treatment of heart arrhythmias and hypertension. The metabolism of this drug in the body leads on the one hand to pharmacological inactivation. Biologically active metabolites on the other hand could facilitate the understanding of side effects that appear during long term therapy with this drug. The metabolism and pharmacokinetics of verapamil were investigated in *in vitro* cell cultures of different organs (heart, lung, liver) as well as *in vivo* (plasma, urine) of different species (rat, pig, monkey, human) to determine basic data for alternative therapies and to investigate the reason for the side effects.

It is shown that by using on-line and off-line sample preparation techniques with LC-MS<sup>n</sup> an identification and structure elucidation of the metabolites as well as an investigation of the pharmacokinetics is possible. The "Matrix Solid Phase Dispersion" (MSPD) was applied for the examination of the organ samples, the "in-tube Solid Phase Microextraction" (in-tube SPME) as well as the Solid Phase Extraction with a "Restricted Access Material" (RAM) in online-hyphenation with LC-MS<sup>n</sup> were applied for the examination of the cell culture supernatant, plasma and urine. The use of "Molecular Imprinted Polymers" (MIP) for the selective extraction of metabolites from biological matrices was tested.

LC-MS<sup>n</sup> using an ion trap allows the identification of unknown metabolites in some cases, but for an unambiguously identification the 1D-and 2D-<sup>1</sup>H NMR-spectroscopy is necessary. 1D-and 2D-<sup>1</sup>H NMR-spectroscopy were applied off-line and in on-line hyphenation with HPLC (LC-NMR) for the structure elucidation of verapamil metabolites in human urine.

**Key words:** Verapamil, Drug Metabolism, LC-NMR/MS<sup>n</sup>

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>X</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Einführung	1
1.2. Grundlagen der Resorption, Verteilung und Pharmakokinetik	2
1.3. Metabolismus	5
1.3.1. Phase -I-Reaktionen	5
1.3.1.1. Cytochrom P450-Monooxygenasen	5
1.3.1.1.1. Mechanismus der Oxidation	6
1.3.1.2. Flavinmonooxygenase	9
1.3.2. Phase-II-Reaktionen	9
1.4. Inhalative Pharmakotherapie	12
1.5. In vitro- und in vivo-Metabolismus	13
1.6. Pharmakologie und Metabolismus des Verapamils	14
1.6.1. Wirkung von Calciumantagonisten	14
1.6.2. Nebenwirkungen von Calciumantagonisten	17
1.6.3. Struktur- Wirkungsbeziehungen des Verapamils	18
1.6.4. Metabolismus des Verapamils	19
1.7. Ziel der Arbeit	24
<b>2. ANALYTIK VON ARZNEISTOFFEN UND IHREN METABOLITEN AUS BIOLOGISCHEM MATERIAL</b>	<b>26</b>
2.1. Probenvorbereitung von biologischem Material	27
2.1.1. Offline-Verfahren	28
2.1.1.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	28
2.1.1.2. Festphasenextraktion (SPE)	29
2.1.1.3. Festphasenextraktion mit molekular geprägten Polymeren (MISPE)	30
2.1.1.3.1. Molecular Imprinted Polymers (MIP)	31
2.1.1.3.2. Wahl des Polymermonomers	31

2.1.1.3.3.	UV-Spektroskopische Analyse	32
2.1.1.3.4.	Polymerisation	34
2.1.1.3.5.	MISPE	36
2.1.1.4.	Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)	37
2.1.1.5.	SPME	40
2.1.1.5.1.	Theoretische Aspekte der SPME	40
2.1.1.5.2.	SPME-Modifikationen	41
2.1.2.	Online-Verfahren: Kopplung der Probenvorbereitung mit der HPLC	42
2.1.2.1.	HPLC-integrierte Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einem "Restricted Access Material" (RAM)	43
2.1.2.2.	Analytspezifische online-SPE komplexer Proben durch Kombination von "Restricted Access Materials" (RAM) mit "Molecular Imprinted Polymers" (MIP)	47
2.1.2.3.	HPLC-integrierte Probenvorbereitung mittels in-tube SPME	50
2.1.2.3.1.	Funktionsweise der in-tube SPME	51
<b>2.2.</b>	<b>Chromatographie</b>	<b>54</b>
2.2.1.	Wahl des Sorbens	54
2.2.2.	Auswahl der Säulendimension	55
2.2.3.	Wahl der mobilen Phase	56
2.2.4.	Wahl der Elutionsbedingungen	57
<b>2.3.</b>	<b>Detektionsmethoden</b>	<b>58</b>
2.3.1.	HPLC-MS-Kopplung	58
2.3.1.1.	Ionenfallenmassenspektrometer	60
2.3.1.2.	Quantifizierung	65
2.3.2.	HPLC- NMR- Kopplung	66
<b>2.4.</b>	<b>Literaturübersicht zur Verapamilanalytik</b>	<b>68</b>
<b>2.5.</b>	<b>Zusammenfassung des Kapitel 2</b>	<b>70</b>
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL UND METHODENENTWICKLUNG</b>	<b>71</b>
<b>3.1.</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>72</b>
<b>3.2.</b>	<b>Material und Geräte</b>	<b>72</b>
<b>3.3.</b>	<b>Probenmaterial</b>	<b>74</b>
<b>3.4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>74</b>
3.4.1.	Anforderungen an die Methodenentwicklung	74
3.4.2.	Entwicklung einer HPLC-MS <sup>n</sup> Methode zur Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus biologischem Material	77

3.4.2.1.	HPLC-Methode	77
3.4.2.2.	MS-Methode	78
3.4.2.2.1.	Strukturaufklärung mit MS <sup>n</sup>	79
3.4.3.	Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur Isolierung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Zellkulturüberständen, Mikrosomen und Urin	82
3.4.3.1.	Auswahl der Festphase	83
3.4.3.2.	Zusammenfassung	85
3.4.4.	Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung der Phase-II-Konjugate des Verapamils aus humanem Urin mittels <sup>1</sup> H NMR	86
3.4.4.1.	Isolation der Metaboliten aus humanem Urin	87
3.4.4.2.	<sup>1</sup> H NMR-Messungen	88
3.4.4.2.1.	Experimentelle Angaben zu offline <sup>1</sup> H NMR-Messungen	90
3.4.4.2.2.	Experimentelle Angaben zu den HPLC-NMR-Messungen	90
3.4.4.2.3.	D/H-Rücktausch	91
3.4.5.	Entwicklung einer Methode zur Untersuchung des Metabolismus in der Lunge	91
3.4.5.1.	Untersuchung des Metabolismus in Zellkulturüberständen von alveolarepithelialer Typ II-Zellen und mikrosomalen Membranen der Lunge, sowie Plasma	92
3.4.5.1.1.	Chromatographische Bedingungen	92
3.4.5.1.2.	Bestimmung der Ventilschaltzeiten	93
3.4.5.1.3.	Validierung der Methode	95
3.4.5.1.4.	Zusammenfassung	96
3.4.5.2.	Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Organen mittels MSPD	97
3.4.5.2.1.	Extraktion der Analyten	98
3.4.5.2.2.	Zusammenfassung	99
3.4.6.	Entwicklung von molekular geprägten Adsorbentien für Metabolismusstudien	100
3.4.6.1.1.	UV-Spektroskopische Analyse	100
3.4.6.1.2.	Polymerisation	101
3.4.6.1.3.	Bestimmung der molekularen Prägung (Batch binding assay)	102
3.4.6.2.	MISPE	103
3.4.6.3.	Säulenschaltung von einer RAM-Vorsäule mit einer MIP-Vorsäule und einer analytischen Säule	105
3.4.6.3.1.	Peakverbreiterung durch MIP	106
3.4.6.3.2.	Bestimmung des Prägungseffektes	108
3.4.6.3.3.	Zusammenfassung	109
3.4.7.	Weiterentwicklung der in-tube SPME für Metabolismusstudien	109
3.4.7.1.	Wahl der Extraktionskapillaren	109
3.4.7.2.	Bestimmung der Zahl der Extraktionszyklen und Extraktionsgeschwindigkeit	110
3.4.7.3.	pH-Abhängigkeit der Extraktion	112
3.4.7.4.	Desorption und Analyttransfer	114
3.4.7.5.	Wahl der experimentellen Bedingungen	114

3.4.7.6.	Zusammenfassung der Methodenentwicklung für die in-tube SPME	115
3.4.8.	Zusammenfassung des Kapitel 3	116
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>117</b>
<b>4.1.</b>	<b>Strukturaufklärung der Metaboliten</b>	<b>117</b>
4.1.1.	Strukturaufklärung der Metaboliten mit HPLC-MS <sup>n</sup>	117
4.1.1.1.	Diskussion der MS-Spektren	120
4.1.2.	Zusammenfassung	136
4.1.3.	Strukturaufklärung der Phase-II-Metaboliten des Verapamils mittels offline <sup>1</sup> H NMR, MS <sup>n</sup> und HPLC-NMR	136
4.1.3.1.	Ergebnisse aus den offline <sup>1</sup> H NMR-Messungen	137
4.1.3.1.1.	Diskussion der <sup>1</sup> H NMR-Daten von Metabolit M2	140
4.1.3.1.2.	Diskussion der <sup>1</sup> H NMR-Daten von Metabolit M5	143
4.1.3.1.3.	Diskussion der <sup>1</sup> H NMR-Daten von Metabolit M9	147
4.1.3.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den offline <sup>1</sup> H NMR-Messungen	150
4.1.3.2.	Ergebnisse aus den MS- und HPLC-NMR-Messungen	151
4.1.3.2.1.	Diskussion der MS- und <sup>1</sup> H NMR-Daten der Fraktion 1A-1	152
4.1.3.2.2.	Diskussion der MS- und <sup>1</sup> H NMR-Daten der Fraktion 1A-2	157
4.1.3.2.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den HPLC-NMR-Messungen	161
4.1.3.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Strukturaufklärung	162
<b>4.2.</b>	<b>Gewebespezifischer Metabolismus des Verapamils</b>	<b>163</b>
4.2.1.	Metabolismus in der Ratte	166
4.2.1.1.	Metabolismus in primären Rattenhepatozytenkulturen	166
4.2.1.2.	Herz	167
4.2.1.3.	Lunge	169
4.2.2.	Metabolismus im Mensch	169
4.2.2.1.	Primäre Hepatozytenkulturen	169
4.2.2.2.	Urin	170
4.2.2.3.	Herzmikrosomen	170
4.2.2.4.	Endothelzellen	170
4.2.3.	Metabolismus im Schwein	170
4.2.4.	Metabolismus im Affen	171
4.2.5.	Zusammenfassung des gewebe- und speziesspezifischen Metabolismus	171
<b>4.3.</b>	<b>Pharmakokinetische Messungen</b>	<b>172</b>
4.3.1.	Säulenschaltung mit der ADS-Vorsäule	172
4.3.2.	MSPD	173
4.3.3.	Präzision der Methoden	173
4.3.4.	Pharmakokinetiken	174



4.3.4.1.	Zusammenfassung	178
<b>4.4.</b>	<b>In-tube SPME</b>	<b>179</b>
4.4.1.	Zusammenfassung	181
<b>4.5.</b>	<b>MIP</b>	<b>182</b>
4.5.1.	MISPE	182
4.5.2.	RAM-MIP-Säulenschaltung	184
4.5.3.	Zusammenfassung der MIP-Ergebnisse	184
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>186</b>
<b>5.1.</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>186</b>
5.1.1.	Probenvorbereitungsmethoden	186
5.1.2.	Strukturaufklärung mit Hilfe der Massenspektroskopie und der <sup>1</sup> H NMR	191
5.1.2.1.	Strukturaufklärung mit HPLC-MS <sup>n</sup>	192
5.1.2.1.1.	Retentionszeiten	196
5.1.2.1.2.	Quantifizierung	197
5.1.2.2.	Vergleich der offline- und HPLC-NMR-Messungen	198
5.1.3.	Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der eingesetzten Analysemethoden	200
<b>5.2.</b>	<b>Verapamilmetabolismus</b>	<b>201</b>
5.2.1.	Chemische Stabilität und Spezifität der gebildeten Metaboliten	201
5.2.2.	Oxidationsmechanismen	202
5.2.3.	Gewebespezifischer Metabolismus	206
5.2.3.1.	Metabolismus in der Leber	206
5.2.3.2.	Metabolismus im Herzen und den Endothelzellen	208
5.2.3.3.	Pharmakokinetikmessungen und Metabolismus in der Lunge	210
5.2.3.4.	Diskussion der verwendeten Modellsysteme	212
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>214</b>
<b>7.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>218</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>219</b>
<b>Anhang</b>		<b>230</b>
<b>Veröffentlichungen</b>		<b>263</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>264</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Darstellung des Verlaufs von Pharmakokinetiken in Abhängigkeit von der Applikationsform	4
<b>Abb. 2:</b> Mögliche Reaktionswege der N-Demethylierung von tertiären Aminen	8
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung der Glucuronidierung eines Substrats	10
<b>Abb. 4:</b> Darstellung des Aufbaus des Herzens und der Erregungsweiterleitung (aus <a href="http://www.adam.com">http://www.adam.com</a> )	15
<b>Abb. 5:</b> Struktur des Verapamils und mögliche Konfiguration in wäßriger Lösung	18
<b>Abb. 6:</b> Identifizierte Phase-I-Metaboliten des Verapamils	22
<b>Abb. 7:</b> Strukturverwandte Calciumantagonisten vom Phenylalkylamin-Typ	23
<b>Abb. 8:</b> Darstellung einiger Polymermonomere, die für die Polymerisation eingesetzt werden	33
<b>Abb. 9:</b> Prozeß der molekularen Prägung, dargestellt am Beispiel des Theophyllins	35
<b>Abb. 10:</b> Schematische Darstellung der MISPE mit einer Mikrosäule	37
<b>Abb. 11:</b> Schematische Darstellung des MSPD -Prozesses	39
<b>Abb. 12:</b> Schematischer Aufbau der ADS-Partikel	44
<b>Abb. 13:</b> Fraktionierung von biologischen Proben durch Säulenschaltung mit RAM-Vorsäule	46
<b>Abb. 14:</b> Fraktionierung von biologischen Proben durch RAM-MIP-Säulenschaltung	48
<b>Abb. 15:</b> Schematische Extraktion und Desorption mittels in-tube SPME	53
<b>Abb. 16:</b> Schematische Darstellung des Desolvatisierungsprozesses	59
<b>Abb. 17:</b> Schematische Darstellung einer Ionenfalle	61
<b>Abb. 18:</b> Stabilitätsdiagramm einer Ionenfalle	63
<b>Abb. 19:</b> Schematischer Aufbau der HPLC-NMR-Kopplung	67
<b>Abb. 20:</b> Referenzsubstanzen für die Analytik	76
<b>Abb. 21:</b> Trennung der vier Standardsubstanzen auf einer RP-Select B-Säule	78
<b>Abb. 22:</b> Fragmentierung ausgewählter Standards im MS <sup>2</sup> -Modus	80
<b>Abb. 23:</b> Allgemeines Fragmentierungsschema für Verapamil und strukturähnliche Verbindungen	81
<b>Abb. 24:</b> Wiederfindungen für Verapamil und Gallopamil aus den untersuchten Matrices	85
<b>Abb. 25:</b> Ionenchromatogramme von einigen Glucuroniden aus Zellkulturüberstand und Urin	87
<b>Abb. 26:</b> Schema für die Aufbereitung der humanen Urinproben	89
<b>Abb. 27:</b> UV-Chromatogramm der Proteinelution bei 280 nm	94
<b>Abb. 28:</b> Bestimmung der Transferzeit des Verapamils (Ionenchromatogramm)	95
<b>Abb. 29:</b> Transferzeit von Verapamil und Gallopamil von der MIP-Vorsäule auf die analytische Säule	106
<b>Abb. 30:</b> Peakverbreiterung von Verapamil und Gallopamil durch MIP	107
<b>Abb. 31:</b> Bestimmung der Peakverbreiterung durch MIP (UV: $\lambda = 230$ nm)	107
<b>Abb. 32:</b> Extraktionseffizienz der verschiedenen Faserbeschichtungen (Coatings)	110
<b>Abb. 33:</b> Abhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung von der Zahl der Extraktionszyklen	111
<b>Abb. 34:</b> Abhängigkeit zwischen Extraktionseffizienz und Extraktionsgeschwindigkeit	112
<b>Abb. 35:</b> pH-Abhängigkeit der Extraktion	113
<b>Abb. 36:</b> Ionenchromatogramm von Verapamil und seinen Metaboliten aus Rattenhepatozyten	117
<b>Abb. 37:</b> Beobachtete Cross-Peaks für Verapamil und seine Metaboliten im 2D NOESY-Spektrum	139
<b>Abb. 38:</b> 600 MHz <sup>1</sup> H NMR Übersichtsspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II	141
<b>Abb. 39:</b> 600 MHz <sup>1</sup> H NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der	

aromatischen Protonen)	141
<b>Abb. 40:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)	142
<b>Abb. 41:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)	142
<b>Abb. 42:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR 2D NOESY-Teilspektrum	143
<b>Abb. 43:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)	144
<b>Abb. 44:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)	145
<b>Abb. 45:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)	145
<b>Abb. 46:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)	146
<b>Abb. 47:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus 2D NOESY der Metaboliten M5-I und M5-II	146
<b>Abb. 48:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)	148
<b>Abb. 49:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure und der Methoxygruppenprotonen)	148
<b>Abb. 50:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)	149
<b>Abb. 51:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus dem 1D TOCSY Spektrum des Metaboliten M9	149
<b>Abb. 52:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus dem 2D NOESY-Spektrum des Metaboliten M9	150
<b>Abb. 53:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen, die Metakopplungen sind teilweise nicht aufgelöst)	154
<b>Abb. 54:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)	155
<b>Abb. 55:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)	155
<b>Abb. 56:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)	156
<b>Abb. 57:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR 2D WET NOESY-Teilspektrum	156
<b>Abb. 58:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)	159
<b>Abb. 59:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)	159
<b>Abb. 60:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)	160
<b>Abb. 61:</b> 600 MHz $^1\text{H}$ NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)	160

<b>Abb. 62:</b> 600 MHz <sup>1</sup> H NMR 2D WET NOESY-Teilspektrum	<b>161</b>
<b>Abb. 63:</b> Vorgeschlagendes Metabolismusschema für Verapamil	<b>162</b>
<b>Abb. 64:</b> Mechanismus der N-Demethylierung von Verapamil	<b>168</b>
<b>Abb. 65:</b> Ionenchromatogramm nach Extraktion von 2 ml Zellkulturüberstand von Rattenhepatozyten mit Hilfe der ADS-Vorsäule	<b>172</b>
<b>Abb. 66:</b> MS/MS-Ionenchromatogramm einer Lungengewebeprobe nach Extraktion mit der MSPD	<b>173</b>
<b>Abb. 67:</b> Pharmakokinetik von Verapamil in Schweineplasma nach inhalativer- und intravenöser Applikation	<b>174</b>
<b>Abb. 68:</b> Pharmakokinetik von Verapamil in Rattenplasma nach intravenöser und inhalativer Applikation	<b>177</b>
<b>Abb. 69:</b> Pharmakokinetik von Verapamil aus Lungengewebe der Ratte nach intravenöser und inhalativer Applikation	<b>177</b>
<b>Abb. 70:</b> Verapamil und seine Metaboliten nach Extraktion aus humanem Urin mittels in-tube SPME (Ionenchromatogramm)	<b>180</b>
<b>Abb. 71:</b> Vergleich der in-tube SPME mit der ADS-Säulenschaltung bezüglich der Pharmakokinetikmessungen	<b>181</b>
<b>Abb. 72:</b> Vergleich der Selektivität der Extraktion zwischen der konventionellen SPE und der MISPE	<b>183</b>
<b>Abb. 73:</b> Ionenchromatogramme nach RAM-MIP-Extraktion der unterschiedlichen Matrices	<b>185</b>
<b>Abb. 74:</b> Vorgeschlagene Wechselwirkung des MIP mit Verapamil	<b>190</b>
<b>Abb. 75:</b> Mögliche Mechanismen für die Hydroxylierung von Aromaten	<b>205</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Nomenklatur der Cytochrom P 450-Enzyme	<b>6</b>
<b>Tab. 2:</b> Chemische Struktur und einige kardiovaskuläre Effekte ausgewählter Calciumantagonisten. Die relativen Effekte reichen von keinem Effekt (0) bis zu sehr starkem Effekt (5)	<b>16</b>
<b>Tab. 3:</b> Nebenreaktionen der Calciumantagonisten	<b>17</b>
<b>Tab. 4:</b> Identifizierte Phase-I-Metaboliten des Verapamils	<b>21</b>
<b>Tab. 5:</b> Wiederfindungen nach der SPE von Zellkulturmedium (n = 3)	<b>84</b>
<b>Tab. 6:</b> Isolierte Metaboliten aus Schnittfraktionen	<b>89</b>
<b>Tab. 7:</b> Wiederfindungen von Verapamil aus den unterschiedlichen Matrices.	<b>96</b>
<b>Tab. 8:</b> Wiederfindungen, Linearitäten und Nachweisgrenzen des MSPD-Verfahrens	<b>99</b>
<b>Tab. 9:</b> Bestimmung des Prägungs-Effektes	<b>102</b>
<b>Tab. 10:</b> Bestimmung des Prägungseffektes für Verapamil und Gallopamil bei der MISPE (Verteilung der Analyten auf Durchbruch, Spülfraktion, Eluat in Abhängigkeit von der Matrix)	<b>105</b>
<b>Tab. 11:</b> Prägungseffekt der Analyten bei RAM-MIP-Säulenschaltung in Abhängigkeit von der Matrix	<b>108</b>
<b>Tab. 12:</b> pKs-Werte von Gallopamil, Verapamil und seiner Hauptmetaboliten	<b>114</b>
<b>Tab. 13:</b> Wiederfindungen, Linearität und Nachweisgrenzen der vier Referenzsubstanzen bei der in-tube SPME	<b>115</b>
<b>Tab. 14:</b> Hauptfragmentierungen von Verapamil und seinen Metaboliten	<b>118</b>
<b>Tab. 15:</b> <sup>1</sup> H NMR-Daten von Verapamil und seinen Phase-II-Metaboliten	<b>138</b>
<b>Tab. 16:</b> Beobachtete Cross-Peaks im 2D NOESY-Spektrum	<b>138</b>

<b>Tab. 17:</b> MS-Daten der identifizierten Metaboliten	<b>151</b>
<b>Tab. 18:</b> <sup>1</sup> H NMR-Daten der identifizierten Metaboliten	<b>152</b>
<b>Tab. 19:</b> Beobachtete Cross-Peaks im 2D WET NOESY-Spektrum	<b>152</b>
<b>Tab. 20:</b> Gewebe- und speziesspezifischer Metabolismus von Verapamil	<b>164</b>
<b>Tab. 21:</b> Verapamil und seine detektierten Metaboliten in den unterschiedlichen Matrices, die mit Hilfe der in-tube SPME extrahiert wurden	<b>179</b>
<b>Tab. 22:</b> Ergebnisse aus der MISPE von humanem Urin (Erläuterung in Kapitel 3)	<b>182</b>
<b>Tab. 23:</b> Abspaltung der wichtigsten Neutralteilchen im MS <sup>n</sup> und ihre Bedeutung für die Strukturaufklärung	<b>195</b>
<b>Tab. 24:</b> Vor- und Nachteile der eingesetzten Analysemethoden	<b>200</b>

## Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AcCN	Acetonitril
AIBN	Azodiisobutylnitril
API	Athmospheric Pressure Ionization
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CYP	Cytochrom P450
D	Dosis
EDMA	Ethylenglycoldimethacrylsäure (Ethylenglycoldimethacrylic Acid)
ESI	Electrospray Ionization
GC	Gaschromatographie
GP	Gallopamil
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
I. D.	Innerer Durchmesser
i. v.	intravenös
inh.	inhalativ
IS	Interner Standard
L	Länge
l	Liter
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid Liquid Extraction)
MAA	Methacryl Säure (Methacrylic Acid)
MeOH	Methanol
MIP	Molekular geprägte Adsorbentien (Molecular Imprinted Polymers)
MISPE	Molekular geprägte Festphasenextraktion (Molecular Imprinted Solid Phase Extraction)
MS	Massenspektrometrie
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion
NH <sub>4</sub> Acetat	Ammoniumacetat
NMR	Kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Enhancement)
NOESY	Zweidimensionale Kern-Overhauser-Spektroskopie (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
NVP	Norverapamil
NWG	Nachweisgrenze
O. D.	Äußerer Durchmesser (Outer Diameter)
PD	Partikeldurchmesser
PPY	Polypyrrol
RAM	Restricted Access Material
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction)
Tab.	Tabelle
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	ultraviolett
VP	Verapamil

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Einführung

Viele Arzneistoffe, die vom Körper aufgenommen werden, unterliegen im Körper bis zu ihrer Ausscheidung einem Biotransformationsprozeß. Der Biotransformationsprozeß wird als Metabolismus bezeichnet, die entstehenden Stoffwechselprodukte als Metaboliten.

Eine starke Metabolisierung, die zu biologisch inaktiven Metaboliten führt, ist bei einer erwünschten systemischen Verfügbarkeit eines Arzneistoffes unerwünscht.

Viele Medikamente, wie z. B. der Calciumantagonist Verapamil, werden nach oraler Gabe sehr stark metabolisiert und verlieren so ihre biologische Wirkung (Bioinaktivierung).

Eine Ausnahme stellen die sogenannten Prodrugs dar, die erst durch den Metabolismus in die biologisch aktive Form überführt werden [1]. So wird nach oraler Gabe von ACE-Inhibitoren (ACE: **A**ngiotensin **C**onverting **E**nzyme), wie Enalapril, der eigentliche Wirkstoff, das Enalaprilat, durch Esterhydrolyse im Dünndarm freigesetzt (Bioaktivierung). Andere Substanzen, wie Testosterondecanoat oder Erythromycin-succinat, werden in veresteter Form appliziert, um entweder eine bessere Resorptionsrate [2] oder eine bessere Verträglichkeit mit der Magen- und Darmschleimhaut zu erzielen [3]. Auch hier wird durch Hydrolyse der Esterbindung der eigentliche Wirkstoff freigesetzt.

In einigen Fällen können durch diese Bioaktivierung sehr reaktive Metaboliten gebildet werden, die zu unerwünschten Wirkungen im Organismus führen können (Biotoxifizierung). Eines der bekanntesten Beispiele für eine toxische Bioaktivierung ist die Biotransformation des Thalidomids, das unter dem Handelsnamen Contergan<sup>®</sup> bekannt wurde [4].

Ein weiteres Beispiel hierfür ist der Metabolismus von Benzol: Durch eine enzymatische Oxidation wird eine chemisch sehr reaktive Verbindung gebildet, die in der Folge an die DNA-Basen binden kann und damit cancerogen wirkt [4].

Gerade bei der Entwicklung von Arzneistoffen sollen diese Biotransformationen, die zur Bildung von biologisch wirksamen Metaboliten und damit eventuell zu Nebenwirkungen des Medikamentes führen können, nach Möglichkeit vermieden werden.

## 1.2. Grundlagen der Resorption, Verteilung und Pharmakokinetik

Im Falle der oralen Applikation erfolgt die Resorption des Wirkstoffs aus Magen und Darm. Die Resorptionsgeschwindigkeit hängt von vielen Faktoren ab, wie z. B. Lösungsgeschwindigkeit des Arzneistoffs (im Falle einer festen Darreichungsform), von der Geschwindigkeit, mit der Magen- und Darminhalt vorwärtsbewegt werden, von der Membrangängigkeit des Wirkstoffs, von der Konzentrationsdifferenz der Wirkstoffkonzentration im Darm und der Konzentration im Blut sowie von der Durchblutung der Darmschleimhaut. Das gesamte venöse Blut des Magen-Darm-Traktes und alle darin enthaltenen Substanzen gelangen über die Pfortader in die Leber, bevor das Herz und der Lungen- und Körperkreislauf passiert wird. Für die Wirksamkeit eines Arzneistoffs ist von Bedeutung, ob und in welchem Umfang er bei der ersten Passage durch die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes und durch die Leber metabolisiert und eventuell biologisch inaktiviert wird (First-Pass-Effekt). Nach der Leberpassage können der Wirkstoff und seine Metaboliten mit dem Blut einzelne Organe erreichen und bei entsprechenden Eigenschaften von diesen auch aufgenommen oder metabolisiert werden.

Der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe geschieht im wesentlichen im Bereich der Kapillaren. Die Kapillaren sind weitverzweigt und besitzen eine große Austauschoberfläche (ca. 1000 m<sup>2</sup>). Die Kapillarwand bildet die Blut-Gewebe-Schranke. Sie besteht im Prinzip aus einer Endothelzellschicht und der diese umhüllende Basalmembran. Die Blut-Gewebeschanke ist in den Kapillarnetzen des Körpers unterschiedlich ausgebildet. Die Durchlässigkeit für Arzneistoffe wird von den Bau- und Funktionseigenschaften der Endothelzellen bestimmt.

Durch die Aufnahme in das Gewebe sinkt die Konzentration des Arzneistoffs im Blut. Der Zustrom aus dem Darm nimmt ab, wenn die Konzentrationsdifferenz zwischen Darm und Blut kleiner wird. Der Blutspiegel erreicht ein Maximum, wenn die pro Zeiteinheit eliminierte Menge der pro Zeiteinheit resorbierten Menge entspricht. Allerdings kann ein Teil des verabreichten Arzneistoffs (unabhängig von der Applikationsart) vor dem Eintritt in den großen Kreislauf beim Durchgang durch die Lunge von dieser aufgenommen und vorübergehend gespeichert werden (prä-systemische Elimination).

Die Elimination wird durch Abstrom des Wirkstoffs aus dem Blut in die Leber und Niere eingeleitet. Das in einer Zeiteinheit formal vom Wirkstoff befreite Plasmavolumen wird als Clearance bezeichnet. Je nachdem, ob eine Ausscheidung oder



eine chemische Veränderung die Konzentration des Wirkstoffs sinken läßt, wird von einer renalen oder hepatischen Clearance gesprochen.

Die Vorgänge der Resorption, Verteilung und Elimination von Arzneistoffen laufen mit exponentiellen Gesetzmäßigkeiten ab. Hinsichtlich der Resorption läßt sich die exponentielle Abhängigkeit mit dem 2. Fickschen Gesetz erklären, da die Menge des pro Zeiteinheit bewegten Stoffes von der Konzentrationsdifferenz (Gradient) zwischen zwei Räumen (Kompartimenten) abhängt.

**Gleichung 1:** 
$$C_{Plasma} = C_0 \times e^{-kt}$$

$C_0$  bezeichnet die applizierte Ausgangskonzentration (mg/l),  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) ist die Geschwindigkeitskonstante für die Elimination und  $t$  (min) die Zeit nach erfolgter Applikation. Im Falle der renalen Clearance ist die Ausscheidung vielfach von der glomerulären Filtration in der Niere abhängig.

Bei der hepatischen Clearance ergibt sich meist ein exponentieller Abfall der Arzneistoffkonzentration über die Zeit, weil die metabolisierenden Enzyme im konzentrationsproportionalen Bereich ihrer Aktivierungskurve arbeiten und daher mit abfallender Konzentration die pro Zeiteinheit umgesetzte Substanzmenge sinkt (eine Ausnahme stellt die Alkoholdehydrogenase dar).

Wenn nach rascher intravenöser Zufuhr die Verteilung des Arzneistoffes im Körper deutlich schneller erfolgt als die Elimination, stellt sich dies in einem anfänglich raschen und dann stark verlangsamten Abfall des Plasmaspiegels dar, wobei die schnelle Komponente des Abfalls als  $\alpha$ -Phase (Verteilungsphase) und die langsame Komponente als die  $\beta$ -Phase (Eliminationsphase) bezeichnet wird. Für den exponentiellen Abfall können daher zwei Geschwindigkeitskonstanten definiert werden:

**Gleichung 2:** 
$$C_{Plasma} = \frac{D_{iv}}{V} (c_1 e^{-k_1 t} + c_2 e^{-k_2 t})$$

$k_1$  und  $k_2$  ( $\text{min}^{-1}$ ) bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten für die  $\alpha$ -Phase und die  $\beta$ -Phase,  $c_1$  und  $c_2$  die Verteilungskoeffizienten für Kompartiment 1 und Kompartiment 2.  $D_{iv}$  (mg) bezeichnet die intravenös applizierte Dosis und  $V$  (l) das Verteilungsvolumen im Körper.

Die Teilprozesse der Resorptions-, Verteilungs- und Eliminierungsvorgänge können zeitlich parallel ablaufen. Wenn die Resorption aus dem Darm langsamer abläuft als die Verteilung, bestimmen Resorption und Elimination den Blutspiegelverlauf. Dieser

läßt sich mathematisch durch die Batemanfunktion beschreiben.

**Gleichung 3:** 
$$C_{Plasma} = \frac{D}{V} \times \frac{k_1}{k_2 - k_1} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad \text{Bateman-Funktion}$$

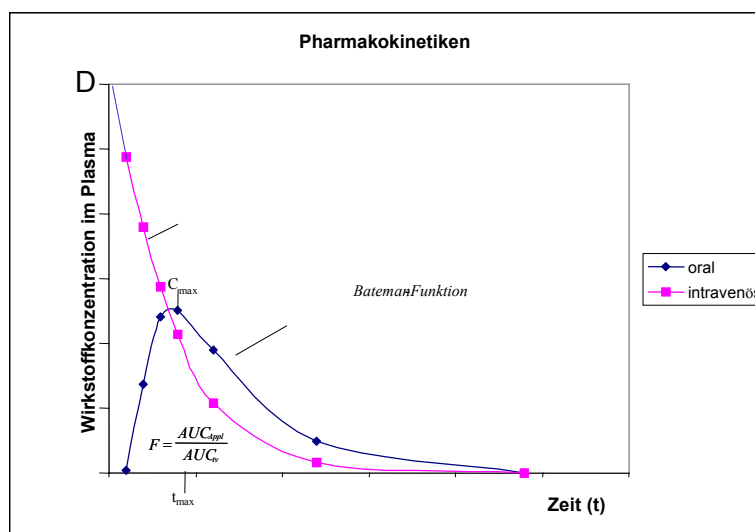
$k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) bezeichnet die Geschwindigkeitskonstante für den Resorptionsvorgang,  $k_2$  ( $\text{min}^{-1}$ ) die Geschwindigkeitskonstante für den Eliminationsvorgang,  $D$  (mg) die applizierte Dosis und  $V$  (l) das Verteilungsvolumen des Arzneistoffs im Körper.

Die Geschwindigkeit der Invasion hängt von der Applikationsart ab. Je rascher die Invasion erfolgt, desto kürzer ist die Zeit ( $t_{\max}$ ), die bis zum Erreichen des Plasmaspiegelmaximums ( $c_{\max}$ ) vergeht und desto früher beginnt der Plasmaspiegel wieder zu fallen. Unter der Bioverfügbarkeit wird der Anteil der applizierten Arzneistoffdosis verstanden, der in den Kreislauf gelangt, d. h. systemisch verfügbar wird. Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit  $F$  wird die AUC ( $AUC$ : area under the curve) der jeweiligen Applikationsform ( $AUC_{\text{Appl}}$ ) ins Verhältnis zur AUC nach intravenöser Applikation ( $AUC_{\text{iv}}$ ) desselben Arzneistoffes gesetzt.

**Gleichung 4:** 
$$F = \frac{AUC_{\text{Appl}}}{AUC_{\text{iv}}}$$

Die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter sind in Abb. 1 dargestellt.

**Abb. 1:** Darstellung des Verlaufs von Pharmakokinetiken in Abhängigkeit von der Applikationsform



Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter eines Arzneistoffs werden die

Konzentrationen des Arzneistoffes und dessen Metaboliten aus Plasma, Serum oder Urin bestimmt, da diese Körperflüssigkeiten leicht zugänglich sind und die kinetischen Vorgänge im Organismus widerspiegeln. Die so gemessenen Konzentrationen entsprechen aber nicht immer den tatsächlichen Konzentrationen am eigentlichen Wirkort, da viele Arzneistoffe z. B. im Plasma proteingebunden vorliegen können, wodurch die Konzentration an freiem Arzneistoff im Plasma verringert wird. Deshalb ist es in einigen Fällen sinnvoll, die Konzentrationen des freien, ungebundenen Arzneistoffs in den Zielorganen, wie der Leber oder der Lunge, zu messen.

### **1.3. Metabolismus**

Der Metabolismus erleichtert die Elimination aufgenommener körperfremder Stoffe (Xenobiotika), wie z. B. Arzneistoffe, über die Nieren (glomeruläre Filtration). Hierfür muß die Polarität und Wasserlöslichkeit des Substrats erhöht werden, da die Elimination des Xenobiotikums über die Nieren umso schneller verläuft, je hydrophiler es ist. Bei den Metabolisierungsreaktionen wird zwischen Phase-I-Reaktionen und Phase-II-Reaktionen unterschieden.

#### **1.3.1. Phase -I-Reaktionen**

Bei den Phase-I-Reaktionen werden apolare, lipophile Stoffe in polare, hydrophile Verbindungen überführt. Die dominanten Reaktionen sind Oxidationsreaktionen wie Hydroxylierungen, Epoxidierungen und O-, N- oder S-Dealkylierungen, weshalb die Phase-I-Reaktion auch als Funktionalisierungsreaktion bezeichnet wird. Desweiteren werden auch Reduktionen beobachtet, wie z. B. Azo-Reduktion, Nitroreduktion, Carbonylreduktion, und Hydrolysen, wie die Hydrolyse von Estern, Amiden und Epoxiden. Phase-I-Reaktionen werden vor allem von Monooxygenasen neben Peroxidasen, Esterasen bzw. Amidasen sowie Alkoholdehydrogenasen vermittelt [5].

##### **1.3.1.1. Cytochrom P450-Monooxygenasen**

Die wichtigste Komponente des oxidativen Phase-I-Biotransformationssystems besteht aus einer Gruppe von Hämproteinenzymen, welche kollektiv als Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen bezeichnet werden. Das Cytochrom P450-System ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und besteht aus zwei Komponenten: der NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Monooxygenase (einem

Flavoprotein) und der prosthetischen Gruppe, die dreiwertiges Eisen nicht kovalent in einem Porphyrinringsystem über van-der-Waals-Kräfte bindet.

Die Cytochrom P450-Monooxygenasen wurden zuerst in Rattenlebermikrosomen identifiziert [6]. Mikrosomen sind Zellfragmente, die erst aus den membran- gebundenen Proteinen des endoplasmatischen Retikulums nach Zerstörung der Zelle durch Zentrifugation isoliert werden können.

Der Name der Cytochrom P450-Enzyme ist auf die Struktur der Enzyme, die eine Häm-Gruppe und eine charakteristische Absorption bei 450 nm besitzen (nach Reduktion durch Dithionit und Einleitung von Kohlenmonoxid in die Mikrosomen- lösung), bezogen, wobei P für Pigment steht.

Nach internationaler Übereinkunft werden die einzelnen Cytochrom P450-Enzyme mit CYP bezeichnet.

Die CYPs werden je nach Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz in Isoformen unterteilt [7]. Sind die Aminosäuresequenzen der jeweiligen Proteine zu mehr als 40 % identisch, so gehören sie zu einer Familie. Die Familie wird durch eine arabische Ziffer gekennzeichnet. Sind die Sequenzen zu mehr als 55 % identisch, so werden sie zu einer weiteren Gruppe (Unterfamilie), die durch einen Großbuchstaben gekennzeichnet wird, zusammengefaßt. Das individuelle Enzym wiederum erhält eine arabische Ziffer [6] (siehe Tab. 1).

**Tab. 1:** Nomenklatur der Cytochrom P 450-Enzyme

	Symbole	Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz
<b>Familien</b>	1, 2, 3, 4	40- 55%
<b>Unterfamilien</b>	A, B, C, D	55-65%
<b>Individuelle Enzyme</b>	z.B. B1 und B2	>> 65%

Die Zahl und Art der Isoformen variiert zwischen den Spezies.

Die CYP-Enzyme werden am stärksten in der Leber exprimiert [8], in anderen Organen wie Dickdarm [9], Lunge [10], Haut [11], Blutzellen [12] oder Herz [13] konnten ebenfalls einige Isoformen nachgewiesen werden.

#### **1.3.1.1.1. Mechanismus der Oxidation**

Während die meisten Enzyme sehr selektiv in Bezug auf das Substrat und den Reaktionsmechanismus sind, haben die Cytochrom P450-Enzyme eine geringe Substratspezifität und oxidieren Substrate nach verschiedenen Mechanismen.

Allen Mechanismen sind aber folgende Schritte gemeinsam:

- Bindung von molekularem Sauerstoff
- Spaltung der Sauerstoffbindung
- Interaktion mit Elektronen-Transport-Coenzymen
- Insertion von Sauerstoff in das Substrat

Der genaue molekulare Mechanismus der Oxidationen durch Cytochrom P450-Enzyme wird immer noch kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, daß die katalytische Oxidation über ein kationisches Eisen-Sauerstoff Radikal [14-17] verläuft.

Im ersten Schritt des katalytischen Prozesses wird das Substrat an den fünffachkoordinierten dreiwertigen Eisenkomplex gebunden.

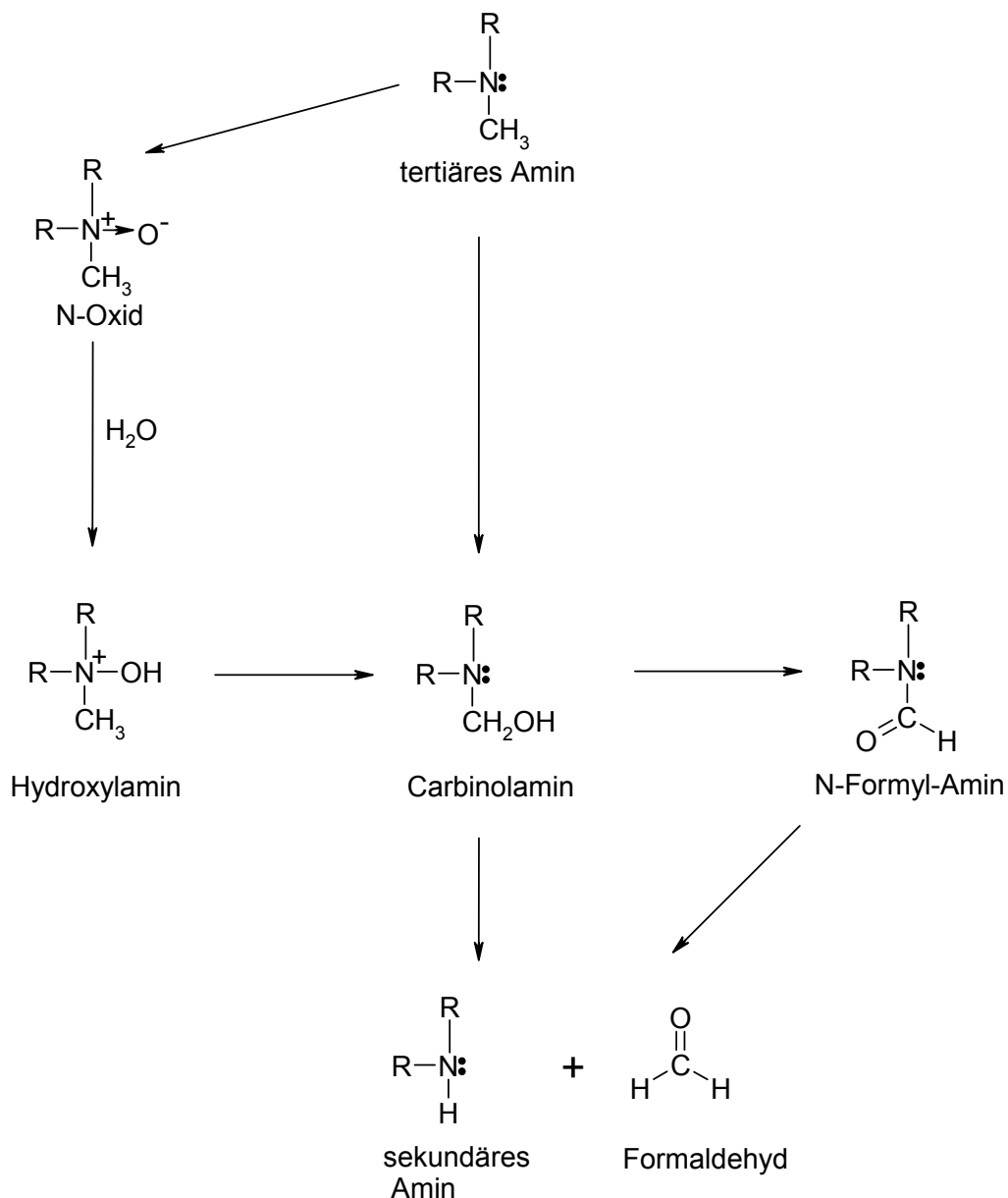
Im zweiten Schritt wird von der NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Reduktase ein Elektron auf den Komplex übertragen, wodurch das Eisen in seine zweiwertige Form überführt wird. Der reduzierte Komplex bindet molekularen Sauerstoff. Durch Protonentransfer und Übertragung eines weiteren Elektrons von der NADPH-abhängigen Reduktase auf den Komplex wird die Disauerstoffbindung gespalten und es entsteht ein aktivierter Enzymkomplex mit einem kationischen Radikal  $[O=Fe(III)-Por^+]$  (Por: Porphyrinrest). Dieser aktivierte Enzymkomplex nimmt eine Schlüsselstellung bei den meisten funktionalisierenden Oxidationsreaktionen der Cytochrom P450-Enzyme ein. Im dritten Schritt abstrahiert der aktivierte Enzymkomplex ein Proton aus dem Substrat. Diese H-Abstraktion tritt sowohl bei den wichtigsten N- und O-Dealkylierungsreaktionen [18, 19] sowie Hydroxylierungen des Substrats [20] auf. In der Folge führt der Transfer eines Hydroxyradikals vom Enzymkomplex zu einer Hydroxylierung des Substrats.

Die Demethylierung von tertiären Aminen hat beim Metabolismus von Arzneistoffen eine besondere Bedeutung, da viele dieser pharmazeutischen Verbindungen gebundenen Stickstoff enthalten, und wurde deswegen besonders untersucht [18]. Da es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoff Verapamil auch um ein tertiäres Amin handelt, wird auf die allgemeinen Mechanismen im folgenden eingegangen.

Die Demethylierung eines tertiären Amins, wie dem N, N-Dimethylanilin, führt im ersten Schritt über eine H-Abstraktion zu einem  $\alpha$ -Aminoradikal. Durch Hydroxytransfer vom aktivierten Enzymkomplex auf das Substrat wird ein Carbinolamin

gebildet, das in der Regel entweder direkt oder über ein N-Formyl-Derivat [21] zu einem sekundären Amin und Formaldehyd zerfällt. Ein anderer Mechanismus schlägt die Bildung des Carbinolamins aus dem Hydroxylamin eines N-Oxids vor, das anschließend wieder in ein sekundäres Amin und Formaldehyd zerfällt [22]. In Abb. 2 sind die unterschiedlichen möglichen Reaktionswege der N-Demethylierung von tertiären Aminen dargestellt.

**Abb. 2:** Mögliche Reaktionswege der N-Demethylierung von tertiären Aminen



R = Alkylrest

Die Isolierung dieser Zwischenstufen würde ein genaueres Verständnis des eigentlichen Mechanismus erleichtern. Leider sind aber Zwischenstufen wie die Carbinolamine chemisch relativ instabil und wurden bislang nur in Ausnahmefällen isoliert

[23-26].

Radikalische Zwischenstufen bei diesen Oxidations- und Reduktionsvorgängen sind oftmals für toxische Effekte verantwortlich. Bei Metabolismusstudien ist gerade diesen Biotoxifizierungsvorgängen besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

#### **1.3.1.2. Flavinmonooxygenase**

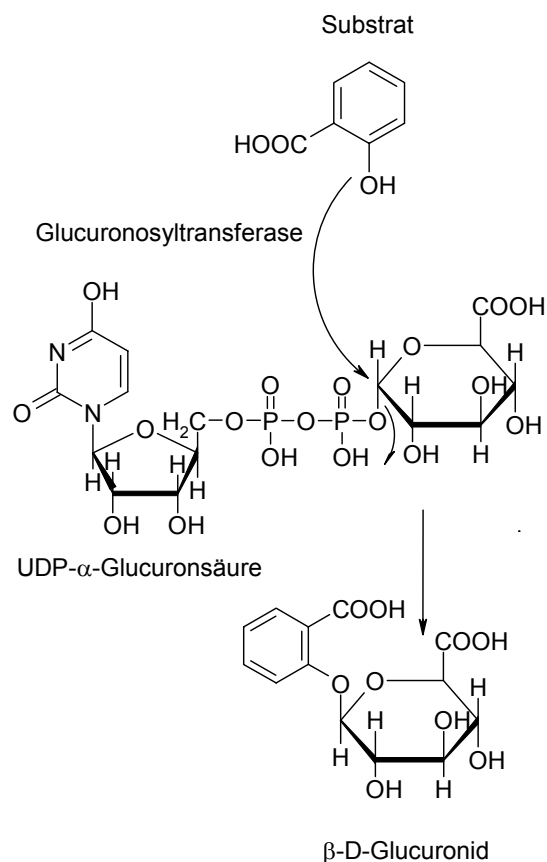
Neben den Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen gibt es auch eine Cytochrom-unabhängige Monooxygenase [1], die Flavinmonooxygenase. Sie wandelt sekundäre Amine in Hydroxylamine und tertiäre Amine in N-Oxide um.

#### **1.3.2. Phase-II-Reaktionen**

Um die Elimination zu erleichtern, werden die beschriebenen Phase-I-Metaboliten mit endogenen Molekülen konjugiert. Zu den häufigsten Konjugationsreaktionen zählen: Glucuronidierung, Sulfatierung, Glutathionkonjugation, Acetylierung, Methylierung und die Konjugation mit Glucose und Aminosäuren. Mit Ausnahme der Acetylierung, Methylierung und der Konjugation mit Glucose wird bei der Konjugationsreaktion eine saure Gruppe in das Molekül eingeführt, die die Hydrophilie entscheidend erhöht.

Die Glucuronidierung durch Glucuronosyltransferasen (auch als Glucuronyltransferasen bezeichnet) ist eine der wichtigsten Konjugationsreaktionen. Am stärksten werden diese Enzyme in der Leber exprimiert [27], aber sie wurden auch schon in der Niere [28], im Darm [27], der Lunge [29] und der Haut [30] nachgewiesen. Die Glucuronosyltransferasen liegen membrangebunden im endoplasmatischen Retikulum vor. Die Kopplungsreaktion eines Substrats mit der Glucuronsäure verläuft nur, wenn die Glucuronsäure in  $\alpha$ -Konfiguration an Uridindiphosphat (UDP) gebunden vorliegt [31]. Die Glucuronosyltransferasen übertragen von diesem aktivierten Komplex die Glucuronsäure auf das Akzeptormolekül. Die Verknüpfung erfolgt an der äquatorial gebundenen Hydroxylgruppe am C-1 der Glucuronsäure unter Inversion der Konfiguration, so daß immer  $\beta$ -D-Glucuronide gebildet werden (siehe Abb. 3). Wenn das Akzeptormolekül ein Phenol oder Alkohol ist, entsteht ein Ether-Glucuronid, erfolgt die Übertragung auf eine Carboxylgruppe, so entsteht ein Ester- oder Acylglucuronid. Mit Thiolen können S-Glucuronide und mit Aminen N-Glucuronide gebildet werden [32]. Dabei unterscheidet man je nach Substitution der Amine zwischen sekundären und tertiären Aminoglucuroniden und quartären Ammoniumglucuroniden [33, 34].

**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Glucuronidierung eines Substrats



Während die Bildung der sekundären und tertiären N-Glucuronide nur substanzabhängig ist, ist die Bildung quartärer Ammoniumverbindungen auch speziesabhängig [35]. Für tertiäre Amine wie die tricyclischen Antidepressiva und Antihistaminika wird die quartäre N-Glucuronidierung im allgemeinen nur beim Menschen und den Primaten beobachtet (ca. 30 Substanzen). Wenige Beispiele zeigen jedoch, daß sie auch in niederen Spezies wie Kaninchen und Ratten nachgewiesen wurden, darunter Amitryptilin [36] und Thioconazol [37, 38].

Seltener als die Bildung von Glucuroniden ist die Bildung von Glucosiden. In der Literatur sind ungefähr 12 Substanzen bekannt, die im Säugetierorganismus Glucoside bilden, die sowohl N- als auch O-gebunden vorliegen können [39]. Die N-gebundenen Glucoside werden bevorzugt aus primären und sekundären Aminen gebildet. Zu den N-gebundenen Glucosiden gehört das Glucosid des Pentobarbital [40].

Die Konjugate unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche chemische Stabilität. Die pH-Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse durch β-Glucuronidase von O-Ether-Glucuroniden liegen im schwach sauren Bereich bei pH 4.5-5, da die O-Ether-Atome für den enzymatischen Angriff protoniert vorliegen müssen [32].



Ester- oder Acylglucuronide sind aufgrund ihrer Struktur mit Esterverbindungen vergleichbar und wegen der Empfindlichkeit gegenüber nucleophilen Angriffen in neutralem bis basischem Milieu relativ instabil. Folglich erfahren Acylglucuronide in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert eine spontane Hydrolyse oder intramolekulare Acylumlagerung [41, 42].

Im allgemeinen sind die N-Glucuronide von primären und sekundären Aminen in sauren Lösungen sehr instabil [43]. Die quartären Ammoniumglucuronide, die aus tertiären Aminen entstehen, ähneln in ihrer Struktur Esterglucuroniden. Bei den tertiären N-Glucuroniden, z. B. von Tri- und Tetrazolen, gibt es unterschiedliche chemische Stabilitäten gegenüber Hydrolyse. So wird das Tetrazol-N-Glucuronid sowohl unter basischen als auch unter sauren Bedingungen hydrolysiert, während das Triazol-Glucuronid nur unter sauren Bedingungen hydrolysiert wird [44].

N-Glucoside sind unter sauren Bedingungen instabil, aber im basischen Milieu stabil. Der Konjugationsprozeß tritt vor allem in der Leber auf. Nach erfolgter Konjugation können diese Kopplungsprodukte aus der Leberzelle in die Gallenflüssigkeit übertreten und mit dieser dann wieder in den Darm gelangen und eliminiert werden. Die hydrophilen Kopplungsprodukte können das Darmepithel nicht überwinden, allerdings sind O-Glucuronide durch die  $\beta$ -Glucuronidasen der Darmbakterien wieder spaltbar, so daß der freiwerdende Wirkstoff wieder zurückresorbiert und erneut biotransformiert werden kann (enterohepatischer Kreislauf). Außer in die Gallenflüssigkeit können die Konjugate auch in das Blut übertreten. Die von der Leberzelle in das Blut abgesonderten Glucuronide werden in der Niere filtriert und aufgrund ihrer Hydrophilie mit dem Harn ausgeschieden.

Da die sauren Konjugate über diese Wege relativ schnell ausgeschieden werden, haben die Konjugationsreaktionen im allgemeinen eine Bioinaktivierungsfunktion.

In den letzten Jahren wurden mehrere biologisch aktive Phase-II-Metaboliten identifiziert, deren biologische Aktivität z. T. die der Ausgangssubstanz übersteigt. Hierzu zählt z. B. das Morphin-6-Glucuronid [45]. Weitere Beispiele sind die Retinoid-Glucuronide [46] (biologisch aktive Metaboliten des Vitamin A) oder die D-Ring-Glucuronide von Östrogenen [47]. Nebenreaktionen und organspezifische toxische Wirkungen wurden in der Vergangenheit vor allem über Acyl-Glucuronide beschrieben [48, 49]. Ferner können aus Phase-II-Metaboliten reaktive Stoffe entstehen, die durch irreversible Bindung an körpereigene Stoffe toxische Effekte hervorrufen [1].

#### **1.4. Inhalative Pharmakotherapie**

Viele Pharmaka verlieren durch den First-Pass-Effekt nach oraler Applikation ihre biologische Wirksamkeit und müssen in der Folge mehrfach täglich eingenommen werden, damit ein ausreichend hoher Plasmaspiegel erreicht wird. Eine intravenöse Langzeittherapie, bei der die Leber als First-Pass-Organ umgangen wird, ist in den meisten Fällen nicht durchführbar.

Ein neuartiges Konzept zur Lösung dieses Problems basiert auf der inhalativen Applikation von Arzneistoffen. Die Inhalation eines Aerosols erlaubt es, einen Wirkstoff auf die Bronchialschleimhaut und zu einem kleinen Teil auf die Membranen der Lungenbläschen (Alveolen) zu applizieren.

An den Alveolen findet der Gasaustausch statt. Die Oberfläche der Alveolen besteht im wesentlichen aus den alveolarepithelialen Typ I-Zellen (95 %) und Typ II-Zellen (5 %). Die Alveolen haben einen Durchmesser von etwa 0.2 mm und eine Gesamtoberfläche von ca. 80 m<sup>2</sup>, die von einem dichten Kapillarnetz umgeben ist [50]. Der Gasraum und das Blut sind nur durch eine etwa 1 µm dünne Gewebeschicht, der alveolokapillären Membran, getrennt [51]. Die große Austauschoberfläche und starke Durchblutung sowie die dünne Membranbarriere machen die inhalative Applikation für die systemische Applikation von Arzneistoffen interessant.

Die Effektivität der inhalativen Darreichungsform von Arzneistoffen ist von der Größe der bei der Zerstäubung entstehenden Teilchen und vom Zeitintervall zwischen Zerstäubung und Einatmung abhängig. Die Größe der Teilchen bestimmt die Geschwindigkeit, mit der sie vom Strom der eingeatmeten Luft mitgerissen werden und damit die Eindringtiefe in den Respirationstrakt: Teilchen mit einem Durchmesser > 100 µm schlagen sich im Mund- und Rachenraum nieder. Teilchen mit einem Durchmesser von 10-100 µm schlagen sich auf die das Epithel bedeckende Schleimschicht der Bronchien nieder und werden zum Teil mit dem Bronchialschleim in Richtung Kehlkopf transportiert. Teilchen, die einen Durchmesser < 2 µm besitzen, erreichen die Alveolen, werden aber wieder ausgeatmet, da sie sich nicht abscheiden.

Der Vorteil der pulmonalen Applikation besteht wie bei der intravenösen Gabe darin, daß die erste Passage durch die Leber und den Magen-Darm-Trakt umgangen wird und der Wirkstoff somit einem verringerten metabolischen Abbau unterliegt. Die pulmonale bzw. inhalative Applikation wurde schon erfolgreich als alternative

Applikation für das Immunsuppressivum Cyclosporin [52] und das Interferon  $\alpha$ -1-Antitrypsin eingesetzt [53]. Die beobachteten Plasmaspiegel nach inhalativer Applikation sind mit denen nach intravenöser Applikation vergleichbar [53], und somit könnte diese Applikationsform für die systemische Administration von bestimmten Arzneistoffen geeignet sein.

### **1.5. In vitro- und in vivo-Metabolismus**

Für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter werden die Plasma oder Organproben lebenden Tieren (in vivo) entnommen und zur späteren Analytik schockgefroren.

In-vivo-Versuche haben jedoch den Nachteil, daß man nicht gezielt die metabolische Kompetenz einzelner Zell- und Gewebeverbände untersuchen kann. Eine Kultivierung von explantiertem Zell- und Gewebematerial in in-vitro-Zellkulturen und Inkubation mit entsprechenden Arzneistoffen ermöglicht das Studium des gewebe-spezifischen Metabolismus dieser Wirkstoffe.

Mikrosomen aus entsprechenden Zielorganen, die die metabolisierenden Cytochrom P450-Monooxygenasen in hohen Mengen enthalten, sind ebenfalls für das Studium des organ- und gewebespezifischen Metabolismus geeignet.

Die Vielfalt der Cytochrom P450-Enzyme und die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies bedingen, daß für Metabolismusstudien verschiedene Spezies untersucht werden müssen, da sich die Spektren an gebildeten Metaboliten sehr stark zwischen den verschiedenen Spezies unterscheiden können. Im Tierversuch werden Ratten, Hunde und Affen für diese Studien eingesetzt. Weil Tierexperimente mit Affen und Hunden in der Öffentlichkeit stark kritisiert werden, sind Schweine in letzter Zeit auch aufgrund ihrer anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten mit dem Menschen als alternativer Ersatz in Tierversuchen attraktiver geworden.

## **1.6. Pharmakologie und Metabolismus des Verapamils**

### **1.6.1. Wirkung von Calciumantagonisten**

Das Herz versorgt durch seine Pumpfunktion den gesamten Organismus mit sauerstoffreichem Blut und nimmt daher im Herz-Kreislaufsystem eine herausragende Stellung ein.

Unter funktionellen Gesichtspunkten kann das menschliche Herz in zwei Teile, den rechten und den linken Teil, gegliedert werden, die jeweils aus einem kleinen Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel) bestehen. Die Ventrikel sind durch eine Scheidewand (Septum) voneinander getrennt. In den rechten Vorhof münden die großen Hohlvenen, in den linken Vorhof die Lungenvenen (siehe Abb. 4).

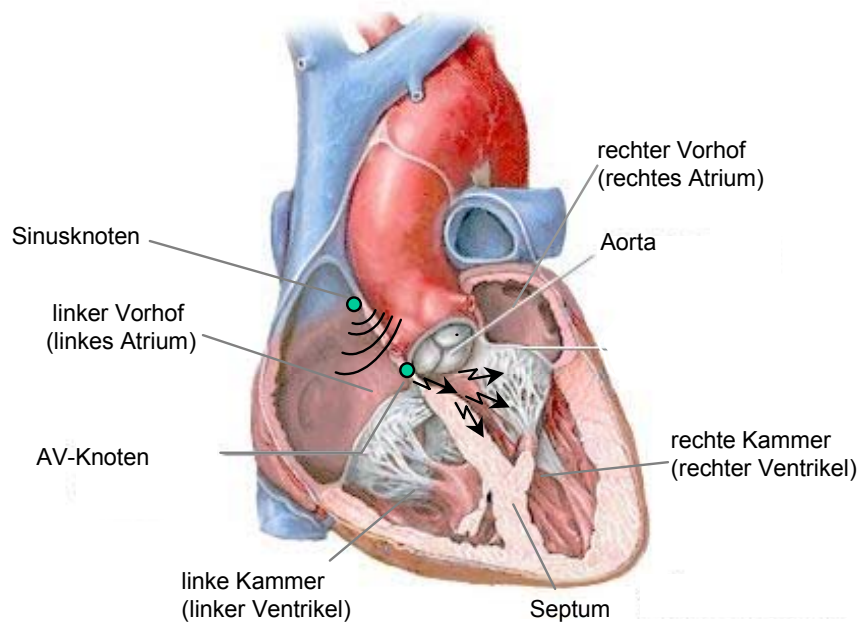
Das Herz erfüllt seine Pumpfunktion durch rhythmische Kontraktion und Erschlaffung. Die Kontraktion und Erschlaffung wird durch ein Erregungsbildungs- und Weiterleitungssystem gesteuert, das unabhängig vom Zentralnervensystem arbeitet (Automatie des Herzens).

Normalerweise werden die Erregungen im Sinusknoten, dem Schrittmacher des Herzens, der an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene in den rechten Vorhof liegt, gebildet und breiten sich im Herzgewebe über Vorhöfe, Atrioventrikular (AV)-Knoten und die sich anschließenden Teile des Reizleitungssystems auf die Herzkammern aus. Die Weiterleitung der Erregung erfolgt über die L-Typ-Calciumkanäle. Bei einer elektrischen Erregung von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sowie von glatten Muskelzellen fließen verschiedene Ionenströme, u. a. ein Calcium-einwärtsstrom.

In der Herzzelle beträgt die Zahl an freien Calciumionen im Vergleich zum Extrazellulärraum nur etwa ein Zehntausendstel. Sie kann durch Öffnung und Schließung von Calciumkanälen, intrazelluläre Freisetzung oder Bindung von Calciumionen sowie durch Calciumtransporter, die in der Zellmembran und in den intrazellulären Membranen vorkommen, verändert bzw. reguliert werden. Durch äußere Reize, die vom Sinus- und AV-Knoten ausgesandt werden, öffnen sich die Calciumkanäle vorübergehend, wodurch die intrazelluläre Calciumionenkonzentration kurzfristig ansteigt und Calciumionen an calciumionenbindende Proteine in der Zelle gebunden und diese so aktiviert werden. Die aktivierten Proteine lösen dann in der Zelle die eigentlichen Reaktionen aus, was die kontraktilen Filamente (Herzmuskelfasern) im Herzen veranlaßt, sich zu verkürzen (elektromechanische Kopplung). Die Höhe der erreichten Calciumionenkonzentration bestimmt das

Ausmaß der Kontraktion. Die erhöhte Calciumionenkonzentration wird durch Aufnahme von Calciumionen in intrazelluläre Speicher sowie durch die genannten Calciumionentransporter rasch wieder auf den ursprünglichen Wert erniedrigt [1].

**Abb. 4:** Darstellung des Aufbaus des Herzens und der Erregungsweiterleitung (aus <http://www.adam.com>)



Bei Erregungsleitungsstörungen ist die Ausbreitung der Depolarisation im Vorhof- oder im Kammerbereich beeinträchtigt, was zu Herzrhythmusstörungen führen kann. Die Bezeichnung Calciumantagonist (oder auch Calciumkanalblocker) wurde für Substanzen eingeführt, die den zellulären transmembranösen Calciumeinstrom durch den langsamen, spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal hemmen und die elektromechanische Kopplung durch Verringerung der Reizleitungsgeschwindigkeit herabsetzen. Dadurch wird die Herzarbeit und die Kontraktilität verringert (negativ inotrope Wirkung).

Sowohl aus chemischer als auch aus pharmakologischer Sicht stellen Calciumantagonisten keine einheitliche Substanzgruppe dar. Es werden drei Typen unterschieden: diejenigen vom Phenylalkylamin-Typ, zu dem das Verapamil (2,8-bis-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaoctanitril) gehört, der Benzothiazepin-Typ wie das Diltiazem (cis (+)-5-(2-Dimethylaminoethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-1,5-benzothiazepin-3-ylacetat) und der Typ mit 1,4-Dihydropyridinstruktur wie das Nifedipin (Dimethyl[1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitro-

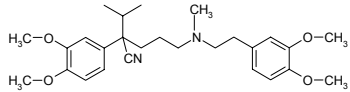
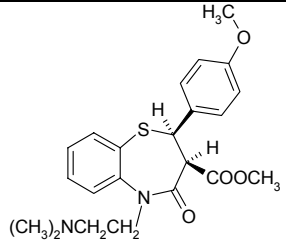
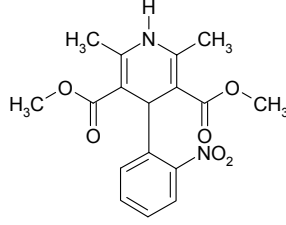
phenyl)-3,5-pyridin]-dicarboxylat].

Gemeinsam ist allen Substanzklassen, daß sie am Herzen die Aktivität der Calcium-abhängigen Myosin-ATPase verringern, wodurch der Umsatz an energiereichem Phosphat und gleichzeitig der Sauerstoffbedarf abnimmt. An der glatten Gefäß-muskulatur führen sie zu einer Erniedrigung des Gefäßmuskeltonus und damit zu einer Gefäßweitstellung (Vasodilatation). Die Gefäßweitstellung bewirkt eine Reduktion der Nachlast, wodurch das Herz indirekt zusätzlich entlastet wird.

Die Stoffgruppen unterscheiden sich bezüglich ihrer Wirkung am Herzen. Während die Calciumantagonisten Verapamil und Diltiazem bevorzugt auf die Erregungs-leitung am Herzen und direkt auf die Herzkontraktilität einwirken, wirkt Nifedipin vor allem an der Gefäßmuskulatur.

Substanzen wie Verapamil und Diltiazem werden deshalb gegen Herzrhythmus-störungen, Substanzen wie Nifedipin bevorzugt gegen Bluthochdruck (Hypertonie) verabreicht. In Tab.2 sind die Strukturen der wichtigsten Calciumantagonisten sowie bekannte Handelspräparate, die den Wirkstoff enthalten, und deren Wirkung aufgelistet [54].

**Tab. 2:** Chemische Struktur und einige kardiovaskuläre Effekte ausgewählter Calciumantagonisten. Die relativen Effekte reichen von keinem Effekt (0) bis zu sehr starkem Effekt (5)

Wirkstoff	Handelspräparat	Struktur	A	B	C	D
Verapamil	Isoptin <sup>®</sup> , Verahexal <sup>®</sup>		4	4	5	5
Diltiazem	Diltiazem <sup>®</sup>		3	2	5	4
Nifedipin	Adalat <sup>®</sup>		5	1	1	0

**Effekte:** A: Gefäßerweiternde Wirkung

C: Unterdrückung der Sinuserregung

B: Verminderung der Herzkontraktilität

D: Unterdrückung der Erregungsweiterleitung in die Herzkammern

### 1.6.2. Nebenwirkungen von Calciumantagonisten

Calciumantagonisten wirken nicht nur auf die Gefäßmuskulatur des Herzens, sondern auch auf die des Gastrointestinaltraktes, was zu einer Reihe von Nebenwirkungen führen kann. Als Nebenreaktionen treten neben gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit und Obstipation (Verstopfung), Kopfschmerzen, Herzklopfen und sogar Herzinsuffizienz auf. Gerade bei älteren Menschen beobachtet man eine Häufung von Nebenreaktionen [55]. Die einzelnen beobachteten Nebenreaktionen für die unterschiedlichen Calciumantagonisten sind in Tab. 3 aufgelistet. Neben diesen leichteren Beschwerden wurden auch schwerwiegendere Symptome nach der Einnahme von Calciumantagonisten beschrieben. Langzeitstudien mit Verapamil lassen einen Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Einnahme von Calciumantagonisten und dem Auftreten von bösartigen Erkrankungen wie Darm- und Brustkrebs vermuten [56-58].

**Tab. 3:** Nebenreaktionen der Calciumantagonisten

Effekt	Diltiazem	Nifedipin	Verapamil
<b>Kardiovaskuläres System</b>			
Niedriger Blutdruck (Hypotonie)	+	+	+
Hautrötung mit Hitzegefühl (Flushing)	-	++	+
Kopfschmerzen	+	++	+
Herzklopfen/Brustschmerzen (Palpitation)	+	+	+
Störung der Erregungsleitung im Herzen	+	-	-
Herzinsuffizienz	-	+	+
Verlangsamung des Herzschlages (Bradykardie)	+	-	++
<b>Gastrointestinaltrakt</b>			
Übelkeit	+	-	+
Verstopfung (Obstipation)	(+)	-	+
Durchfall (Diarrhoe)	-	+	-

Die molekularen Mechanismen, die diese Nebenreaktion verursachen, sind noch unbekannt, doch könnte eine Biotransformation von Calciumantagonisten im Herzgewebe für die teilweise beobachtete therapeutische Ineffizienz und das Auftreten dieser Nebenwirkungen verantwortlich sein.

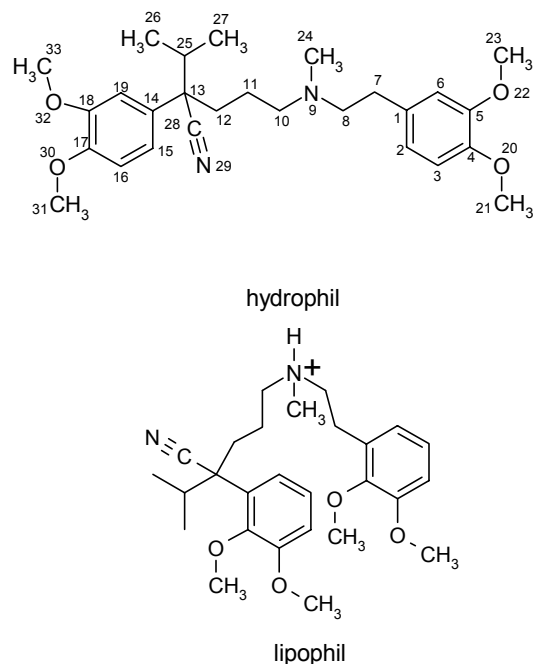
### 1.6.3. Struktur- Wirkungsbeziehungen des Verapamils

Verapamil, ein synthetisches Papaverin-Derivat, ist ein Calciumantagonisten, der schon seit vielen Jahren gegen Herzrhythmusstörungen und Bluthochdruck eingesetzt wird.

Für die Wirkung des Verapamils auf die Calciumkanäle ist die molekulare Flexibilität in der Alkylkette von großer Bedeutung. NMR-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß sich das Verapamilmolekül in Lösung faltet, um mit Calciumionen einen Komplex auszubilden [59, 60]. Da der Stickstoff bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegt ( $pK_s = 9.2$ ), besitzt das Molekül ein polares, hydrophiles Ende und ein apolares, lipophiles Ende (Ringsystem). Strukturanaloge Verbindungen, bei denen anstatt der Alkylkette ein Cyclohexan- oder Piperidinring eingebettet ist, besitzen nicht mehr die molekulare Flexibilität und weisen eine um den Faktor 100 geringere Aktivität auf [61].

Der N-Methylgruppe kommt eine herausragende Rolle bei der pharmakologischen Wirkung zu, da ein Austausch durch eine Isopropylgruppe zu einer starken Wirksamkeitsminderung führt [62]. Die molekulare Bedeutung der N-Methylgruppe kann auf einem sterischen Effekt beruhen, d.h. die voluminösere Isopropylgruppe paßt sich räumlich nicht dem Wechselwirkungspartner ausreichend an. In Abb. 5 ist die Struktur des Verapamils und die mögliche Konfiguration in Lösung dargestellt.

**Abb. 5:** Struktur des Verapamils und mögliche Konfiguration in wäßriger Lösung





#### 1.6.4. Metabolismus des Verapamils

Die empfehlende orale Tagesdosis von Verapamil bei koronaren Herzerkrankungen liegt zwischen 240 und 480 mg. Verapamil wird in racemischer Form verabreicht.

Das S-Enantiomer ist ca. 6 mal aktiver, wird 20 mal schneller biotransformiert [63] und stärker an humanem Albumin im Plasma gebunden als das R-Enantiomer [64, 65].

Nach oraler Applikation wird Verapamil nahezu quantitativ resorbiert und unterliegt einem starken First-Pass-Effekt, die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe beträgt nur 10-20 % [63]. Die Ausscheidung des Verapamils und seinen Metaboliten erfolgt überwiegend renal und biliär, wobei die Plasmahalbwertszeit bei 3-4 h liegt. Die Plasma-eiweißbindung beträgt 98 %.

Nach Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt gelangt der Wirkstoff über die Pfortader in die Leber, wo er von Enzymen metabolisiert wird. Dieser Metabolismus des Verapamils in der Leber ist weitgehend erforscht. Die wichtigsten Arbeiten werden im folgenden Kapitel vorgestellt:

In den grundlegenden Arbeiten erfolgte die Strukturaufklärung der Metaboliten mit Hilfe der GC-MS mit Derivatisierung. Die einzelnen Analysemethoden werden in Kapitel 2 diskutiert. Die Strukturen und Bezeichnungen der identifizierten Metaboliten werden in Abb. 6 und Tab. 4 vorgestellt.

Mc Ilhenny hat <sup>14</sup>C-markiertes Verapamil an Ratten und Hunde verfüttert. Die Metaboliten wurden aus Urin und Faeces isoliert und bestimmt [66].

Eichelbaum et al. untersuchten den Metabolismus von <sup>14</sup>C-markiertem Verapamil im Menschen. Auch hier wurden die Metaboliten im Urin charakterisiert [67].

Nelson et al. und Nelson und Olsen konzentrierten sich auf die mechanistischen Grundlagen der Metabolismusreaktionen. Sie untersuchten die N- und O-Dealkylierung von Verapamil in Mikrosomen aus Ratten- und humaner Leber [68, 69].

In allen Studien werden die N-Demethylierung, die N-Dealkylierung und die O-Demethylierung als Hauptmetabolismusweg des Verapamils beschrieben.

Als Hauptmetabolit tritt im humanen Urin der dealkylierte Metabolit D-617<sup>1</sup> (M3<sup>2</sup>) auf, während im Plasma Norverapamil als Hauptmetabolit zu finden ist. Daneben treten die O-Demethylverapamillsomeren D-702 (M7) und D-703 (M9), sowie die doppelt

---

<sup>1</sup> Knoll-Nomenklatur der Hauptmetaboliten

<sup>2</sup> eigene Bezeichnung der identifizierten Metaboliten (Kapitel 4)

demethylierten Metaboliten D-715 (M5) und M11 auf. In geringeren Konzentrationen wird auch der Metabolit D-620 (M1) beobachtet. Mechanistische Studien haben gezeigt, daß an der Bildung dieser Hauptmetaboliten im Menschen vor allem die CYP-Isoformen 1A1, 1A2, 3A4, 3A5 und 2C8 beteiligt sind [70, 71]. Diese Enzyme bestimmen maßgeblich die N-Demethylierungs- und Dealkylierungsreaktionen, sowie die O-Demethylierung.

Die O-Demethylierung der Methoxygruppen in Rattenlebermikrosomen tritt mit abnehmender Geschwindigkeit an den Positionen C-4 > C-17 > C-18 > C-5 auf [69]. Im Urin wurden außerdem noch mehrere Oxidationsprodukte des Verapamils identifiziert, unter anderem die N-Formyl-Derivate (M33) und (M34). In späteren Studien wurde jedoch festgestellt, daß es sich bei den Formyl-Derivaten um Artefakte handelte [68].

Das N-Oxid des Verapamils wird durch die Flavinmonooxygenase gebildet, ist aber in wäßriger Lösung nicht stabil und zerfällt via Cope-Eliminierung unter anderem zu 3,4-Dimethoxystyrol, das dann aus Mikrosomenlösungen nachgewiesen werden kann [72]. Das 3,4-Dimethoxystyrol (M39) kann in der Folge bis über das 3,4-Dimethoxyphenylethanol (M40) zur 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure (DMPA, M41) oxidiert werden. Diese Metaboliten werden allerdings nur in Spuren im Vergleich zu den beschriebenen Hauptmetaboliten gebildet [67].

Es ist bekannt, daß die meisten dieser Metaboliten als Phase-II-Konjugate renal und biliär ausgeschieden werden, allerdings wurde keines der gebildeten Glucuronide bislang direkt nachgewiesen. Mutlib und Nelson synthetisierten das Norverapamil-glucuronid nach und identifizierten es nach Derivatisierung in der Gallenflüssigkeit [73].

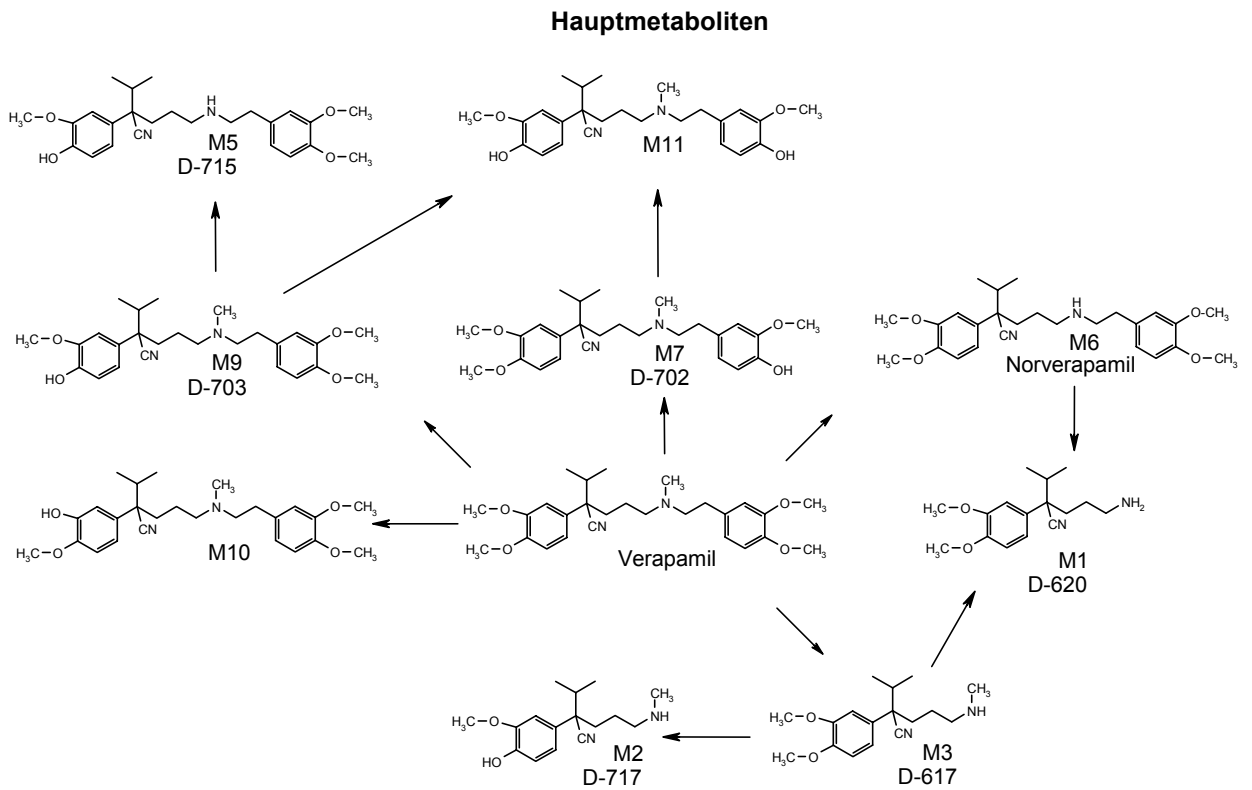
Die meisten der gebildeten Metaboliten sind biologisch inaktiv [74], nur das gebildete Norverapamil besitzt etwa 20 % der biologischen Aktivität der Muttersubstanz [75].

**Tab. 4:** Identifizierte Phase-I-Metaboliten des Verapamils

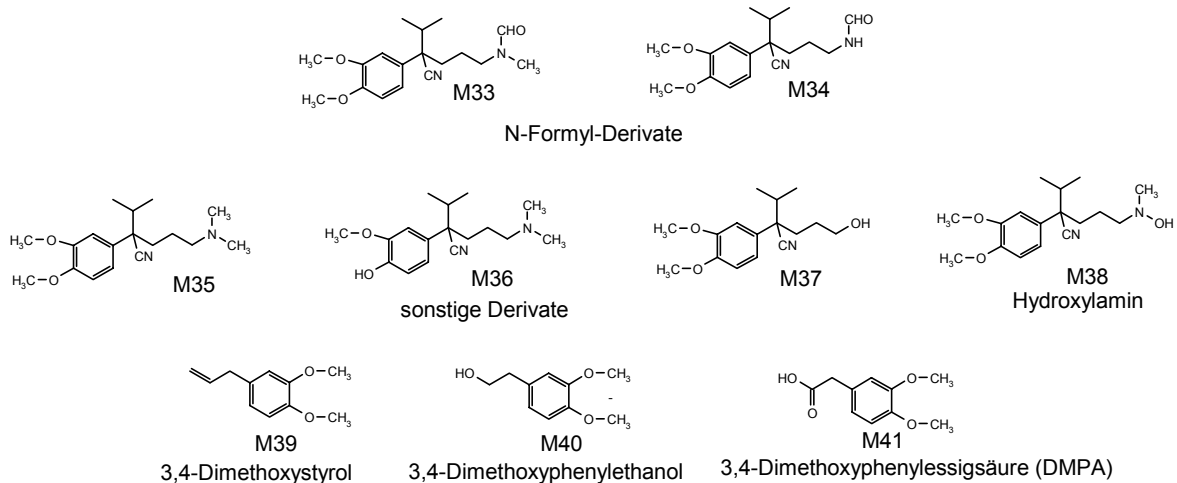
Nr.	Knoll-Nomenklatur	IUPAC-Nomenklatur	Anteil im Urin in % [67]
	Verapamil	(2,8-bis-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril)	3-4
M6	Norverapamil	2,8-bis-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-isopropyl-6-azaocitanitril	6
M9	D-703	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril	7
M7	D-702	2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-8-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril	6
M10	-	2-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril	-
M3	D-617	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-amino-2-isopropylvaleronitril	22
M2	D-717	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)- 5-methylamino-2-isopropylvaleronitril	3-4
M1	D-620	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-methylamino-2-isopropylvaleronitril	3-4
M5	D-715	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)- 8-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropyl-6-azaocitanitril	6
M11	-	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-8-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril	-
M33	-	5-(N-Formyl-N-methylamino)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril	<<1
M34	-	5-N-Formyl-amino)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril	<<1
M35	-	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-dimethylamino-2-isopropylvaleronitril	<<1
M36	-	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-dimethylamino-2-isopropylvaleronitril	<<1
M37	-	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-2-isopropylvaleronitril	-
M38	-	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-5-methylamino-2-isopropylvaleronitril	-
M39	-	3,4-Dimethoxystyrol	-
M40	-	3,4-Dimethoxyphenylethan-1-ol	<<1
M41	DMPA	3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure	<<1

Die starke metabolische Inaktivierung des Verapamils hat dazu geführt, daß strukturähnliche Verbindungen entwickelt wurden, die bessere pharmakokinetische Eigenschaften besitzen. Das Gallopamil [2-(3,4,5-Trimethoxy-phenyl)-8-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-isopropyl-6-azaocitanitril] unterscheidet sich vom Verapamil nur durch eine zusätzliche Methoxygruppe an C-16. Obwohl es auch als Razemat verabreicht und die analogen Metaboliten zum Verapamil gebildet werden [76-78], ist der Metabolismus im Vergleich zum Verapamil nicht stereoselektiv [79].

**Abb. 6: Identifizierte Phase-I-Metaboliten des Verapamils**



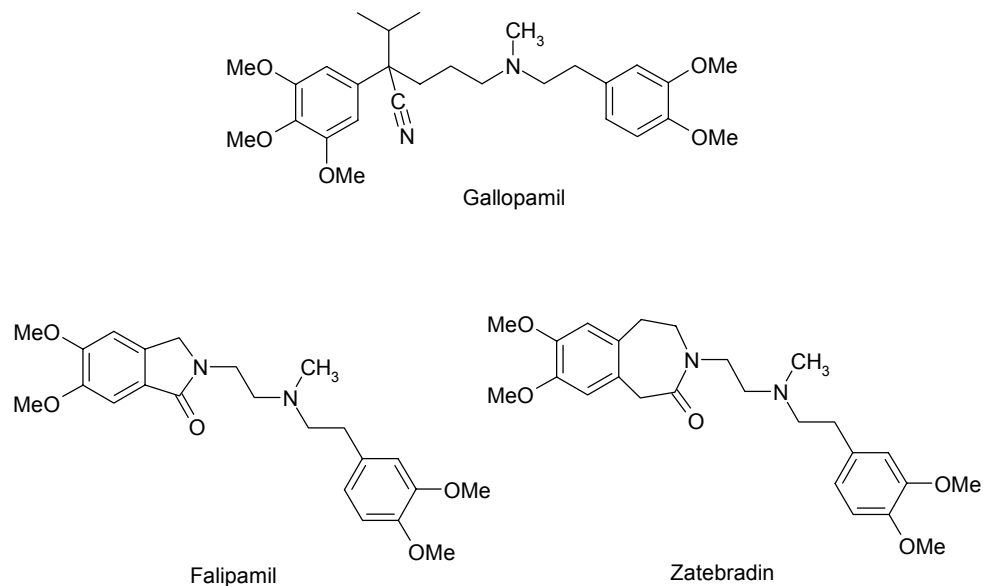
**in sehr geringen Konzentrationen gebildete Metaboliten**



Bei den strukturverwandten Verbindungen Falipamil (2-[3-[3-(3,4-Dimethoxyphenethylmethylamino)propyl]-5,6-dimethoxyphthalimidin) und Zatebradin (1,3,4,5-[Tetrahydro-7,8-dimethoxy-3-[3-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]methylamino]propyl]-2H-3-benzazepin-2-on) wurde die  $\alpha$ -Isopropylacetonitril-Einheit im Molekül durch einen stickstoffhaltigen Fünf- bzw. Siebenringheterozyklus ersetzt [80].

Beide Verbindungen besitzen so im Gegensatz zum Verapamil kein Stereozentrum mehr. Der Metabolismus des Zatebradins unterscheidet sich von dem des Verapamils, als daß im Urin und Plasma DMPA als Hautmetabolit gebildet wird. Das dealkylierte Analogon zum D-617 des Verapamils wird nur in geringen Konzentrationen gebildet. Ansonsten treten auch die zum Norverapamil und zu den O-demethylierten Metaboliten des Verapamils analogen Metaboliten auf, die im Urin als Phase-II-Konjugate ausgeschieden werden. Die Bioverfügbarkeiten des Falipamils und des Zatebradins liegen mit Werten von 29 bis zu 80 % deutlich über dem des Verapamils (ca.10-20 %) und zeigen, daß diese Verbindungen einen deutlich geringeren First-Pass-Effekt (durch den die Bioverfügbarkeit maßgeblich bestimmt wird) als Verapamil erfahren [81, 82]. Die Strukturen des Gallopamil, des Falipamil und des Zatebradin, sind in Abb. 7 dargestellt.

**Abb. 7:** Strukturverwandte Calciumantagonisten vom Phenylalkylamin-Typ



## 1.7. Ziel der Arbeit

Der Calciumantagonisten Verapamil wird im Körper stark metabolisiert. Der starke Metabolismus nach oraler Gabe führt bei Verapamil zu einer pharmakologischen Inaktivierung. Die beschriebenen Nebenwirkungen des Verapamils und die teilweise beobachtete therapeutische Ineffizienz würden sich durch eine metabolische Inaktivierung im Zielorgan erklären lassen.

Deshalb soll im Rahmen dieser Dissertation zunächst der gewebespezifische Metabolismus des Verapamils in in-vitro Zellkulturen und Mikrosomenlösungen der Ratte untersucht werden. Ein Schwerpunkt liegt hierbei auf dem Studium des Metabolismus im Herz und Gefäßsystem, da über den Metabolismus im Zielorgan noch nichts bekannt ist. Es wird aber auch der Metabolismus in Leberzellkulturen und Lebermikrosomen herangezogen, um vor allem die Phase-II-Konjugate des Verapamils, über die bislang noch sehr wenig bekannt ist, zu charakterisieren. Um Rückschlüsse auf die Wirkung des Medikamentes im Menschen ziehen zu können, wird der Metabolismus anschließend auch in humanen Herzmikrosomenlösungen, in Zellkulturüberständen humaner Hepatozyten und humanem Urin untersucht.

Desweiteren soll in einer Studie geklärt werden, inwieweit eine inhalative Applikation von Verapamil als Alternative zur oralen Applikation zu einer Verminderung der metabolischen Inaktivierung und damit zu einer höheren systemischen Bioverfügbarkeit führt. Hierfür wird der Metabolismus in Zellkulturen aus alveolarepithelialen Typ II-Zellen<sup>3</sup> und mikrosomalen Membranen der Lunge von Ratte und Schwein untersucht. Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter für unterschiedliche Spezies werden die Pharmakokinetiken von Verapamil und seinen Metaboliten aus dem Plasma des Schweines und des Affen sowie aus dem Plasma und Lungengewebe der Ratte bestimmt.

Zur Durchführung dieser Metabolismusuntersuchungen sind neue Analysemethoden zu entwickeln. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Entwicklung von selektiveren und automatisierbaren Methoden, die eine schnellere Analyse und einen höheren Probendurchsatz ermöglichen. Im Rahmen der Dissertation soll getestet werden, inwieweit durch Integration der HPLC in die Probenvorbereitung die Analysenzeit verkürzt werden kann. Hierfür wird zum einen die HPLC durch Säulenschaltung mit

---

<sup>3</sup> Die Gasaustauschoberfläche der Alveolen besteht im wesentlichen aus zwei Epithelzellarten: den alveolarepithelialen Typ I- und Typ II-Zellen. Die Typ II-Zellen sind metabolisch aktiv [83].

einem "Restricted Access Material" (RAM) gekoppelt. Desweiteren soll getestet werden, inwieweit die in-tube SPME als automatisierte Methode routinemäßig für Metabolismusuntersuchungen einsetzbar ist.

Relativ neue Extraktionsmethoden wie die "Matrix Solid Phase Dispersion" (MSPD) sollen auf ihrer Anwendbarkeit im Bereich von Metabolismusstudien zur Extraktion von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten aus Gewebe getestet werden.

Die meisten Extraktionsverfahren, die in der Bioanalytik bislang eingesetzt werden, besitzen eine geringe Selektivität bezogen auf den Targetanalyten. Deshalb wird im Rahmen dieser Dissertation weiterhin überprüft, inwieweit die Selektivität der Extraktion von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten aus biologischem Material durch Verwendung von molekular geprägten Adsorbentien (MIP) gesteigert werden kann.

Die Strukturaufklärung der Metaboliten soll mit der HPLC-MS<sup>n</sup>-Technik und ergänzend auch mit der HPLC-NMR-Analytik durchgeführt werden.

## **2. Analytik von Arzneistoffen und ihren Metaboliten aus biologischem Material**

Die Bestimmung von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten aus biologischen Materialien hat in vielen Bereichen eine hohe Bedeutung. So muß der Metabolismus aller Pharmaka vor der Zulassung möglichst genau untersucht werden, um eventuelle Nebenwirkungen, die auf diese Metaboliten zurückzuführen sind, auszuschließen. Besonders für die Entwicklung von Medikamenten müssen die Konzentrationen dieser Wirkstoffe und ihrer Metaboliten im Blut, Plasma oder Serum, aber auch die Konzentrationen an freiem, ungebundenen Arzneistoff in den verschiedenen Organen wie Herz, Leber und Lunge untersucht werden. Außerdem sind Untersuchungen an einzelnen Zellverbänden und auch in verschiedenen Spezies notwendig, um überhaupt Aufschluß über Metabolismus und Wirkung des Medikamentes zu erhalten. Es sind also viele unterschiedliche Matrices zu untersuchen, aus denen der Analyt isoliert und nachgewiesen werden soll, weshalb der Probenvorbereitung in der Bioanalytik eine Schlüsselstellung zukommt. Nach Abtrennung der Analyten von der Matrix müssen diese zuerst getrennt und danach eindeutig identifiziert werden. Für die Trennung eignen sich besonders chromatographische Verfahren wie die HPLC oder die GC. Da die meisten Arzneistoffmetaboliten (wie z. B. Phase-II-Konjugate) polar und nicht verdampfbar sind, eignet sich besonders die HPLC für die Trennung, da die Substanzen nicht derivatisiert werden müssen, sondern direkt chromatographiert werden können. Für die Detektion der Substanzen gibt es mehrere Möglichkeiten, wie z. B. UV- oder Fluoreszenzdetektion. Diese Verfahren haben aber den Nachteil, daß sie bei unbekanntem Substanzen keinen Beitrag zur Strukturaufklärung leisten und wenig spezifisch sind. Für die Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Substanzen sind vor allem die Massenspektrometrie und die NMR-Spektroskopie geeignet, da sie die meisten Strukturinformationen liefern. Der qualitative Nachweis dieser Arzneistoffe und ihrer Metaboliten ist meist nicht ausreichend, da bei einigen Medikamenten der Unterschied zwischen der minimal wirksamen Dosis und einer toxischen Konzentration relativ klein ist. Die eingesetzten analytischen Methoden müssen es also erlauben, diese Stoffe mit ausreichender Präzision zu quantifizieren. An die analytischen Verfahren werden folglich sehr hohe Anforderungen gestellt: Die Analysenzeit muß relativ kurz sein, damit eine große Zahl von unterschiedlichen Proben mit ausreichender Präzision und Selektivität analysiert werden kann.



Desweiteren sollen die Kosten für die Verfahren möglichst gering sein. Dieser Kosten- und Zeitdruck hat dazu geführt, daß viele dieser Methoden miteinander gekoppelt wurden. Die HPLC-MS<sup>n</sup> sowie die HPLC-NMR haben sich gerade in der Metabolismusforschung in den letzten Jahren etabliert. Die HPLC-integrierte Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit modifizierten SPE-Materialien oder die in-tube SPME haben sich in den meisten Laboratorien noch nicht durchgesetzt. Oft werden noch traditionelle Extraktionsverfahren, wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die nicht automatisierte offline Festphasenextraktion (SPE) für die Probenvorbereitung bevorzugt eingesetzt.

Nachfolgend wird zuerst auf verschiedene Verfahren der Probenvorbereitung eingegangen. Dabei werden traditionelle Methoden wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) oder die Festphasenextraktion (SPE) kurz behandelt, relative neue Methoden wie die MSPD oder die MISPE, sowie die HPLC integrierte Festphasenextraktion werden ausführlicher beschrieben. Es werden weiterhin einige Besonderheiten zur HPLC-Trennung erläutert und schließlich wird auf die Strukturaufklärung mit der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie eingegangen.

### **2.1. Probenvorbereitung von biologischem Material**

Für die Analyse von Substanzen aus biologischem Material werden an die Probenvorbereitung eine ganze Reihe von Anforderungen gestellt. Die zu analysierenden Substanzen, wie Arzneistoffmetaboliten, müssen von der biologischen Matrix (Blut, Plasma, Zellkulturüberstand, Gewebe) abgetrennt (fraktioniert) werden. Meistens enthalten diese Matrices noch diverse andere Substanzen, wie Proteine oder endogene Stoffwechselprodukte, so daß die Abtrennungsmethode für die Analyten ein Höchstmaß an Selektivität gewähren sollte. Erfolgt im Anschluß eine Chromatographie, müssen die Proteine vorher gefällt und abgetrennt werden. Bei der Untersuchung von Arzneistoffmetaboliten muß zusätzlich entschieden werden, ob die Metaboliten als Phase-II-Konjugat direkt oder in unkonjugierter Form (Phase-I-Metabolit) nachgewiesen werden sollen. Im letzten Fall ist zusätzlich eine enzymatische Spaltung durchzuführen.

Da Analyten wie Arzneistoffmetaboliten oft nur in geringen Konzentrationen im biologischen Material vorhanden sind, ist ein Aufkonzentrierungsschritt notwendig, damit die notwendige Empfindlichkeit für das jeweilige Nachweisverfahren erzielt wird. Gerade für die Meßempfindlichkeit ist die Abtrennung von Matrixbestandteilen

von Bedeutung, da diese Matrixbestandteile die jeweiligen Nachweisgrenzen des Verfahrens stark beeinflussen.

Im folgenden werden die wichtigsten etablierten und neuen Extraktions- und Anreicherungsmethoden zusammengestellt. Über die Methoden und Applikationen wurden eine Reihe von Übersichtsartikeln publiziert.

Es soll daher in diesem Kapitel nicht um eine detaillierte Behandlung der möglichen Applikationen gehen, als vielmehr um eine Diskussion der Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden in Hinblick auf Selektivität der Analytabtrennung, Anreicherungs-effekt, Zeitaufwand und Durchführung, Verbrauch organischer Lösemittel, Automatisierbarkeit und Möglichkeit der online-Kopplung.

### **2.1.1. Offline-Verfahren**

Im folgenden werden Methoden vorgestellt, die als separater Probenvorbereitungsschritt durchgeführt werden. Zum Teil können sie auch automatisiert werden.

#### **2.1.1.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion**

Die traditionellste und sicherlich die am einfachsten durchzuführende Methode der Probenvorbereitung ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid-Liquid Extraction: LLE) der biologischen Proben mit Lösemitteln wie Hexan, Diethylether oder Methylencchlorid, die sowohl für unpolare als auch für mäßig polare Analyten geeignet ist.

Bei der LLE wird die zu untersuchende Probe mit dem Lösemittel versetzt und kräftig gerührt oder geschüttelt, so daß die Analyten gemäß ihres Verteilungsgleichgewichtes in die organische Phase übergehen. Diese Phase wird abgetrennt und auf ein kleines Volumen eingeeengt, von dem wiederum nur ein Bruchteil in das Analysengerät gelangt.

Die Methode ist sehr effizient, aber auch sehr unselektiv, da auch störende Matrixbestandteile extrahiert werden. Nachteilig ist, daß es bei der Extraktion zur Emulsionsbildung kommen kann, welche die Phasentrennung erschwert. Auch können zum Beispiel Phase-II-Konjugate von Metaboliten, die sehr gut wasserlöslich sind, nur schwer selektiv mit der organischen Phase abgetrennt werden. Hier erfordert es meist die Bildung von Ionenpaaren durch den Zusatz von organischen Ammoniumsalzen mit langen Alkylketten, die relativ unpolare Komplexe mit den polaren Phase-II-Konjugaten bilden und so in die organische Phase mitextrahiert werden können (Ionenpaar-Extraktion).

Darüberhinaus erfordert diese Technik große Mengen organischer, z. T. brennbarer Lösemittel, die gesundheits- und umweltschädlich sind und nach der Anwendung gesondert entsorgt werden müssen.

Die Automation der LLE ist sehr aufwendig. Kürzlich ist ein Übersichtsartikel erschienen, die sich mit der Extraktion von Arzneistoffen aus biologischen Proben beschäftigt [84].

#### **2.1.1.2. Festphasenextraktion (SPE)**

Bei der Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction: SPE) leitet man ein definiertes Volumen der Probe durch eine Kartusche oder über eine Membran, die mit einem Adsorptionsmaterial gefüllt bzw. beschichtet ist. Die Analyten werden adsorbiert und somit von der Matrix abgetrennt, anschließend mit geeigneten Lösemitteln vom Sorbens eluiert und durch Abblasen des Lösemittels mit Stickstoff oder Helium in der organischen Phase angereichert. Eine Vielzahl von Adsorbensmaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften ist kommerziell erhältlich [85]. Durch die Auswahl geeigneter Sorbentien lassen sich bestimmte Analytklassen selektiv anreichern [86]. Die SPE ist auch für polare Verbindungen geeignet. So können Phase-II-Konjugate von Metaboliten zum Beispiel auf polaren RP8- oder RP4-Phasen (Reversed Phase: RP) angereichert werden. Empfindlichkeitssteigerungen sind sehr leicht möglich, indem das über die Kartusche gegebene Probenvolumen vergrößert wird.

Bei der SPE sind in der Regel folgende Schritte durchzuführen: Probenvorbereitung (Fällung der Proteine aus der biologischen Matrix, Einstellung des pH-Wertes), Konditionieren der SPE-Säule, Probenaufgabe, Waschen und Trocknen der Säule und Elution der Analyten. Bei dieser Technik ist der Verbrauch an organischen Lösemitteln im Vergleich zur LLE drastisch reduziert. Dieser Aspekt ist nicht nur aus ökologischen Gründen wichtig, sondern vermindert entsprechend die hohen Kosten, die bei der Entsorgung organischer Lösemittel anfallen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Bildung von Emulsionen ausgeschlossen wird.

Die Probenvorbereitung mittels SPE ist zeitaufwendig, nicht zuletzt durch das Abblasen des Lösemittels zum Aufkonzentrieren der Analyten. Der hierdurch gewonnen Anreicherungsfaktor geht teilweise wieder verloren, da nur ein Bruchteil des Extraktes in das Analysengerät injiziert wird (z. B. 200 µl org. Extrakt, 20 µl Injektion).

Ein Vorteil des Verfahrens ist, daß der Probendurchsatz durch paralleles Extrahieren mehrerer Proben erhöht werden kann. Auf einer SPE-Vorrichtung können je nach Bauart 10 bis 20 Proben gleichzeitig extrahiert werden. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die leichte Automatisierbarkeit der Methode. Die Integration dieser Technik in Analysensysteme, wie zum Beispiel HPLC und HPLC-MS, ist daher sinnvoll und wurde ausführlich beschrieben [86]. Meistens sind diese Methoden jedoch auf den Nachweis der Arzneistoffe beschränkt und nicht für den Nachweis der Arzneistoffmetaboliten entwickelt worden. Auch müssen zumindest die Proteine aus den biologischen Flüssigkeiten abgetrennt werden, bevor die Analyten auf den gängigen SPE-Phasen angereichert werden können.

Ein großer Nachteil des Verfahrens ist die Gefahr der Überladung der Säule, wodurch es zu einem frühen Durchbruch verschiedener Analyten kommen kann. Dies ist normalerweise dann der Fall, wenn Proben mit z. T. sehr hohen Analytkonzentrationen zu bestimmen sind. Bei der Analytik von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten ist dies allerdings seltener gegeben, da sie im allgemeinen nur in geringen Konzentrationen in der Probe vorliegen. Hier spielen vor allem Verdrängungseffekte eine Rolle, die durch Verbindungen mit hoher Affinität zum Sorbens auftreten: biologische Flüssigkeiten wie Urin, Plasma und Zellkulturmedium enthalten eine Vielzahl von Substanzen, die die freien Bindungsstellen im Sorbens belegen können. Sind die Bindungsstellen alle belegt, können die Analytmoleküle nicht weiter retiniert werden und brechen durch. Darüber hinaus kann es innerhalb des Packungsmaterials zu einer Kanalbildung kommen, wodurch die Kapazität der Säule reduziert wird. Außerdem können Partikel aus Plasma oder Urinproben leicht die feinen Poren verstopfen, und gelöste Proteine können während der SPE auf der Festphase ausfallen. Deshalb sind die Proteine von biologischen Proben vorher abzutrennen und die Proben vor der SPE zu zentrifugieren, um Partikel zu entfernen. Auch ist die Selektivität meistens noch unzureichend; oft werden noch andere Substanzen aus der Matrix mitextrahiert, die die spätere Analytik stören.

### **2.1.1.3. Festphasenextraktion mit molekular geprägten Polymeren (MISPE)**

Die mangelnde Selektivität der verschiedenen Sorbentien bei der SPE hat dazu geführt, daß diverse Ansätze entwickelt wurden, diese Selektivität zu verbessern.

Zum einen wurde versucht, analytenspezifische biologische Antikörper an die Silanolgruppen der Sorbentien oder Glas zu koppeln. So konnten selektiv einzelne Arzneistoffe und Pestizide aus biologischen und Umweltproben extrahiert werden [87, 88].

Ein großer Nachteil dieser Methode sind Aufwand und Kosten für die Herstellung der Antikörper. Auch wird die Anwendbarkeit dieser Methode durch die chemische Stabilität der Antikörper eingeschränkt, da Substanzen nur unter dem physiologischen pH-Wert und ohne Verwendung von organischen Lösemitteln extrahiert werden können.

Ein anderer Ansatz bestand in der Synthese von sogenannten künstlichen Antikörpern (plastic antibodies), den molekular geprägten Adsorbentien (Molecular Imprinted Polymers: MIP).

#### **2.1.1.3.1. Molecular Imprinted Polymers (MIP)**

Die Funktionsweise von molekular geprägten Adsorbentien oder Polymeren ist mit der von biologischen Antikörpern vergleichbar. Generell gibt es zwei Wege, die MIP herzustellen. Wulff et al. produzierten die MIP, indem sie spezielle Zucker oder Aminosäurederivate, die eine polymerisierbare Funktionalität, wie Vinylphenylboronat, enthielten, synthetisierten [89]. Nach erfolgter Polymerisation hydrolysierten sie den Zuckerteil und benutzten das Polymer für selektive Bindungen. Dieser Ansatz wird als "kovalentes molecular imprinting" bezeichnet.

Mosbach et al. entwickelten den sogenannten "nicht kovalenten" Ansatz [90]. Dabei benutzten sie eine Mischung aus einem Monomer wie der Methacrylsäure (MAA), einem Quervernetzer wie Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) und dem Templatmolekül (das eigentliche Analytmolekül). Die Monomere gruppieren sich um die funktionellen Gruppen des Moleküls und bilden eine 3D-Struktur aus. Die molekulare Erkennung wird durch die ionischen und van-der Waals-Kräfte zwischen Monomer und Templatmolekül sowie durch die Größe des Moleküls bestimmt. Durch Polymerisation mit EDMA (und Azodiisobutylnitril (AIBN) als Radikalstarter) wird diese 3D Struktur fixiert. Auf die einzelnen Schritte zur Herstellung der MIP wird im folgenden eingegangen.

#### **2.1.1.3.2. Wahl des Polymermonomers**

Bei dieser Herstellung der MIP werden drei Schritte unterschieden: Komplexbildung, Polymerisation und Extraktion des Analyten.

Der erste Schritt, die nichtkovalente Komplexbildung zwischen dem Monomer und dem Templatmolekül, ist die Basis für die spätere molekulare Prägung. Im ersten Schritt muß ein Monomer ausgewählt werden, mit dem die spätere Polymerisation durchgeführt wird. Es gibt eine große Auswahl an Polymermonomeren, die eingesetzt werden [91], bei basischen Verbindungen wird bevorzugt die Methacrylsäure (MAA) eingesetzt. In Abb.8 werden eine Reihe von Polymermonomeren vorgestellt, die schon bei Polymerisationen eingesetzt wurden. Sie sind in saure, basische und neutrale Monomere eingeteilt, je nachdem, mit welchem Templatmolekül sie Wechselwirkungen eingehen sollen.

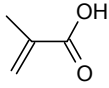
#### **2.1.1.3.3. UV-Spektroskopische Analyse**

Um die Stärke der Wechselwirkung des Monomers mit dem Analyten zu beurteilen, braucht man ein leistungsfähiges Verfahren. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen können aus ionischen (Ladung-Ladung)-, ionischen-Dipol-, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen bestehen. Weil molekulare Wechselwirkungen zwischen Templatmolekül und Monomer nur über kurze Entfernungen auftreten, können sterische Einflüsse des Templatmoleküls große Einflüsse auf die Komplexbildung haben und müssen so minimiert werden. Die Energien dieser Bindungen sind vergleichsweise schwach. Die Energien von Wasserstoffbrückenbindungen sind z. B. mit einem Betrag ca. 50 kJ/mol relativ gering. Weil aber zwischen Templatmolekül und Monomer viele Wasserstoffbrückenbindungen auftreten können, bestimmen diese maßgeblich die Energie des gebildeten Komplexes.

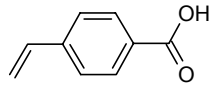
Verschiedene spektroskopische Verfahren wie NMR- [92] und UV-Spektroskopie [93] wurden bislang eingesetzt, um nicht-kovalente Templat-Monomer Wechselwirkungen zu untersuchen. Die UV-Spektroskopie stellt eine leistungsfähige und einfache Methode zur Betrachtung dieser Komplexbildungen dar.

**Abb. 8:** Darstellung einiger Polymermonomere, die für die Polymerisation eingesetzt werden

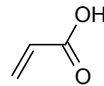
**Sauer**



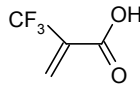
Methacrylsäure (MAA)



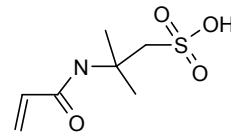
p-Vinylbenzoesäure



Acrylsäure

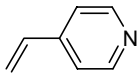


2-(Trifluormethyl)-acrylsäure

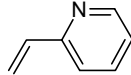


Acrylamido-(2-methyl)-propan-sulfonsäure

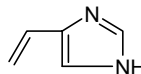
**Basisch**



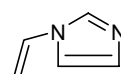
4-Vinylpyridine



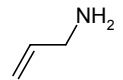
2-Vinylpyridine



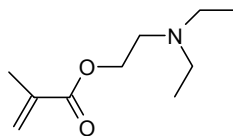
4-(5)-Vinylimidazol



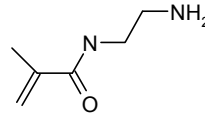
1-Vinylimidazol



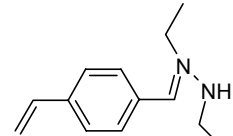
Allylamin



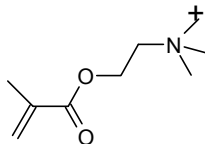
N,N'-Diethylaminoethyl-methacrylamid



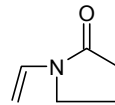
N,N'-(2-Aminoethyl)-methacrylamid



N,N'-Diethyl-4-styrylamin

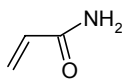


N,N,N-Trimethylaminoethyl-methacrylat

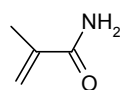


N-Vinylpyrrolin

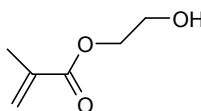
**Neutral**



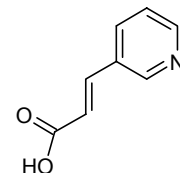
Acrylamid



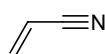
Methacrylamid



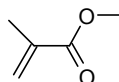
2-Hydroxyethyl-methacrylat



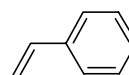
2-trans-3-(3-Pyridyl)-acrylsäure



Acrylnitril



Methyl-methacrylat



Styrol

Das UV-Spektrum eines Moleküls spiegelt die Übergänge der Elektronen zwischen den verschiedenen Energieniveaus des Moleküls wider. Folglich führen strukturelle Veränderungen in der chemischen Umgebung des Moleküls, die die Verteilung der Elektronen auf den Energieniveaus beeinflussen, auch zu Veränderungen im UV-Spektrum der Verbindung. Das Verfolgen der Absorption oder des Absorptionsmaximums während einer Titration des Monomers in eine Lösung des Templatmoleküls kann so dafür genutzt werden, die Stärke der Wechselwirkungen zu beurteilen, da bei einer entstehenden Komplexierung des Templatmoleküls durch die MAA sich das Absorptionsmaximum verschieben sollte.

#### 2.1.1.3.4. Polymerisation

Für die Polymerisation müssen die Monomere quervernetzt werden. Ein Quervernetzungsgrad von 70-90 % ist wichtig für die chemische und physische Stabilität des MIP-Materials. Die quervernetzenden Polymermonomere können auch eine Rolle bei hydrophoben Wechselwirkungen und der Porosität des Materials spielen. Am häufigsten wird Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) als Quervernetzer verwendet.

Das Porogen oder Polymerisationslösemittel spielt eine wichtige Rolle bei der Herstellung der MIP und bei der späteren molekularen Erkennung des Analyten. Seine wichtigste Aufgabe ist es, die Reagenzien für die Polymerisation zu lösen und die Porosität und Oberfläche des entstehenden Polymers zu beeinflussen. Es bestimmt die Stärke der molekularen Wechselwirkungen zwischen dem Monomer und dem Templatmolekül. Je polarer das Solvent wird, desto schwächer wird die molekulare Erkennung im Polymer. Dieser Zusammenhang wird durch das Coulomb-Gesetz beschrieben:

**Gleichung 5** 
$$F = \frac{Q_1 Q_2}{r^2 \epsilon},$$

wobei F die Anziehungskraft zwischen zwei Ladungen  $Q_1$  und  $Q_2$  bei einem bestimmten Abstand r beschreibt. Die Polarität des Lösemittels wird durch die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  beschrieben. Daraus folgt, je polarer das Lösemittel, d. h. je höher  $\epsilon$ , umso kleiner ist die elektrostatische Anziehungskraft und desto schwächer ist der Komplex.

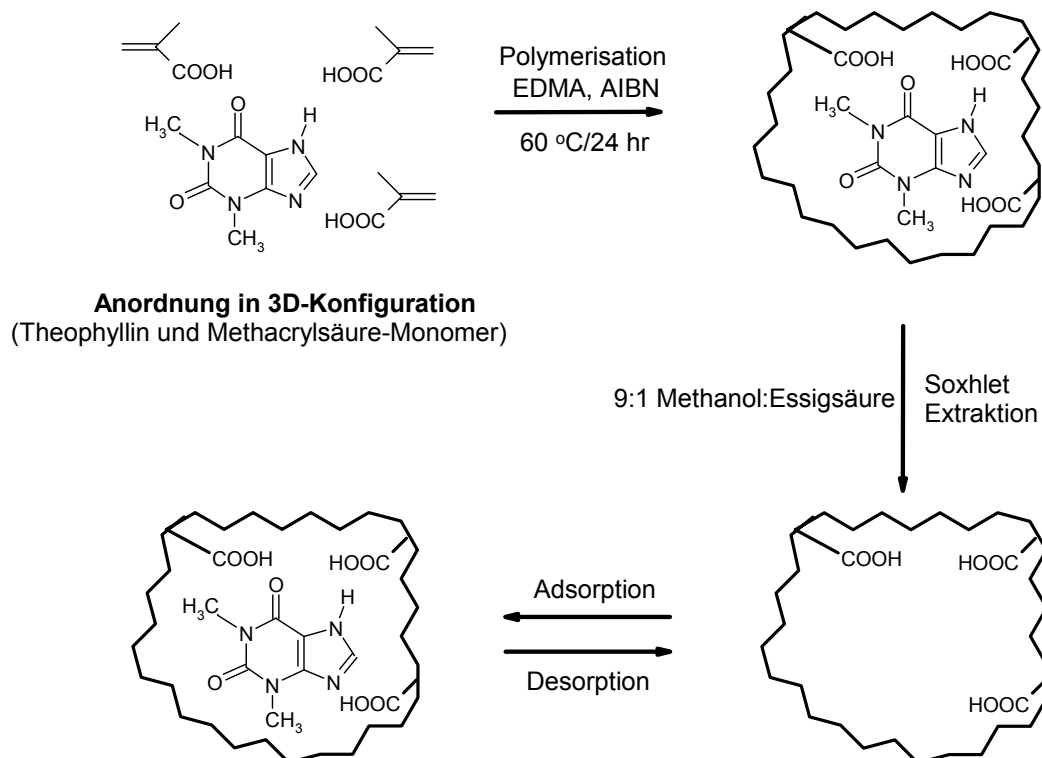
Die besten Lösemittel für die Herstellung der MIP sind solche mit niedrigen Dielektrizitätskonstanten, vorzugsweise Toluol oder Chloroform.



Die Polarität des Solvens kann die Struktur der MIP maßgeblich beeinflussen. Die Verwendung von Acetonitril führt zu mehr makroporösen Polymeren als Chloroform. Eine kleine Oberfläche kann zu verminderter molekularer Erkennung führen, wenn der Zugang zu den Bindungsstellen sterisch behindert ist. Im allgemeinen ist für die molekulare Erkennung das Lösemittel besonders geeignet, indem auch die Polymerisation durchgeführt wurde.

Da die Wechselwirkungen zwischen dem Templatmolekül und dem Polymer meist ionischer Natur sind, können die Templatmoleküle anschließend durch Soxhlet-Extraktion mit einem protischen Lösemittel wie einem Methanol/Essigsäuregemisch entfernt werden. Zurück bleibt ein Hohlraum mit funktionellen Gruppen, der nun selektiv Analyten binden kann. Der Imprintprozeß ist am Beispiel des Theophyllins in Abb. 9 dargestellt [91].

**Abb. 9:** Prozeß der molekularen Prägung, dargestellt am Beispiel des Theophyllins



Meistens läßt sich das eingesetzte Templatmolekül nicht quantitativ entfernen. Um hohen Blindwerten vorzubeugen, verwendet man für die Herstellung der MIP ein strukturverwandtes Molekül, das sich vom eigentlichen Targetmolekül geringfügig unterscheidet.

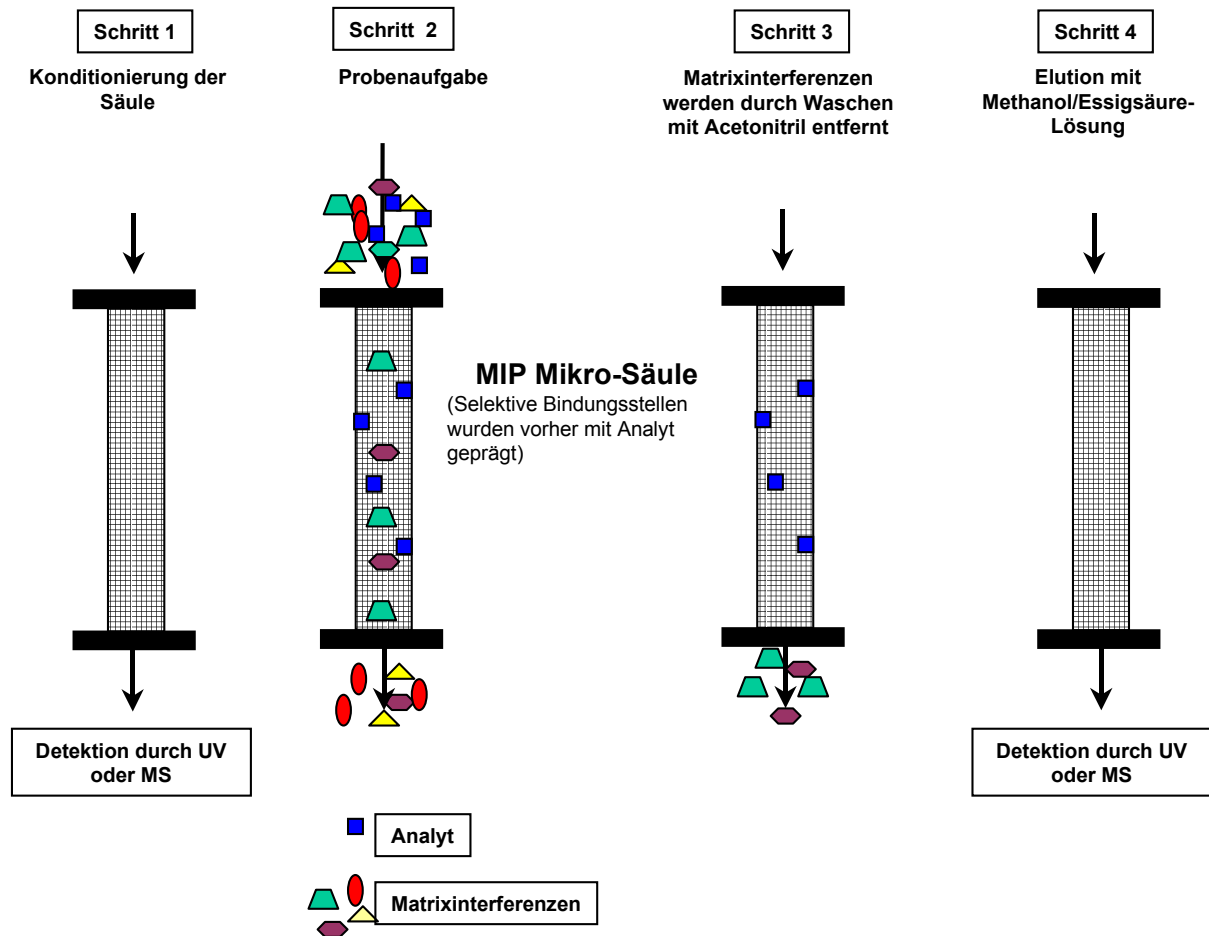
Die MIP sind in der Praxis vielseitig einsetzbar [94]. So lassen sie sich wie normale Chromatographiesorbentien in Säulen füllen und sich so für HPLC-Trennungen einsetzen [95]. Es wurden schon Enantiomertrennungen mit MIP vorgenommen [96]. Weiterhin lassen sie sich in SPE Kartuschen füllen, was dann als MISPE (**M**olecular **I**mprinted **S**olid **P**hase **E**xtraction) bezeichnet wird [97, 98].

#### **2.1.1.3.5. MISPE**

Bei der MISPE muß das Sorbens zuerst mit dem Eluenten (meistens Methanol/Essigsäure) und einer Waschlösung (Acetonitril oder Chloroform) konditioniert werden. Bei biologischen Proben kann dann nur eine bestimmte Menge an wäßriger Lösung aufgegeben werden, bis Durchbruch auftritt. Danach werden die Matrixbestandteile durch Spülen mit Acetonitril oder Chloroform entfernt, während die Analyten in den vorhandenen Poren des Trägermaterials adsorbiert werden. Anschließend werden die Analyten mit einer Methanol/Essigsäure-Lösung eluiert. Die MISPE läßt sich offline in Extraktionskartuschen oder online mit einer Säulenschaltung durchführen. Dafür muß das MIP-Material in Mikrosäulen gefüllt werden. Eine schematische Darstellung des Prozesses erfolgt in Abb. 10.

Der Vorteil der MISPE ist, daß das Sorbens relativ einfach und kostengünstig herzustellen ist. Es kann eine hohe Selektivität erzielt werden, wenn nur eine bestimmte Substanz oder Substanzgruppe aus der Matrix isoliert werden soll. Wenn sehr viele unterschiedliche Substanzen isoliert werden sollen, ist die Methode eher ungeeignet. Die MISPE ist auch nur beim Nachweis von Substanzen nützlich, die ausreichend funktionelle Gruppen besitzen, die mit den MAA-Monomeren Wechselwirkungen eingehen können. Sind diese Wechselwirkungen allerdings zu stark, so können die Analyten nicht ohne weiteres eluiert werden. In der Folge treten dann Verschleppungen auf. Durch gezielte Veränderung der Elutionsbedingungen (wie z. B. Absenken des pH-Wertes) kann dies allerdings vermieden werden. Im allgemeinen lassen sich die Substanzen bei einem pH-Wert von drei oder niedriger am besten eluieren. Der Einsatz der MISPE in der Bioanalytik wurde bislang für acht Substanzen beschrieben [97].

**Abb. 10:** Schematische Darstellung der MISPE mit einer Mikrosäule [91]



#### 2.1.1.4. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Um Proben mit Hilfe der Festphasenextraktion zu untersuchen, müssen die Analyten gelöst in homogener Form vorliegen, da Partikel die Poren des Sorbensmaterials leicht verstopfen können. Die Extraktion von festen Proben mit Hilfe der Festphasenextraktion ist daher schwierig und aufwendig, da zuvor das zu untersuchende Material zerkleinert und homogenisiert werden muß, wobei viel Lösemittel verbraucht wird.

Barker publizierte 1989 ein Verfahren zur Extraktion von Analyten wie Arzneistoffen aus festem Material, wie Lebensmitteln oder Gewebe, und nannte es **Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)** [99].

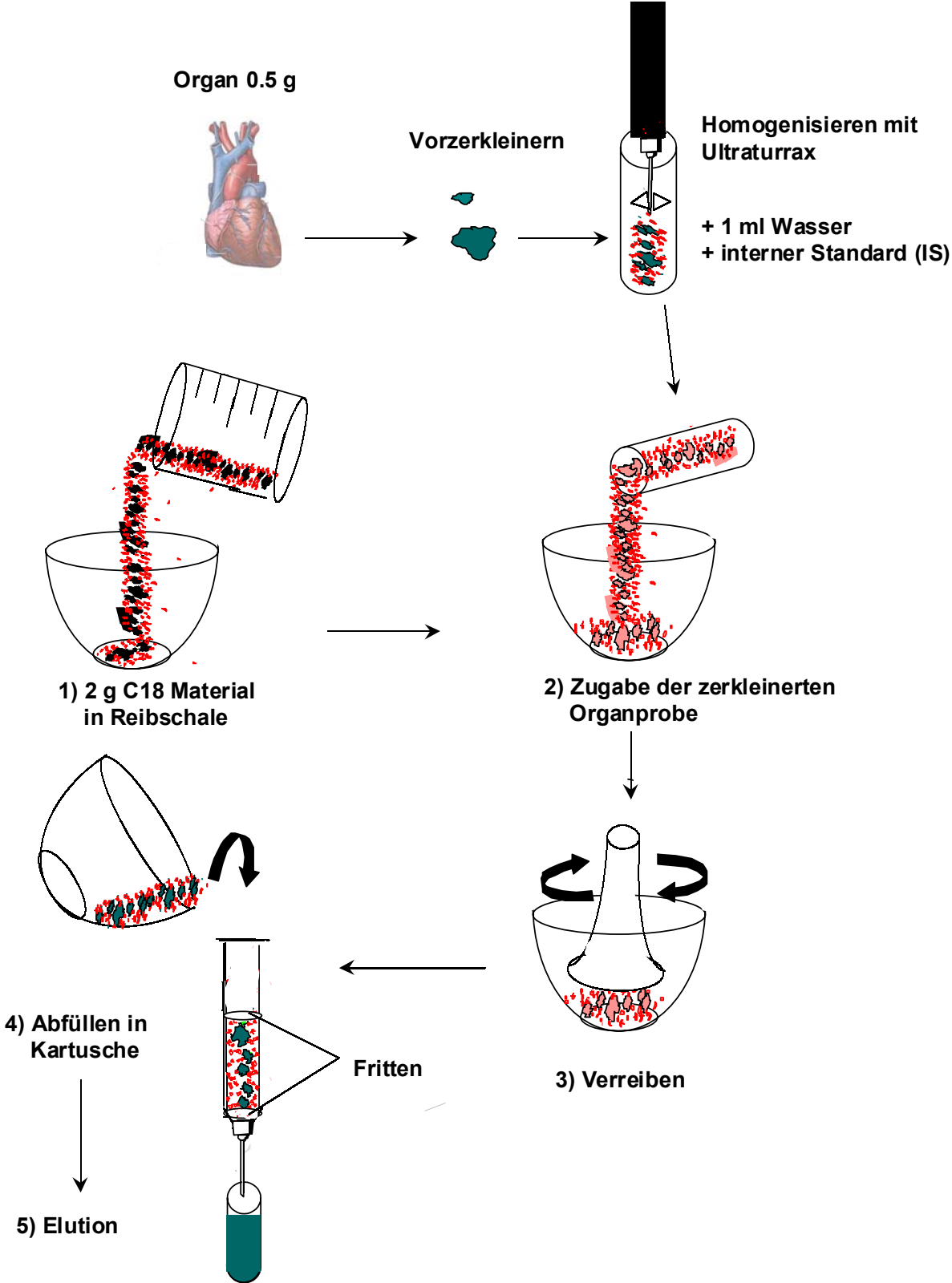
Bei der MSPD wird das zu extrahierende Material zuvor zerkleinert und mit kieselgelgebundenem RP-Material (vorzugsweise RP8- oder RP18-Material) in einer Reibschale verrieben. Durch die entstehenden Fliehkräfte bei dem Zerreibungsprozeß wird die Struktur des Materials (bei Gewebe die Zellverbände) weitestgehend zerstört [100]. Die freigesetzten Analyten können sich jetzt aufgrund ihrer Polarität und ihres

Verteilungskoeffizienten in der unpolaren Phase der Partikel und Poren lösen, während die polaren Substanzen wie Wasser auf der Oberfläche der Silanolgruppen in den Partikeln und in den Poren adsorbiert werden.

Die entstandene Mischung kann dann in vorgefertigte Kartuschen gefüllt und die Analyten mit organischem Lösemittel wie bei der SPE extrahiert werden. Damit die Oberfläche, auf der sich die Analyten verteilen, ausreichend ist, wird bei der Extraktion von Gewebe ein Verhältnis von 1:4 zwischen der eingewogenen Masse des Gewebes und dem Trägermaterial empfohlen. Die besten Ergebnisse werden mit RP-Material mit einem Partikeldurchmesser von 25-40 µm erzielt. In Abb. 11 ist der MSPD-Prozeß schematisch dargestellt.

Der Zeitaufwand der Probenvorbereitung für die MSPD ist relativ hoch, allerdings ist er wesentlich geringer als bei der herkömmlichen Zerkleinerung und Extraktion. Zusätzlich ist der Bedarf an Lösemittel minimal. Die MSPD wurde erfolgreich für den Nachweis von zahlreichen Arzneistoffen und Insektiziden aus Gewebeproben oder Nahrungsmitteln eingesetzt [99]. Ein Nachteil der MSPD ist, daß die Extrakte meist noch eine große Zahl von weiteren Matrixbestandteilen beinhalten. Es konnte gezeigt werden, daß die Kombination der MSPD mit der MISPE eine Abtrennung der Matrixbestandteile weitestgehend ermöglicht und eine hohe Selektivität für die Analytextraktion garantiert [101].

**Abb. 11:** Schematische Darstellung des MSPD -Prozesses



### 2.1.1.5. SPME

Die Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Microextraction: SPME), bei der Probenahme und Anreicherung in einem Schritt erfolgen, wurde von Pawliszyn entwickelt und 1989 vorgestellt [102].

Das Herzstück der Festphasenmikroextraktion bildet eine Fused Silica Faser, die mit einem Polymermaterial beschichtet ist. Zur Extraktion werden die Fasern dem zu extrahierenden Medium ausgesetzt. Die Analyten werden entsprechend dem Verteilungskoeffizienten zwischen flüssiger Phase und Polymerphase bis zur Einstellung eines Adsorptionsgleichgewichtes extrahiert und in der Faser aufkonzentriert. Für die Desorption von der Faser gibt es mehrere Möglichkeiten. Flüchtige Analyten werden bevorzugt mittels Gaschromatographie aufgetrennt. In diesem Fall ist die Thermodesorption der Analyten von der Faser im GC-Injektor am besten geeignet. Nicht flüchtige Verbindungen können durch Zusatz von organischen Lösemitteln von der Polymerfaser desorbiert werden.

#### 2.1.1.5.1. Theoretische Aspekte der SPME

Die SPME läßt sich thermodynamisch durch die Theorie des chemischen Potentials erklären [103]. Es findet zwischen der Analytkonzentration auf der Faser und in der Lösung so lange ein Austausch statt, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die Gleichgewichtsbedingungen können wie folgt beschrieben werden:

**Gleichung 6** 
$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s},$$

wobei  $n$  die extrahierte Substanzmenge,  $K_{fs}$  die Verteilungskonstante des Analyten zwischen Fasercoating und Lösung,  $V_f$  das Volumen des Fasercoatings,  $V_s$  das Probenvolumen und  $C_0$  die Ausgangskonzentration bezeichnet.

Gleichung 6 besagt, daß die extrahierte Menge an Analyt proportional zur Konzentration in der Lösung ist. Desweiteren hängt die Menge an extrahiertem Analyten von der Schichtdicke der Faser ab. Wenn das Probenvolumen wesentlich größer ist als das Volumen des Coatings, gilt mit  $V_s > K_{fs} V_f$ :

**Gleichung 7** 
$$n = \frac{K}{V_s} C_0 \text{ mit } K = K_{fs} V_f V_s$$

Es besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen der extrahierten Menge an Analyt und der Ausgangskonzentration. Die von der Faser extrahierte Menge wird

damit vom Probenvolumen unabhängig. Dies ist ein wesentlicher Vorteil der Festphasenmikroextraktion (SPME) gegenüber der Festphasenextraktion (SPE). Während die SPE eine erschöpfende Extraktionsmethode darstellt, wird bei der SPME nur ein Bruchteil extrahiert. Die von der Faser extrahierte Analytmenge ist also direkt proportional zur Ausgangskonzentration in der Lösung, was eine Quantifizierung von Analyten in der Lösung ermöglicht [103]. Dennoch lassen sich mit der SPME sehr gute Nachweisgrenzen erreichen, da die gesamte von der Faser extrahierte Analytmenge auf die analytische Säule transferiert wird. Große Verteilungskoeffizienten  $K$  bewirken eine starke Anreicherung des Analyten in der Faser und damit eine hohe Empfindlichkeit der Methode. Diese hängt außerdem sowohl von der Faserbeschichtung als auch vom Faservolumen ab.

Eine Extraktion bis zur Gleichgewichtseinstellung garantiert eine maximale Empfindlichkeit und geringe Schwankungen in der Extraktionszeit. In der Praxis ist die Zeitspanne bis zu diesem Punkt oftmals zu lang (bis zu einige Stunden je nach Substanz und Faser). Die Extraktionsausbeute im Nicht-Gleichgewichtszustand hängt sehr stark von der Extraktionszeit ab. Wird aber ein automatisiertes System verwendet, so lassen sich diese Extraktionszeiten sehr präzise reproduzieren, so daß man die Analyten vor Einstellung des Gleichgewichtes extrahieren kann.

#### **2.1.1.5.2. SPME-Modifikationen**

SPME ist eine schnelle, günstige und effektive Extraktionstechnik für feste, flüssige und gasförmige Proben. Die Methode kommt vollständig ohne organische Lösemittel aus und verlangt keine aufwendigen Apparaturen. Außerdem kann sie sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt werden. Diese Methode setzt allerdings voraus, daß die zu untersuchenden Substanzen verdampfbar sind, sofern sie mit der GC untersucht werden sollen. Bei der Analyse von Arzneistoffen in biologischen Proben ist diese Technik allerdings nur begrenzt einsetzbar, da die meisten Verbindungen nicht flüchtig sind [104]. Nichtflüchtige Verbindungen können zwar auch mit der Polymerfaser extrahiert werden, indem die Faser direkt in eine wäßrige Lösung eingetaucht wird, die Desorption der Analyten von der Faser wird anschließend in einem Gefäß vollzogen, das eine organische Lösemittelphase enthält. Aufgrund ihres Verteilungskoeffizienten gehen die Analyten dann aus der Polymerschicht in die organische Phase über. Über ein Interface (SPME Fiber-Interface) läßt sich die SPME-Vorrichtung mit einer HPLC koppeln, so daß die Analyten

anschließend auf die HPLC-Säule transferiert werden können [105]. Dieses System wurde unter anderem schon für die Bestimmung von Corticoiden aus Urin eingesetzt [106]. Ein Nachteil dieser Technik ist, daß sie nicht für proteinhaltige Plasma- oder Serumproben geeignet ist, da die Proteine durch Kontakt mit der organischen Phase ausfallen und die Faserbeschichtung zerstören würden. Durch Polymerisation eines "Restricted Access Material" (RAM) auf der Faseroberfläche (siehe Kapitel 2.1.2.1) konnte aber auch die Kompatibilität mit biologischen proteinhaltigen Lösungen hergestellt werden [107]. Ein weiterer Nachteil der konventionellen SPME ist die geringe Selektivität der Extraktion. Durch Polymerisation von molekular geprägten Adsorbentien (MIP) auf der Faseroberfläche der SPME-Faser konnte die Selektivität für die Extraktion von  $\beta$ -Blockern verbessert werden [108]. Allerdings sind diese Fasern physisch sehr instabil und für Routinemessungen wenig geeignet.

### **2.1.2. Online-Verfahren: Kopplung der Probenvorbereitung mit der HPLC**

Die zunehmende Probenzahl und die erhöhten Anforderungen an deren Analyse sowie die begrenzten Ressourcen erfordern die Entwicklung vollständig automatisierter Analysenverfahren mit hohem Probendurchsatz bei gleichzeitiger Kosteneinsparung und Verbesserung der analytischen Qualität. Die bislang vorgestellten Verfahren haben den Nachteil, daß sie relativ zeitaufwendig (wenn man die SPE nur offline einsetzt) und oft nur schwer automatisierbar sind. Desweiteren sind sogenannte offline-Verfahren immer fehleranfällig, weil bei einer großen Zahl von Extraktionen z. B. leicht Proben vertauscht oder kontaminiert werden können. Außerdem können oxidations- oder lichtempfindliche Analyten (wie z. B. Nifedipin) so nur schwer extrahiert werden, da entweder unter Schutzgas oder in verdunkelten Räumen gearbeitet werden müßte.

Für die Integration der HPLC in die Probenvorbereitung bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten. Die Kopplung kann entweder durch Säulenschaltung von einer analytischen Säule mit einer Vorsäule, die mit modifizierten Festphasenmaterialien gefüllt ist, erfolgen oder mit Hilfe der in-tube SPME. Beide Verfahren werden nachfolgend vorgestellt.



### 2.1.2.1. HPLC-integrierte Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einem "Restricted Access Material" (RAM)

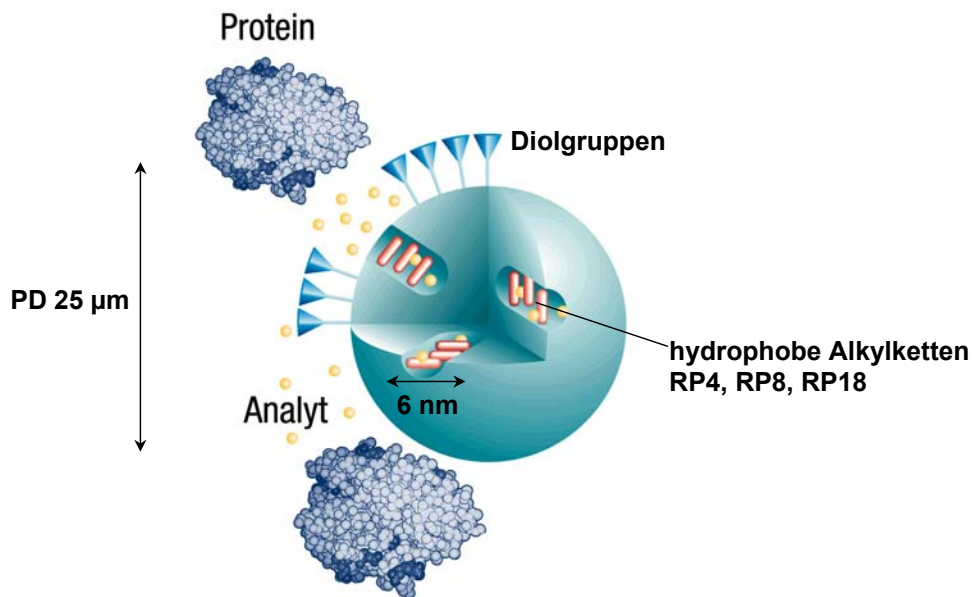
Bei der HPLC-Analyse von komplexen biologischen Flüssigkeiten kann dieses Ziel dadurch erreicht werden, daß die extraktive Probenvorbereitung an einer Festphase (SPE) auf apparativ einfache und kostengünstige Weise in ein konventionelles HPLC-System integriert wird, wobei eine Säulenschaltung (SPE-LC-Kopplung) und neue maßgeschneiderte Adsorbentien verwendet werden [109].

Die Fraktionierung der Probe in Matrix und Analyt mit Hilfe dieser porösen Adsorbentien beruht auf der Durchführung zweier chromatographischer Trennprinzipien. Neben einer selektiven Adsorptionschromatographie von niedermolekularen Analyten erfolgt eine sterische Ausschlußchromatographie von makromolekularen Probenkomponenten (Proteinen), deren Molekulargewicht größer als 15000 Da ist. Diese sogenannten "Restricted Access Materials" (RAM) besitzen neben einer definierten Zugänglichkeit (physikalische oder chemische Ausschlußbarriere der Poren: 6 nm) eine spezifische Oberflächen-Topochemie. Die Adsorptionszentren (hydrophobe RP4-, RP8- oder RP18-Alkylketten) sind ausschließlich im Poreninnern der Partikel (PD 25 µm) lokalisiert, während die für Makromoleküle zugängliche Außenoberfläche (Kontaktfläche) biokompatibel, d.h. elektroneutral und hydrophil durch gebundene Diolgruppen ist. Das kommerziell verbreitetste RAM ist das **Alkyl-Diol-Silica-Material** (ADS) der Firma Merck.

Der schematische Aufbau dieser ADS-Partikel ist in Abb. 14 dargestellt. Proteinhaltige Flüssigkeiten, wie z. B. Plasma, hämolysiertes Vollblut, Zellkulturüberständen oder Gewebekomogenate können so direkt, d.h. im nativen Zustand, extrahiert bzw. fraktioniert werden.

Die Fraktionierung wird im allgemeinen durch Kopplung der ADS-Vorsäule mit einem Schaltventil und einem chromatographischen System erreicht. In Abb. 13 werden die einzelnen Schritte der Fraktionierung dargestellt.

**Abb. 12:** Schematischer Aufbau der ADS-Partikel (entnommen aus <http://www.merck.de/chromatography>)



Im Normalzustand wird die ADS-Säule mit einer wäßrigen Lösung, die ca. 5 % organisches Lösemittel als Modifier enthält, konditioniert, wofür entweder Wasser oder eine Pufferlösung im pH-Bereich von 5-8 verwendet wird, um ein Ausfallen der Proteine auf dem Säulenmaterial zu verhindern. Ein Inlinefilter, der zwischen die Injektionseinheit und die RAM-Vorsäule gesetzt wird, verhindert, daß die RAM-Vorsäule durch Partikel verstopft. Der Modifier (meist Methanol oder Acetonitril) wird der Lösung zugesetzt, um einerseits die Bindung der Analyten zu Proteinen wie Plasmaeiweißen zu lösen und um andererseits sehr polare Matrixkomponenten von der Phase zu spülen. Nach Injektion der biologischen Probe werden nun die Proteine von den Analyten getrennt (fraktioniert). Während die Analyten in den Poren an den hydrophoben Alkylketten adsorbiert werden, können die Proteine direkt von der Phase gespült werden. Zuvor muß allerdings die Elutionszeit der Proteine von der Phase bestimmt werden. Nach erfolgter Entfernung der Proteine kann das Ventil umgeschaltet werden, und die Analyten werden mit dem HPLC-Eluenten von der ADS-Phase auf die chromatographische Säule transferiert. Die Transferzeit beträgt im allgemeinen nur wenige Minuten. Nun kann die eigentliche chromatographische Trennung erfolgen. Nach erfolgtem Analyttransfer kann die ADS-Vorsäule wieder mit der wäßrigen Lösung für die Proteinelution konditioniert und eine weitere Probe fraktioniert werden.

Da die Fraktionierung und chromatographische Trennung in einem System simultan erfolgen kann, wird die Analysenzeit bei einer Vielzahl von Proben erheblich verkürzt.

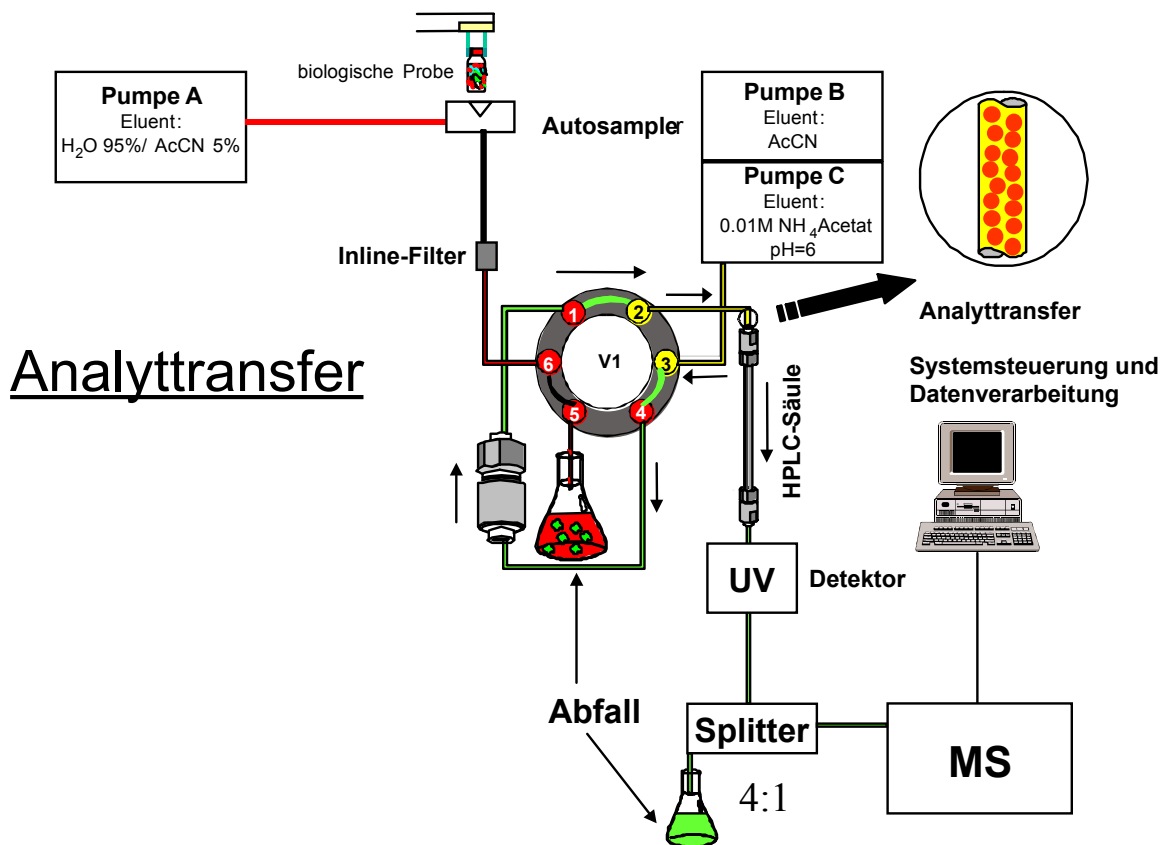
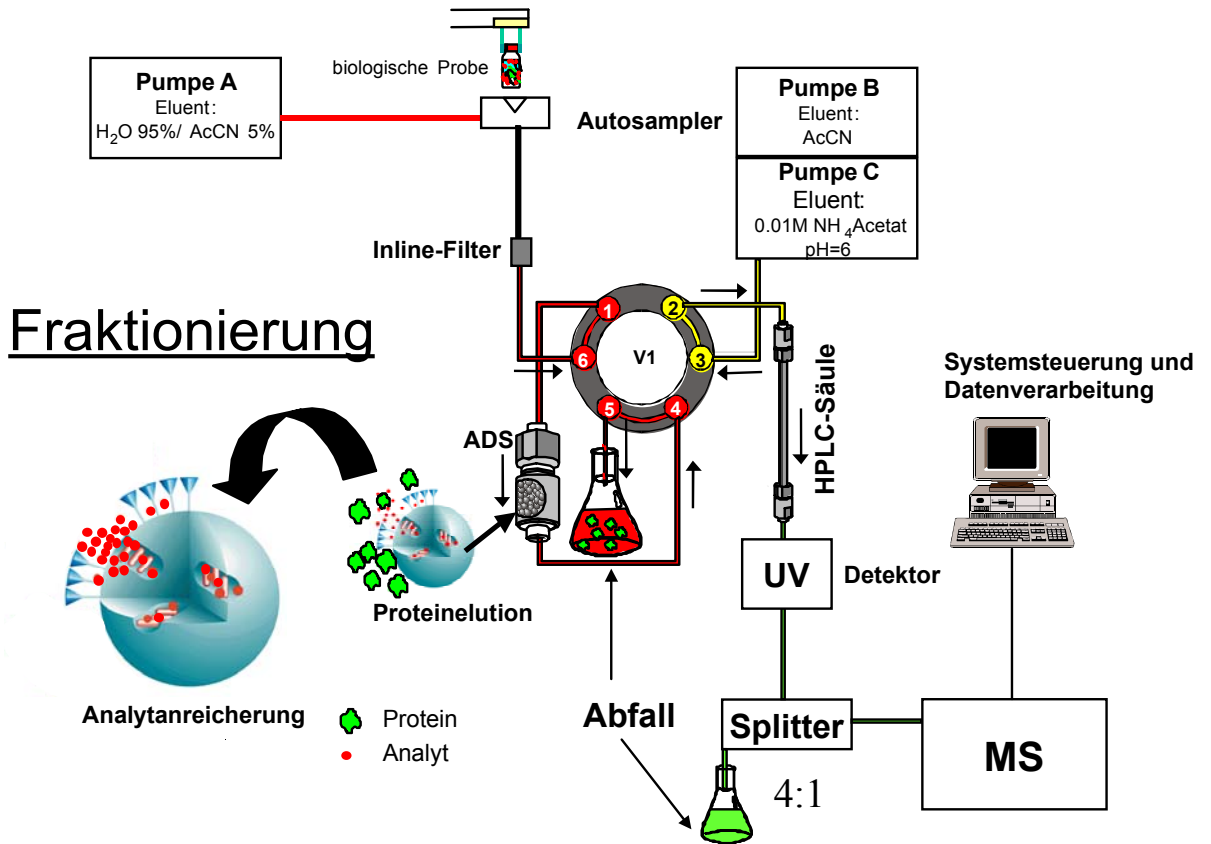
Die Wiederfindungen sind im allgemeinen sehr gut und vergleichsweise besser als bei der offline-SPE, da der Analyt nahezu quantitativ auf die Analytsäule transferiert wird, was zu einer hohen Nachweisempfindlichkeit führt, obwohl nur geringe Probemengen (50-200µl) des biologischen Materials auf die ADS-Vorsäule injiziert werden. Das System ist außerdem mit einem Massenspektrometer koppelbar, was eine hohe Meßempfindlichkeit garantiert. Die Kartuschen mit dem ADS-Material sind in der Regel wiederverwendbar. Der Hersteller garantiert beispielsweise bis zu 2000 Direktinjektionen von Plasma (je 50 µl) bzw. ein Gesamtinjektionsvolumen von 100 ml.

Ein weiterer Vorteil der Automatisierbarkeit besteht darin, daß auch manuelle Fehler in der Probenvorbereitung reduziert werden können. Die Proben müssen nur vor der Analyse einmal zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Außerdem wird das Laborpersonal biologisch kontaminierten Proben nicht ausgesetzt. Auch können durch die Automatisierung empfindliche Substanzen wie das Nifedipin schonend extrahiert werden, da bei der Extraktion kein Kontakt mit Luftsauerstoff oder Licht besteht. Der Lösemittelverbrauch ist nicht wesentlich höher als bei der normalen HPLC-Chromatographie und es werden überwiegend wäßrige Lösemittelabfälle erzeugt, die gesondert gesammelt und aufgearbeitet werden können.

Ein Nachteil dieser Materialien ebenso wie bei der herkömmlichen SPE ist, daß die Selektivität der hydrophoben RP4-, RP8- und RP18-Ketten nicht besonders hoch ist und immer noch diverse andere Matrixbestandteile bei der Fraktionierung mitisoliert werden.

**Abb. 13:** Fraktionierung von biologischen Proben durch Säulenschaltung mit RAM-Vorsäule



### **2.1.2.2. Analytspezifische online-SPE komplexer Proben durch Kombination von "Restricted Access Materials" (RAM) mit "Molecular Imprinted Polymers" (MIP)**

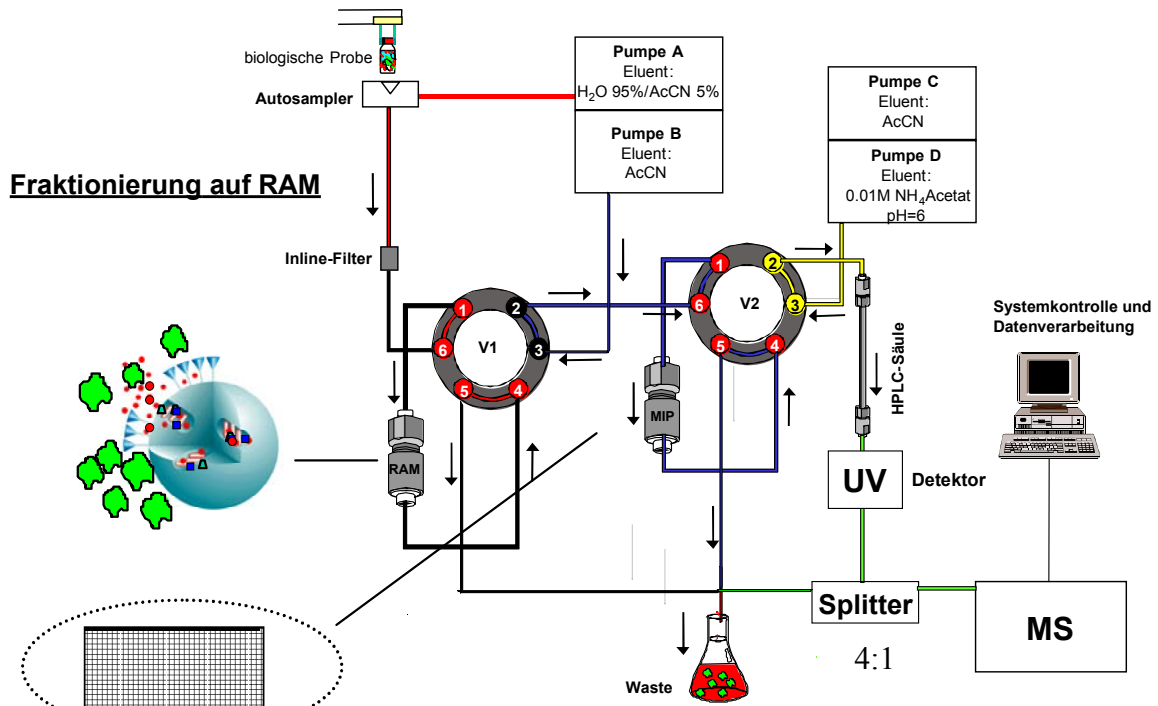
Die molekular geprägten Adsorbentien (MIP) haben in der Probenvorbereitung in den letzten Jahren deshalb so stark an Bedeutung zugenommen, weil ihre Selektivität gegenüber bestimmten Targetanalyten sehr hoch ist. Sie sind für biologische Proben aber nur begrenzt einsetzbar, da Proteine und andere Matrixbestandteile sich in ihren Poren ablagern und sie mit der Zeit verstopfen würden. "Restricted Access Materials" (RAM) ermöglichen die Abtrennung von Proteinen und anderen makromolekularen Matrixbestandteilen. Eine Kombination dieser beiden Methoden für die analyt-spezifische Fraktionierung ist deshalb sinnvoll und wurde zuerst von Boos et al. für die Aufarbeitung von biologischen Proben vorgenommen [110]. Koeber et al. haben die Kopplung dieser beiden Phasen für die selektive Extraktion von Triazinen aus dem Oberflächenwasser eingesetzt [111].

Die Kopplung dieser beiden Methoden erfolgt über eine Säulenschaltung mit zwei Schaltventilen und mindestens drei Pumpen, die in Abb. 14 dargestellt ist. Zuerst werden die höhermolekularen Matrixkomponenten auf der RAM-Vorsäule durch Fraktionierung mit Pumpe A abgetrennt. Durch Umschalten des ersten Ventils werden die Analyten von der RAM-Vorsäule auf die MIP-Vorsäule mit einer organischen Phase (meist Acetonitril) aus Pumpe B transferiert. Die Analyten werden so von den molekular geprägten Polymerpartikeln in der Säule stark retiniert, während weitere Matrixbestandteile abgetrennt werden. Durch Umschalten des zweiten Schaltventils werden die Analyten von der MIP-Säule dann im Backflushverfahren mit dem HPLC-Eluenten der Pumpen C und D (verfügt man über eine Gradientenpumpe oder wird eine isokratische Trennung durchgeführt, werden nur 3 Pumpen benötigt) auf die analytische Säule transferiert, wo sie dann getrennt und anschließend detektiert werden können.

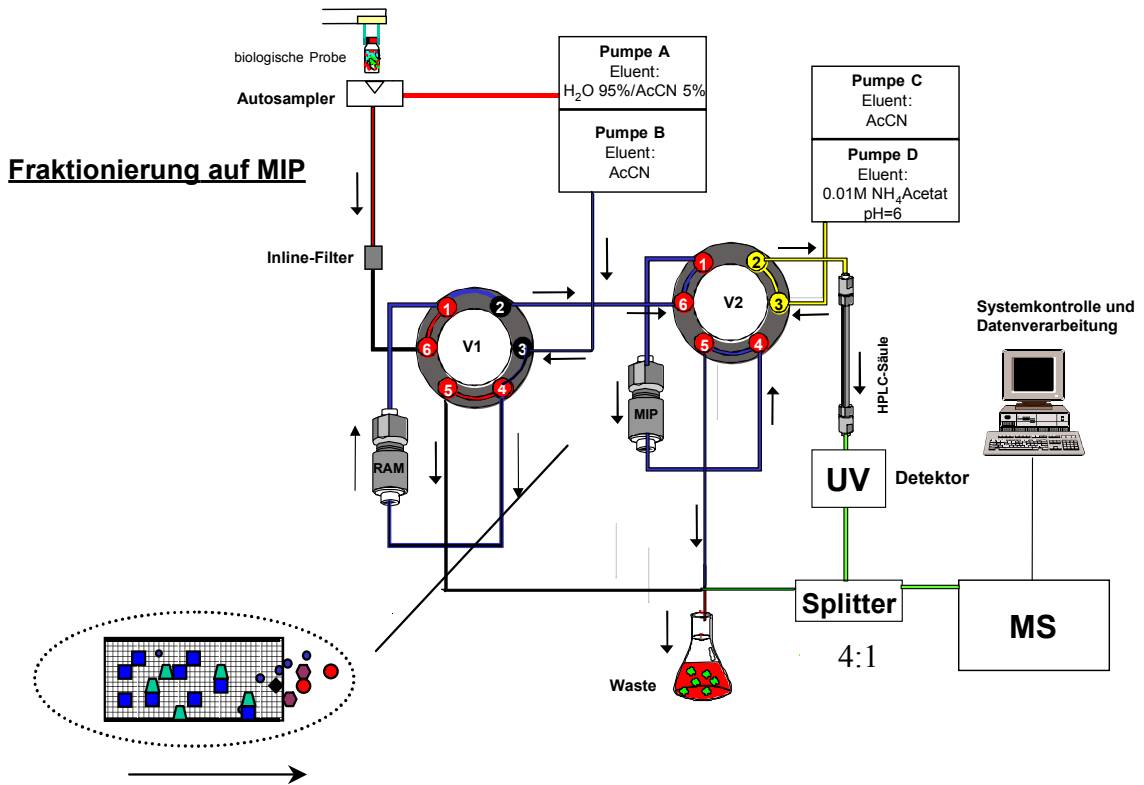
Dieses hochselektive Extraktionsverfahren wird auch als SIX-SPE (**s**ize **s**elective **s**ample **s**eparation and **s**olvent **s**witch) bezeichnet [112].

Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß die Analyten sehr selektiv von den Matrixbestandteilen abgetrennt werden können und daß das Verfahren vollständig automatisierbar ist.

**Abb. 14:** Fraktionierung von biologischen Proben durch RAM-MIP-Säulenschaltung

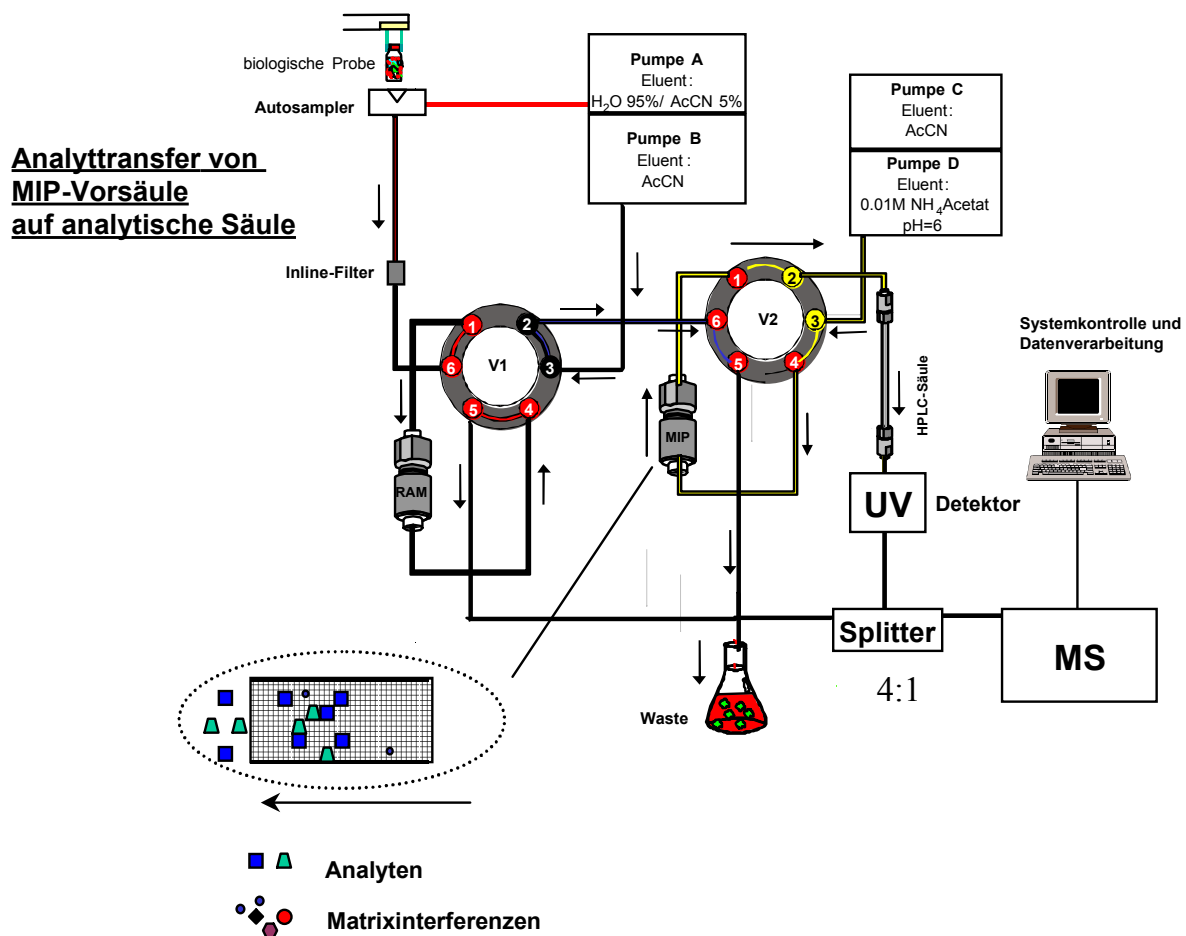


**MIP-Vorsäule (MIP-Partikel mit Analyt geprägt)**



mit V1: externes Schaltventil 1

V2: externes Schaltventil 2



Ein Nachteil des Verfahrens ist, daß relativ viele Geräte (mindestens drei Pumpen und ein Detektor) miteinander kombiniert werden müssen, deren Anschaffung relativ teuer ist. Die Kosten können zum Teil wiederum durch die Wiederverwendbarkeit der RAM- und der MIP-Vorsäule sowie durch die Zeitersparnis, die die Automation des Verfahrens ermöglicht, kompensiert werden.

Ein weiterer Nachteil des Verfahrens ist, daß bei der Desorption der Analyten von den molekular geprägten Adsorbentien (MIP) die Affinität der Analyten zum Sorbens so stark ist, daß in der Folge Verschleppungen und Peakverbreiterungen bei der Chromatographie auftreten können.

Um diese Störfaktoren auszuschalten, konzentrieren sich die aktuellen Forschungen insbesondere darauf, die RAM-Phase mit der MIP-Phase zu kombinieren. Anstatt der hydrophoben Alkylketten sollen molekular geprägte Adsorbentien in den Poren des Materials eine selektive und verbesserte Extraktion von Analyten aus einer biologischen Matrix ermöglichen. Haginaka und Sanbe gelangen so erste Erfolge bei der Extraktion von S-Naproxen und Ibuprofen aus Serum [113].

### 2.1.2.3. HPLC-integrierte Probenvorbereitung mittels in-tube SPME

Die meisten pharmazeutischen Verbindungen sind nicht flüchtig, und daher ist der Einsatz der konventionellen SPME für die Extraktion von Arzneistoffen und ihren Metaboliten aus biologischen Matrices nur bedingt möglich.

Bei der Analyse von pharmazeutischen Verbindungen in biologischen Matrices wird deshalb eine besondere Modifikation des Verfahrens eingesetzt, die als in-tube SPME bezeichnet wird und von Eisert und Pawliszyn entwickelt wurde [114, 115]. Dabei werden Polymere auf die innere Oberfläche von Kapillaren aufgebracht, wie z. B. auf GC-Kapillaren. Diese beschichteten Kapillaren werden dem flüssigen, wäßrigen Medium, indem die Analyte gelöst vorliegen, ausgesetzt [116]. Die Analyten werden entsprechend dem Verteilungskoeffizienten zwischen flüssiger Phase und Polymerphase bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes extrahiert. Durch Elution mit einer Lösung, die einen hohen Anteil an organischem Lösemittel enthält, werden die Analyten aus der Polymerschicht desorbiert. Als Elutionslösung wird der HPLC-Eluent mit entsprechend hohem Methanol- oder Acetonitrilanteil gewählt. Für die HPLC-integrierte Probenvorbereitung wird diese Kapillare in das Injektionssystem der HPLC eingebaut. Das System kann vollautomatisiert arbeiten und ist auch mit der HPLC-MS koppelbar.

Die gängigen GC-Kapillaren sind für die Extraktion von polaren Analyten wie Arzneistoffmetaboliten aus einer wäßrigen Phase nicht geeignet. Wu und Pawliszyn entwickelten deshalb Polymerbeschichtungen auf **Polypyrrol**basis (PPY) [116], mit denen sich auch polarere Substanzen aus biologischen Matrices wie z. B. Urin bestimmen lassen [117]. Gerade in wäßriger Lösung wird die Gleichgewichtseinstellung bei Verwendung dieser Phasen durch Veränderungen des pH-Wertes stark beeinflusst. Die Art der Beschichtung, die Schichtdicke sowie die chemischen Eigenschaften der Analyten sind maßgeblich an der Einstellung des Gleichgewichtes beteiligt.



### 2.1.2.3.1. Funktionsweise der in-tube SPME

Bei der in-tube SPME wird (wie Abb. 17 dargestellt) die polymerbeschichtete Kapillare zwischen Probenschleife und Injektionsnadel des HPLC-Injektionssystems (Autosamplers) eingebaut. Für die Extraktion wird das Injektionsventil des Autosamplers so geschaltet, daß nur die analytische Säule vom HPLC-Eluenten gespült wird, nicht jedoch das Injektionssystem. Nach Abfüllen der wäßrigen Probe in ein Gefäß kann mit der Extraktion begonnen werden. Die Injektionsnadel taucht in das Gefäß ein, und durch die Pumpe wird die wäßrige Lösung in die Extraktionskapillare aufgezogen (aspiriert). Üblicherweise verwendet man Kapillaren von 60 cm Länge und einem Volumen von 35 µl, da mit ihnen die besten Ergebnisse erzielt wurden [103]. In dieser Zeit kann ein Teil der Analyten in der stationären Phase (Polymerfilm) absorbiert werden. Anschließend läßt man die wäßrige Lösung wieder in das Probegefäß zurücklaufen.

Die Aspirationsgeschwindigkeit und die Zahl der Extraktionszyklen bestimmen maßgeblich die Zeit  $t_e$  bis zur Gleichgewichtseinstellung:

**Gleichung 8**

$$t_e = \frac{L(1 + K_{fs} \frac{V_f}{V_v})}{\mu},$$

wobei L die Länge der Kapillare ist,  $K_{fs}$  die Probe/Coating Verteilungskonstante,  $V_f$  ist das Volumen der Extraktionsphase,  $V_v$  das Totvolumen (engl. void volume) der Kapillare und  $\mu$  die lineare Geschwindigkeit der Probe, die in der Kapillare aufgezogen wird. Höhere Aspirationsgeschwindigkeiten verkürzen so die Zeit bis zur Einstellung des Extraktionsgleichgewichtes. Dies bedeutet, daß ein Erhöhen der Aspirationsgeschwindigkeit vor Einstellung des Extraktionsgleichgewichtes mit einer erhöhten Menge an extrahiertem Analyt verbunden ist.

Zusätzlich hängt die Einstellung des Gleichgewichtes in Lösung von der Diffusion der Analyten aus der Lösung in die Polymerbeschichtung ab. Da die Diffusionskoeffizienten in Lösung geringer sind als in der Gasphase, dauert die Einstellung des Gleichgewichtes in der Lösung erheblich länger.

Nach beendeter Extraktion wird das Ventil so umgeschaltet, daß die Probeschleife und die Extraktionskapillare vom HPLC-Eluenten durchspült wird und die Analyten auf die Säule transferiert werden, wo sie anschließend getrennt und detektiert werden können. Der Eluent muß in seiner Zusammensetzung so gewählt werden, daß der Anteil an organischem Lösemittel für eine vollständige Desorption der

Analyten von der Faser ausreicht.

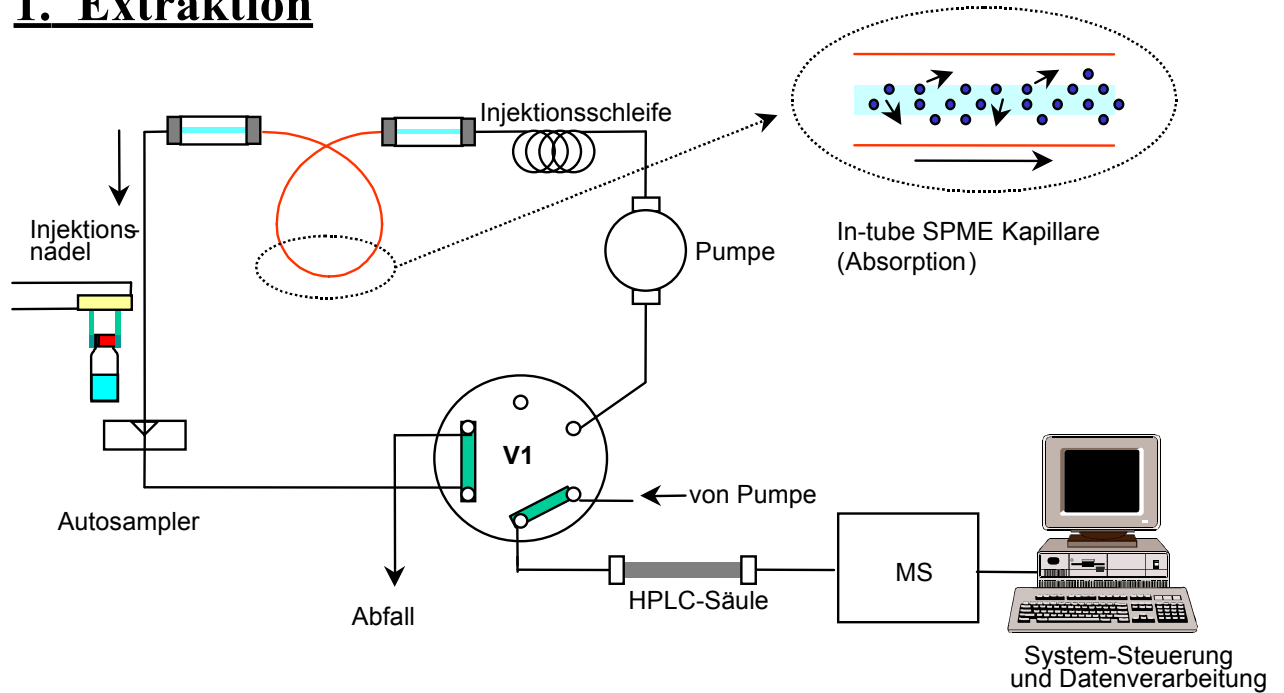
Die in-tube SPME läßt sich also leicht mit kommerziell vertriebenen HPLC-Geräten automatisieren. Die Probenvorbereitung kann auf einfachem Wege in die HPLC integriert werden. Bei dieser Form der in-tube SPME müssen jedoch vorher die Proteine aus einer biologischen Probe abgetrennt werden, weil sie sonst beim Desorptionsschritt ausfallen und so die Kapillare und das Injektionssystem kontaminieren würden. Mullett et al. lösten neuerdings dies Problem, indem sie die in-tube Kapillare mit ADS-Partikel füllten [118]. Arzneistoffe wie Benzodiazepine konnten so aus Plasma oder Serum ohne weitere Probenvorbereitung extrahiert werden. Ein weiteres Problem der herkömmlichen in-tube Methode ist die mangelnde Selektivität für bestimmte Analyten, da eine ganze Reihe von Matrixkomponenten mitextrahiert werden.

Durch Befüllen einer Kapillaren mit MIP-Partikeln haben Mullett und Pawliszyn kürzlich gezeigt, daß so die Selektivität für die Extraktion von bestimmten  $\beta$ -Blocker verbessert werden kann [119].

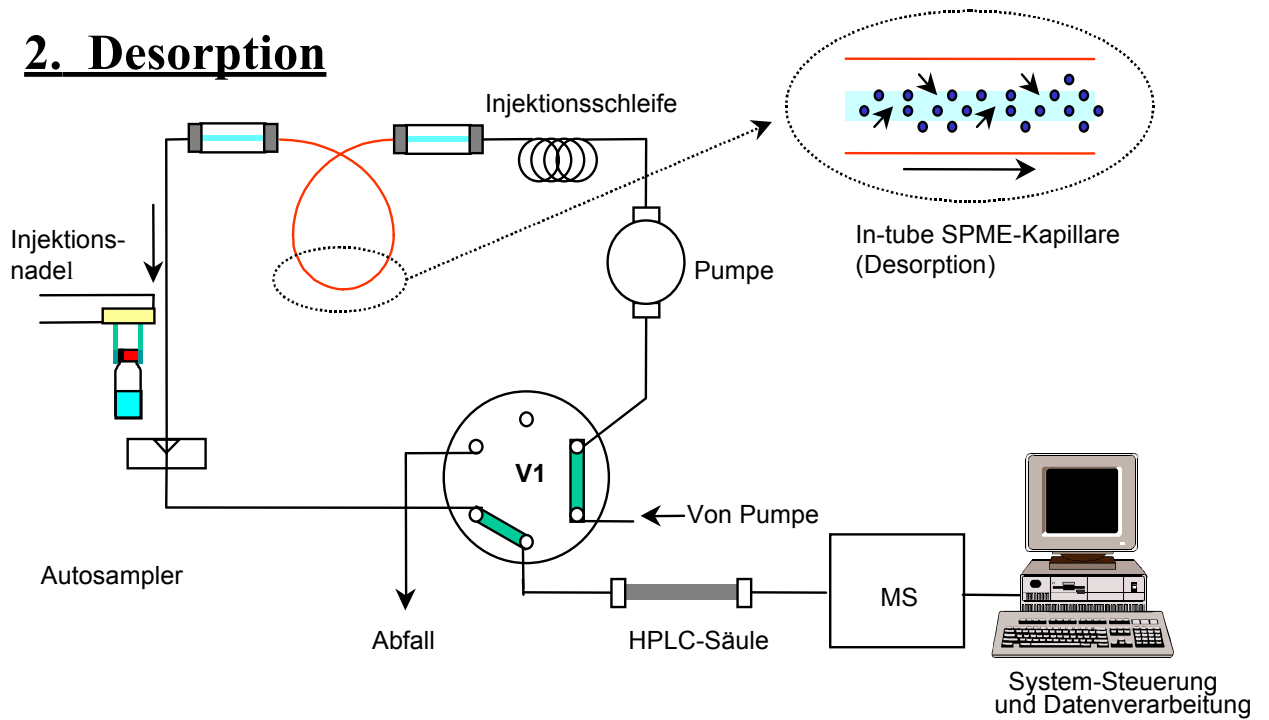
Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die in-tube SPME durch die beschriebenen Vorteile durchaus eine attraktive Alternative zu bereits etablierten Probenvorbereitungsmethoden wie SPE darstellt.

Abb. 15: Schematische Extraktion und Desorption mittels in-tube SPME

## 1. Extraktion



## 2. Desorption



mit V1: internes Schaltventil des Autosamplers

## **2.2. Chromatographie**

Nachdem die biologische Probe durch die im vorangehenden Kapitel beschriebenen Methoden aufbereitet wurde, müssen die Arzneistoffe und Metaboliten voneinander getrennt werden, um sie anschließend detektieren zu können.

Hierfür eignen sich insbesondere die Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), da sie eine hohe Trennleistung garantieren. Die Gaschromatographie ist nur für flüchtige, unpolare Substanzen geeignet. Polare Substanzen, wie z. B. Phase-II-Konjugate von Arzneistoffmetaboliten müssten vorher derivatisiert werden, bevor sie chromatographiert werden können. Bei einem Gaschromatographen, der in einem Temperaturbereich von 200-300°C arbeitet, ist die thermische Belastung relativ hoch, so daß sich empfindliche Substanzen bei diesen Temperaturen zersetzen.

Die HPLC erlaubt eine Trennung unter schonenderen Bedingungen. Die Substanzen unterliegen keiner thermischen Belastung und polare Substanzen wie Phase-II-Konjugate müssen nicht derivatisiert werden.

Im folgenden Kapitel werden Parameter beschrieben, die bei der HPLC-Trennung berücksichtigt werden müssen, wie z. B. Wahl des Sorbens, Säulendimension und Wahl der mobilen Phase.

### **2.2.1. Wahl des Sorbens**

Die Wahl des Sorbens ist wichtig für eine gute Chromatographie. In der Regel werden sogenannte Reversed Phase (RP)-Materialien verwendet. Das sind hydrophobe C4-, C8- oder C18-Alkylketten, die auf Kieselgel immobilisiert sind. Es gibt aber auch noch eine Reihe anderer Materialien, auf die hier nicht eingegangen wird.

Polare Substanzen, wie Arzneistoffmetaboliten, werden besser auf RP4 oder RP8 Material retiniert, während unpolare Substanzen am besten auf RP18-Material retiniert werden.

Für die Trennleistung ist der Partikeldurchmesser von Bedeutung. Die gängigen HPLC-Säulen sind meist mit Sorbentien der Größe 4 bis 5 µm gefüllt, was eine ausreichende Wechselwirkung der Analyten mit den Sorbentien und einen damit verbundenen hohen Trennfaktor garantiert. Säulen, die mit Sorbentien einer Partikelgröße von 3 oder 4 µm gefüllt sind, haben eine größere spezifische Oberfläche und somit treten noch höhere Wechselwirkung zwischen Analyt und Sorbens auf, was

meistens zu einer besseren Trennung führt.

### **2.2.2. Auswahl der Säulendimension**

Die Trennleistung einer Säule hängt auch von ihrer Länge ab. Komplizierte Trennungen werden deshalb mit länger dimensionierten Säulen durchgeführt, da der Trennfaktor höher ist. Ein gängiges Format ist eine Länge von 250 mm mit einem inneren Durchmesser von 4 mm. Die Wahl einer längeren Säule hat aber auch eine Erhöhung der Chromographiezeit zur Folge. Sollen bevorzugt nur wenige Substanzen getrennt und bestimmt werden, wie zum Beispiel beim Erstellen einer Pharmakokinetik, so werden vorzugsweise kürzere Säulen von 125 bis 150 mm Länge verwendet. Bei einem hohen Probendurchsatz garantiert die Verwendung von kürzeren Säulen eine kürzere Analysenzeit bei verminderter Trennleistung.

Die Trennung der Analyten auf Säulen mit einem Innendurchmesser (4 mm) und größerer Korngröße (5  $\mu\text{m}$ ) werden in der Regel bei höheren Flußraten (1 ml/min) erreicht. Bei niederen Flußraten nimmt die longitudinale Diffusion der Analyten in der mobilen Phase in das Säulenmaterial zu, was zu Peakverbreiterungen führen kann.

Wird die HPLC mit einem Massenspektrometer gekoppelt, so muß die Flußrate auf jeden Fall reduziert werden ( $\leq 0.2$  ml/min), wenn die Analyten mit der Electrospray-Ionization (ESI) ionisiert werden sollen. Mit anderen Interfaces (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI) können auch höheren Flußraten (bis zu 1 ml/min) bei der Kopplung verwendet werden.

Die Reduktion der Flußrate kann einerseits dadurch erreicht werden, daß der Eluent vor Eintritt in das ESI-Interface mit einem Splitter z. B. im Verhältnis 1:4 aufgeteilt wird (z. B. von 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Da so ein Großteil der Analyten verloren geht, kann es unter Umständen zu einer verminderten Meßempfindlichkeit kommen.

Eine Verwendung von Säulen mit einem geringeren Durchmesser (2 mm) und einer Partikelgröße von 3 oder 4  $\mu\text{m}$  erlaubt eine direkte Kopplung der HPLC mit dem ESI-Interface bei maximaler Empfindlichkeit.

Wird die Probenvorbereitung durch eine Säulenschaltung mit einer Vorsäule durchgeführt (siehe 2.1.2.1), so müssen sowohl die Säulendimensionen als auch die Flußrate berücksichtigt werden. Die beschriebenen RAM-Vorsäulen haben eine Dimension von 25 x 4 mm (I.D.). Da die Analyten im Backflushverfahren auf die Säule transferiert werden, muß die Flußrate mindestens zwischen 0.6 und 1.0 ml/min liegen, damit eine ausreichende Fokussierung der Analyten auf der analytischen

Säule erzielt wird und es in der Folge nicht zu Peakverbreiterungen kommt. Die anschließende Chromatographie auf der analytischen Säule muß bei einer ähnlichen Flußrate erfolgen, so daß bei einer Kopplung mit einem Massenspektrometer der Fluß vor Eintritt in das ESI-Interface reduziert werden muß (auf maximal 200 µl/min).

### **2.2.3. Wahl der mobilen Phase**

Die mobile Phase besteht bei RP-Phasen meist aus einem organischen Lösemittel wie Methanol oder Acetonitril und einer wäßrigen Lösung. Bei der Verwendung einer HPLC-MS Kopplung mit ESI-Interface werden diese Lösemittel am häufigsten verwendet, da sie die höchsten Ionisierungsausbeuten liefern. Bei der HPLC-NMR Kopplung werden bevorzugt Acetonitril, Methanol und D<sub>2</sub>O verwendet.

Die chromatographischen Eigenschaften können in der Regel durch Zusatz von Puffer in der mobilen Phase verbessert werden. Bei der HPLC-MS-Kopplung wird aber generell auf die Verwendung von anorganischen Puffern wie Phosphate und Sulfate verzichtet, weil diese die Funktionstüchtigkeit des Gerätes beeinträchtigen, da sie sich in der Ionenquelle ablagern und Kapillaren und Lochblenden mit der Zeit zusetzen würden. Organische Puffer zersetzen sich thermisch nahezu vollständig und werden bei der Massenspektrometrie bevorzugt, da diese zu keinen Verunreinigungen führen. Die Addition von Ammoniumacetat- oder Ammoniumformiatlösung wird oft genutzt, um die chromatographische Auflösung von basischen Komponenten auf Reversed-Phase-Silica-Säulen zu verbessern. Diese Zusätze verbessern nicht nur die Peakform, sondern erhöhen auch das Signal und verbessern die Empfindlichkeit. Allerdings können die verwendeten Puffer die Ionisierung in manchen Fällen unterdrücken. Trifluoressigsäure (TFA) wird zum Beispiel zur Chromatographie von Peptiden und Proteinen genutzt. TFA verbessert die chromatographische Auflösung, während es die Ionenbildung unterdrückt und ist daher für die HPLC-MS-Kopplung nicht geeignet.

Bei der HPLC-NMR-Kopplung hingegen werden Phosphatpuffer bevorzugt, da sie in der <sup>1</sup>H NMR keine zusätzlichen Signale erzeugen. Bei der HPLC-NMR-MS-Kopplung hingegen müssen wieder organische Puffer eingesetzt werden. Hier wird bevorzugt das Ammoniumformiat verwendet, da es in der <sup>1</sup>H NMR nur wenige Signale erzeugt.

Puffer werden auch genutzt, um den pH-Wert der mobilen Phase einzustellen, da die chromatographischen Eigenschaften von einigen Analyten durch Wahl des

optimalen pH-Werts verbessert werden können. Der pH-Wert der mobilen Phase sollte so eingestellt sein, daß dissoziierbare Verbindungen in der undissoziierten Form vorliegen. Bei der Chromatographie von Glucuroniden ist außerdem zu berücksichtigen, daß einige bei einem pH-Wert niedriger als 5 sich anfangen zu zersetzen. Andererseits ist von einem pH-Wert größer als 8 abzuraten, da ab diesem Wert die Spaltung der Alkyreste vom Kieselgel einsetzt.

#### **2.2.4. Wahl der Elutionsbedingungen**

Die Elution der Analyten kann entweder isokratisch mit konstanter Lösemittelzusammensetzung oder unter Verwendung eines Lösemittelgradienten durchgeführt werden. Die Verwendung eines Gradienten hat den Vorteil, daß sowohl relativ polare Analyten, wie z. B. Glucuronide, als auch unpolare Substanzen wie die Mutterverbindung in relativ kurzer Zeit getrennt von der Säule eluiert werden können.

Allerdings muß die Säule nach beendeter Chromatographie wieder mit der Ausgangszusammensetzung der mobilen Phase äquilibriert werden, was mitunter viel Zeit beanspruchen kann. Durch eine isokratische Elution kann diese Verzögerung vermieden werden. Allerdings können sehr polare von sehr unpolaren Substanzen nur sehr schlecht getrennt werden. Bei Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor ist die verminderte Trennung nicht unbedingt nachteilig, da nicht chromatographisch aufgelöste Peaks durch Extraktion ihrer Ionenspuren getrennt werden können. Bei der Chromatographie von unbekanntem Analyten, wie z. B. Arzneistoffmetaboliten, die nicht als Referenzsubstanzen vorliegen, können unter isokratischen Bedingungen die Ionisierungsausbeuten der Substanzen, die auch maßgeblich von der Lösemittelzusammensetzung abhängen, besser miteinander verglichen werden.

### 2.3. Detektionsmethoden

Für die Detektion der Analyten gibt es prinzipiell mehrere Möglichkeiten. So können die Signale mit einem UV- oder Fluoreszenzdetektor aufgezeichnet werden, sofern die Verbindung UV- oder fluoreszenzaktiv ist. Diese Verfahren haben aber den Nachteil, daß sie keinen Beitrag zur Strukturaufklärung liefern und die Identifizierung allein über die Retentionszeit einer Referenzverbindung erfolgen muß.

Die Massenspektrometrie und die Kernresonanzspektroskopie (NMR) liefern dagegen viele Strukturinformationen über unbekannte Verbindungen. Auf einige Grundlagen der Meßtechnik wird im folgenden Kapitel eingegangen.

#### 2.3.1. HPLC-MS-Kopplung

Die Analyten müssen für eine Analyse in einem Massenspektrometer in ionisierter Form in der Gasphase vorliegen. Nach der HPLC-Chromatographie liegen die Analyten noch in gelöster Form im Eluenten vor. Die Ionisierung und Überführung in die Gasphase wird über ein ESI-Interface erreicht, das bei Atmosphärendruck arbeitet und in dem folgende Prozesse ablaufen:

- Spray-Bildung
- Ionisierung der Analyten
- Verdampfen des Lösemittels

Die Spraybildung beginnt, wenn der HPLC-Eluent durch eine Nadel oder Kapillare in die Sprühkammer eintritt. Durch ein koaxiales Rohr, das die Nadel umgibt, wird das Spraygas konzentrisch in die Kammer eingeleitet. Die Kombination mit einem starken elektrischen Feld (2-6 kV) sorgt zusätzlich dafür, daß die eingespritzte Lösung zerstäubt und die Tröpfchen geladen werden. Ein neutrales, geheiztes Trockengas, normalerweise Stickstoff, das je nach Ionenquelle koaxial mit dem Eluenten oder tangential hinter einer Lochblende eingeführt wird, bzw. eine beheizte Kapillare zwischen der Ionenquelle bei Atmosphärendruck und der ersten Vakuumkammer sorgen für eine Verdampfung des Lösemittels. Durch das angelegte elektrische Feld sammeln sich vorgeformte Ionen der gleichen Polarität auf der Oberfläche der Tropfen. Wenn die Coulomb-Abstoßung der Oberflächenladung die Oberflächenspannung der Tröpfchen übersteigt, platzen die Tröpfchen in kleinere Tochtertröpfchen mit hoher Oberflächenladungsdichte und durch die damit verbundene Dispersion entsteht ein feines Spray aus geladenen Tröpfchen, das Electrospray. Ab einer Ladungsdichte von ca.  $10^8$  V/cm<sup>2</sup> liegen freie Ionen vor. Für

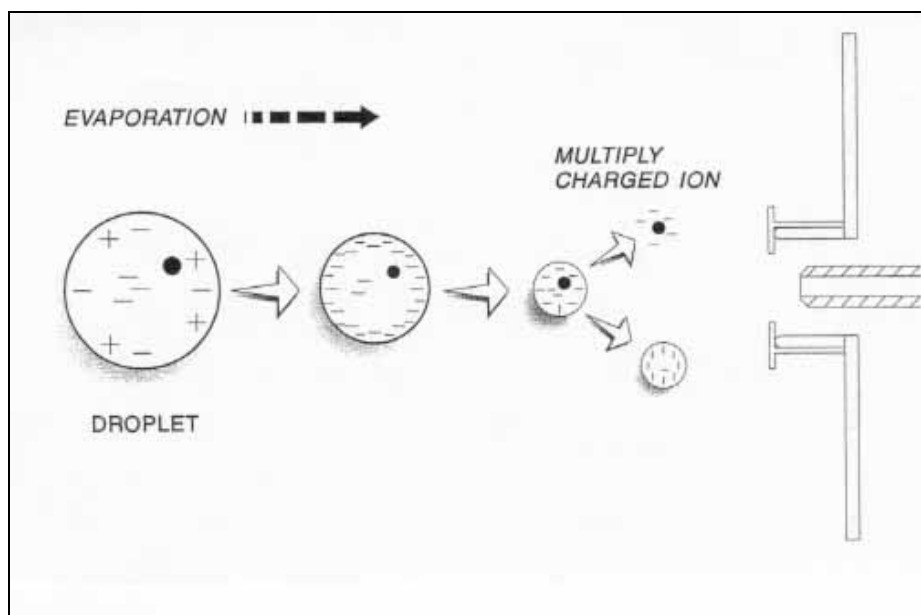


diesen letzten Schritt der Desolvatisierung werden zwei unterschiedliche Mechanismen in der Literatur diskutiert. Iribarne und Thomson vermuteten [120-122], daß die Ionen direkt in die Gasphase emittiert werden, wenn die Tröpfchen klein genug sind (Ion-Evaporation). Dieser Mechanismus wird im allgemeinen für die ESI-Ionisierung von kleinen Molekülen ( $M < 500$ ) angenommen. Dole et al. [123] postulierten, daß bei der Desolvatisierung der Tröpfchen die Ladung auf dem Ion erhalten bleibt, so daß der Analyt nach beendeter Desolvatisierung ionisiert in der Gasphase vorliegt (Charge-Residue-Mechanismus). Dieser Mechanismus soll vor allem für Biopolymere mit hohen Molekulargewichten gelten. Der Evaporation-Prozess ist in Abb. 16 dargestellt.

Da die Probelösung nicht geheizt wird, wenn das Aerosol erzeugt wird, werden die meisten Analyten durch das Electrospray thermisch nicht zersetzt.

Die geladenen Tröpfchen enthalten den Analyten in neutraler und ungeladener Form, Lösemittel sowie Ionen des Puffers. Die Art der Ionen, die erzeugt werden, hängt von der Zusammensetzung des Sprays ab. Wenn zum Beispiel die Lösung den Analyten in saurer wäßriger Lösung mit einem positiven Potential an der Nadel enthält, werden die gebildeten Ionen sich vor allem aus  $H_3O^+$  und positiv geladenen Analytionen  $[M+H]^+$  zusammensetzen.

**Abb. 16:** Schematische Darstellung des Desolvatisierungsprozesses (entnommen aus Bruker-Daltonik Esquire-LC-Manual)



Nach der Ionisierung werden die Ionen über ein Linsensystem fokussiert und gelangen so in den Massenanalysator. Für die Strukturaufklärung von unbekanntem

Verbindungen haben sich in den letzten Jahren die dynamischen Massenfilter wie die Ionenfalle durchgesetzt.

### 2.3.1.1. Ionenfallenmassenspektrometer

Paul beschrieb bereits 1956 ein Gerät, mit dem Ionen in der Gasphase in einem kleinen evakuierten Volumen nur durch elektrische Felder stabilisiert und über einen Zeitraum von mehreren Sekunden isoliert und stabilisiert werden konnten. Dieses Prinzip machte man sich erst spät für die Massenspektroskopie zu Nutze, da die Ionenfalle sich zu Beginn nicht gegen die zweidimensionale Variante, den Quadrupolmassenfilter, der ebenfalls von Paul entwickelt wurde, durchsetzen konnte. Allerdings kam 1989 das erste kommerzielle Gerät, als Detektor für ein GC, auf den Markt. Für die Entwicklung der Ionenfalle wurde Paul 1989 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Die Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei „Endcap-Elektroden“. Die innere Oberfläche dieser Elektroden hat ein hyperbolisches Profil. Öffnungen im Zentrum der „Endcap-Elektroden“ erlauben es den Ionen, in und aus der Ionenfalle zu gelangen. An den Ring werden ein hohes Wechselspannungspotential, das im Radiofrequenzbereich liegt (engl. **R**adio **F**requency: RF<sup>4</sup>), und ein Gleichspannungspotential gelegt, wobei letzteres häufig gleich Null gesetzt wird. An den „Endcap-Elektroden“ liegt ein Gleichspannungspotential an. Die oszillierende Potentialdifferenz zwischen der Ringelektrode und den „Endcap-Elektroden“ erzeugt ein Quadrupolfeld. Je nach Höhe der angelegten Wechselspannung kann das erzeugte Quadrupolfeld Ionen eines bestimmten Massenbereiches stabilisieren. Das Quadrupolfeld läßt sich als dreidimensionales Loch oder als Pseudo-Potentialtopf beschreiben [124]. Die Tiefe des Loches bzw. Topfes hängt von der Masse des Ions und der Höhe der Wechselspannung ab. Der Massenbereich, über dem sich Ionen in der Falle stabilisieren lassen, ist groß genug, so daß mit der Ionenfalle Full-Scan-Spektren bei einer hohen Intensität aufgenommen werden können. Ein schematischer Darstellung der Ionenfalle ist in Abb. 17 gezeigt.

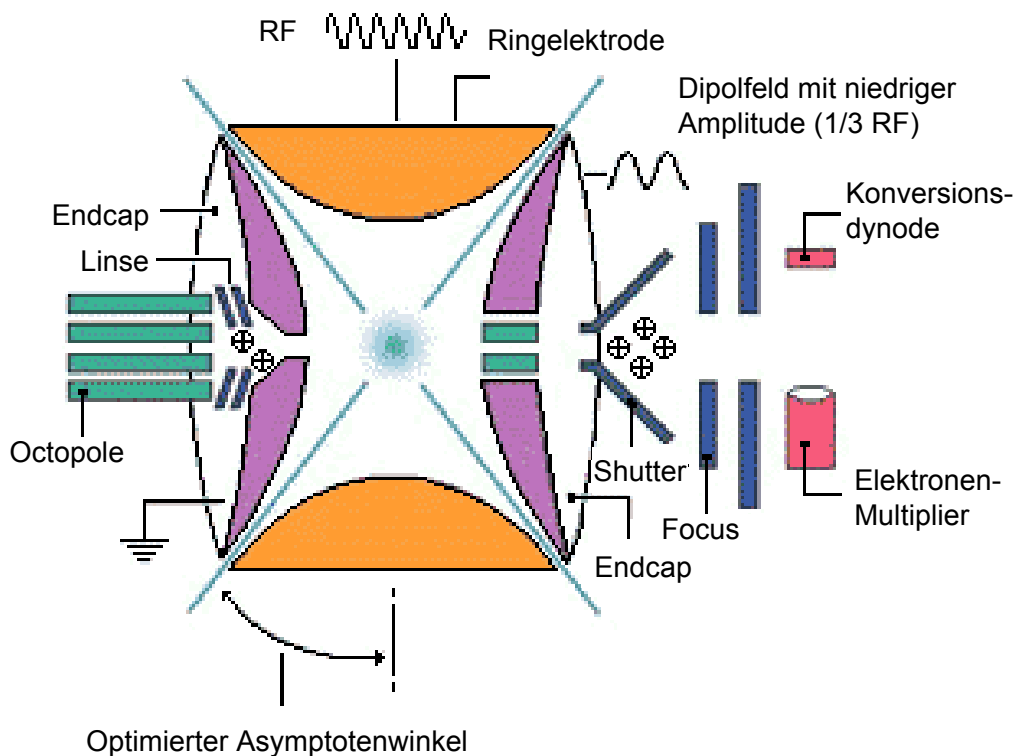
Da die Ionen nicht in der Falle erzeugt werden, sondern in einer externen Quelle, muß es einen Mechanismus geben, sie innerhalb der Falle im Pseudo-Potentialtopf zu stabilisieren. Hierzu muß die kinetische Energie der Ionen und damit ihre

---

<sup>4</sup> RF im Falle der Ionenfalle des Esquire:  $\omega = 781 \text{ kHz}$

Schwingungsamplitude reduziert werden. Dafür wird ein Kollisionsgas in die Falle eingelassen, das durch Stöße mit den Analytionen deren kinetische Energie soweit verringert, daß sie die Falle nicht vorzeitig verlassen, sondern vielmehr im Zentrum der Falle akkumuliert werden, ohne jedoch zu fragmentieren. Steigt die Konzentration der Ionen stark an, so treten Raumladungen auf, die eine geringere Auflösung und Intensität zur Folge haben. Andere Faktoren, die die Effizienz der Falle beeinflussen, sind die Energie des eintreffenden Ionenstrahls, das Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) des Ions, die Tiefe des Potentialtopfes und die Phase der Wechselspannung für jedes Ion am Injektionszeitpunkt.

**Abb. 17:** Schematische Darstellung einer Ionenfalle (entnommen aus <http://www.bruker.com>)



Die Effizienz variiert beträchtlich, aber bei einem Betriebsdruck innerhalb der Falle von 1-5 mbar kann man für ein einfach geladenes Ion mit einem  $m/z$ -Wert von 500 eine Trapping-Effizienz von annähernd 5 % erwarten. Da man in der Falle Ionen über eine gewisse Zeitdauer stabilisieren kann, kann man auch Ionen über eine gewisse Zeit akkumulieren. Wenn das Ionensignal stark ist, liegen die Akkumulationszeiten bei 10  $\mu$ s, können aber bei Spurenanalysen bis auf 1 s ansteigen. Typische Akkumulationszeiten für HPLC-MS und HPLC-MS<sup>n</sup>-Experimente reichen von 0.01 ms bis 200 ms.

Die Ionen, die in der Falle isoliert werden, erfahren sowohl eine axiale als auch eine radiale Bewegung. Die axiale Bewegung in der Richtung der Endcaps (z-Achse) ist von großer Bedeutung, weil dies die Richtung des Ioneneinlasses und -auslasses ist. Das Quadrupolfeld erzeugt eine oszillierende harmonische Bewegung der Ionen. Die aktuelle Frequenz der oszillierenden Ionen wird durch das m/z Verhältnis des Ions und der Amplitude der Wechselspannung bestimmt.

Das Potential in der Falle entsteht durch Überlagerung der Gleichspannung an den „Endcap-Elektroden“ mit der Wechselspannung an der Ringelektrode und wird durch folgende Gleichung beschrieben, sofern das Gleichspannungspotential an der Ringelektrode Null beträgt:

**Gleichung 9** 
$$(U + V \cos \omega t) \left( \frac{r^2 - 2z^2}{4z_0^2} \right),$$

U bezeichnet die angelegte Gleichspannung,  $\omega$  bezeichnet die Frequenz und V die Amplitude der angelegten Wechselspannung, z die Symetrieachse in z-Richtung und r den radialen Abstand von der z-Achse. Die Ionenbewegung in der Falle wird durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

**Gleichung 10** 
$$\frac{d^2x}{d\gamma^2} + (a_x + 2q_x \cos 2\gamma)_x = 0 \quad \text{mit } x = r \text{ oder } z$$

Die Lösungen der Differentialgleichung werden durch die Mathieugleichungen mit

den Parametern a und q beschrieben:

$$a_z = -2a_r = \frac{4eU}{mz_0^2\omega^2}$$

$$q_z = -2q_r = \frac{2eV}{mz_0^2\omega^2}$$

$$\gamma = 1/2 \omega t$$

Der Massenbereich, der in einer Ionenfalle stabilisiert werden kann, wird in einem Stabilitätsdiagramm beschrieben. Das Stabilitätsdiagramm ist eine zweidimensionale Auftragung der Parameter a und q, die beschreibt, für welches Potential (sowohl das Wechselspannungspotential als auch das Gleichspannungspotential zwischen den „Endcap-Elektroden“) Ionen mit einem bestimmten m/z-Wert in dem Quadrupolfeld stabil bzw. instabil sind. In Abb. 18 wird das Stabilitätsdiagramm schematisch dargestellt.

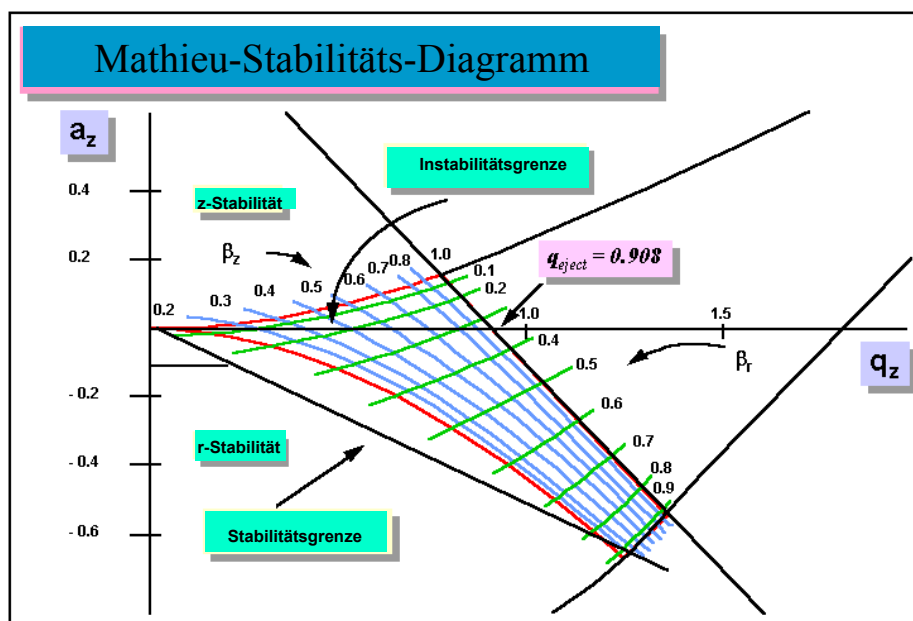
Bei den meisten Ionenfallen-Massenspektrometern, bei denen an die Endcap-Elektroden ein Nullpotential gelegt wird, muß der q-Wert unter 0.908 liegen. Bei einem höheren Wert sind die Ionen in der Falle instabil und verlassen diese. Die

Frequenzen der sinusoiden Ionenbewegungen sind mit dem Parameter  $\beta$  verknüpft. Die Eigenbewegung der Ionen wird durch die Eigenfrequenz der Ionen beschrieben:

**Gleichung 11**                      Eigenfrequenz der Ionen =  $\left(\frac{\beta}{2}\right)\omega$

Sie beträgt nur einen Bruchteil von  $\omega$ . Die Lösung der Mathiegleichungen erlaubt stabile Bewegungen für Ionen in der Falle für  $\beta$ -Werte zwischen 0 und 1.

**Abb. 18:** Stabilitätsdiagramm einer Ionenfalle (entnommen aus <http://www.chem.purdue.edu/cooks/trap/text/trapsim.html>)



Normalerweise arbeiten die meisten Ionenfallen-Massenspektrometer im RF-only-Modus, d. h. daß nur die Amplitude der Wechselspannung verändert wird, nicht aber das Gleichspannungspotential (Linie im Diagramm). Wenn die Amplitude der Wechselspannung im Diagramm für eine gegebene Masse erhöht wird, so wandert die Masse auf der Linie zu höheren  $q$ -Werten. Für jeden gegebenen Punkt in der Stabilitätsregion des Diagramms erfährt das Ion eine unterschiedliche Potentialtopftiefe und eine unterschiedliche Frequenz, mit der es sich bewegt. Dies kann man sich beispielhaft an einem Pendel vorstellen. Wenn man die Länge eines schwingenden Pendels verändert, so ändert sich auch seine Schwingung- bzw. Oszillationsfrequenz. Aus dem Stabilitätsdiagramm resultiert ein wichtiges Konzept für die Ion-Trap, das Prinzip der „Cut-Off“-Masse. Das Diagramm zeigt, daß eine Masse existieren muß, die in dem Feld noch gerade stabil ist. Das bedeutet, daß alle Ionen, die eine noch kleinere Masse haben, instabil sein müssen. Im Diagramm sind

dies die Massen mit  $q_z$ -Werten, die größer als die  $\beta_r$  Werte sind. Die Höhe der „Cut-Off“-Masse hängt von der Höhe des Wechselspannungspotentials ab und kann als Masse beschrieben werden, deren Frequenz ungefähr die Hälfte der Wechselspannungsfrequenz (also ca.  $\Omega/2 = 390.5$  kHz) ist. Theoretisch gibt es keine Obergrenze für die Massen. Aus praktischen Gründen gibt es aber eine Obergrenze, die bei dem 20- bis 30-fachen der „Cut-Off“-Masse liegt. Ionen mit einem  $m/z$ -Wert darüber werden nicht ausreichend stabilisiert.

Um die Ionenfalle als Massenspektrometer zu nutzen, müssen die Ionen einem Detektor zugeführt werden. Sie müssen also das Feld verlassen, ohne zu zerfallen. Wenn man ein Hilfsfeld an die beiden „Endcap“-Elektroden anlegt, dessen Frequenz der Schwingungsfrequenz der sich bewegenden Ionen entspricht, so können diese die Energie aufnehmen (Resonanzbedingung). Dabei spielen in der Praxis nichtlineare Resonanzen eine Rolle. Da das Quadrupolfeld nicht homogen ist, sondern auch Anteile eines Hexapol- oder Octopolfeldes beinhaltet, ist das in der Ionenfalle wirkende Potential nicht zweiter, sondern höherer Ordnung. Als Resultat können bei bestimmten Werten von  $\beta_z$  die Ionenbewegungen in Resonanz mit dem angelegten Feld treten und instabile Bereiche hervorrufen. In der Praxis hat die nichtlineare Frequenz einen Wert von  $\omega/3$ . Wenn die Amplitude der Wechselspannung auf einen bestimmten Wert erhöht wird, nehmen alle Ionen mit kleineren Werten für die Eigenfrequenz als  $\omega/3$  Energie auf und werden in  $z$ -Richtung aus der Falle beschleunigt. In der Praxis wird ein Hilfsfeld mit einer eingestellten Frequenz an die „Endcap“-Elektroden angelegt und die RF-Spannung linear gerammt (Scan-Modus). Ionen mit bestimmtem  $m/z$ -Wert können so in Resonanz mit dem angelegtem Feld treten und werden aus der Falle geschleudert. Für das Masse-Ladungsverhältnis der herausgeschleuderten Ionen gilt:

**Gleichung 12** 
$$\frac{m}{z} = \frac{4V}{q_{\text{eject}} r_0^2 \omega^2},$$

wobei  $r_0$  den internen Radius der Ionenfalle (1 cm),  $V$  die Amplitude und  $\omega$  die Frequenz der Wechselspannung (RF-Voltage) bezeichnet.  $q_{\text{eject}}$  beschreibt den Wert, an dem die Ionen in der Falle instabil werden (0.908).

Bevor ein einzelnes Ion in der Falle durch Stoß zum Zerfall angeregt wird, müssen alle anderen Ionen aus der Falle entfernt werden. Durch Einstrahlen von Breitbandresonanzen, die für alle Ionen die entsprechende Frequenz tragen, außer für das

Targetion, kann dies erreicht werden.

Durch Anlegen eines äußeren Dipolfeldes an die „Endcaps“ werden die Ionen durch zusätzliche Resonanzanregung zur Aufnahme von Energie angeregt. Die Amplitude der Anregung ist geringer als die, die normalerweise zum Entfernen der Ionen aus der Falle benutzt wird. Die Energieabsorption erhöht die kinetische Energie der Teilchen.

Die Ionen beginnen mit dem Helium in der Falle zu kollidieren, wobei die kinetische Energie in die innere Energie der Ionen umgewandelt wird. Sie werden angeregt und dissoziieren. Die Produktionen können wiederum mit einer hohen Effizienz (100 %) isoliert und weiter fragmentiert werden. Die Produktionen enthalten normalerweise nur noch wenig Energie, so daß sie nicht spontan weiterzerfallen.

Dieser Prozess ist in mehreren Schritten wiederholbar. Wie oft der Prozeß wiederholbar ist, hängt sehr stark von der zu analysierenden Substanz ab. Diese Fragmentierung in mehreren Stufen wird auch als  $MS^n$  bezeichnet. Aus den Produktionen können dann wertvolle Strukturinformationen entnommen werden. Die Ionenfalle ist deshalb als Instrument zur Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen wie Arzneistoffen weit verbreitet, weil diese auch noch in sehr geringen Konzentrationen untersucht werden können.

#### **2.3.1.2. Quantifizierung**

Das Auftreten von Raumladungen in der Falle durch Überladung mit Ionen kann zu einer verminderten Funktionsfähigkeit der Falle führen. Der Einstrom der Ionen in die Falle wird deshalb ständig kontrolliert. Somit ist der Ioneneinstrom kein kontinuierlicher Prozeß und in der Folge kann die Signalintensität schwanken, was zu einer verminderten Präzision und Reproduzierbarkeit führt. Mit Ionenfallenmassenspektrometern lassen sich Analyten daher nicht so gut quantifizieren wie mit einem Quadrupolfilter.

Ein weiterer Punkt ist, daß bei der ESI-Ionisierung kleine Änderungen in der Polarität zu großen Änderungen in der Ionisierungsausbeute und somit in der Signalintensität führen können. Die Struktur von unbekanntem Analyten läßt sich durch das mehrstufige Isolieren und Fragmentieren bis auf weiteres aufklären, eine Quantifizierung ohne Referenzsubstanz ist allerdings nur schwer möglich.

Für die Quantifizierung von unbekanntem Arzneistoffmetaboliten hat sich der Einsatz von radioaktiv markierten Arzneistoffen mit anschließender Scintillationsmessung

bewährt, deren Meßempfindlichkeit allerdings schlechter als die der Massenspektrometrie ist [125].

### **2.3.2. HPLC- NMR- Kopplung**

Leider kann die Massenspektrometrie nicht alle notwendigen Informationen liefern, die für ausreichende Strukturaufklärung z. B. von isomeren Verbindungen notwendig sind. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht durch ihre experimentelle Vielfalt ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, 2D Experimente [126]) die eindeutige Identifizierung dieser Verbindungen. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie ist, daß sie im Vergleich zur Massenspektroskopie relativ unempfindlich ist. Auch können mit der gängigen  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie Sulfatkonjugate von Metaboliten nicht bestimmt werden, da Schwefel-Kerne nicht NMR-aktiv sind.

Dennoch hat sich die NMR-Spektroskopie gerade in Kopplung mit der HPLC in der Metabolismusforschung für die Untersuchung von biologischen Matrices durchgesetzt [127].

Die Isolierung der Analyten mit anschließender Aufreinigung für die NMR-Spektroskopie ist sehr aufwendig. Durch Kopplung der NMR-Spektroskopie mit der HPLC können diese Matrixkomponenten vorher abgetrennt werden.

Der Aufbau der HPLC-NMR ist relativ unkompliziert [128] und in Abb. 19 dargestellt. Das Chromatographiesystem besteht aus einer konventionellen HPLC-Anlage mit UV-Detektor, an dem eine Schalteinheit angeschlossen ist, die die Möglichkeit zum Peakeinfang in Kapillaren bietet (Bruker Peak Sampling Unit: BPSU). Im Gegensatz zur konventionellen offline NMR-Probenköpfen, in denen NMR-Röhrchen in einem Glaseinsatz rotieren, besteht der Durchflußprobenkopf aus einem gebogenen Glasrohr. Die Enden des Glasrohrs werden über eine Kapillare mit dem HPLC-System verknüpft. Die aktiven Detektionsvolumina von HPLC-NMR-Probenköpfen liegen mit 30-120  $\mu\text{l}$  deutlich über denen von UV-Detektoren.

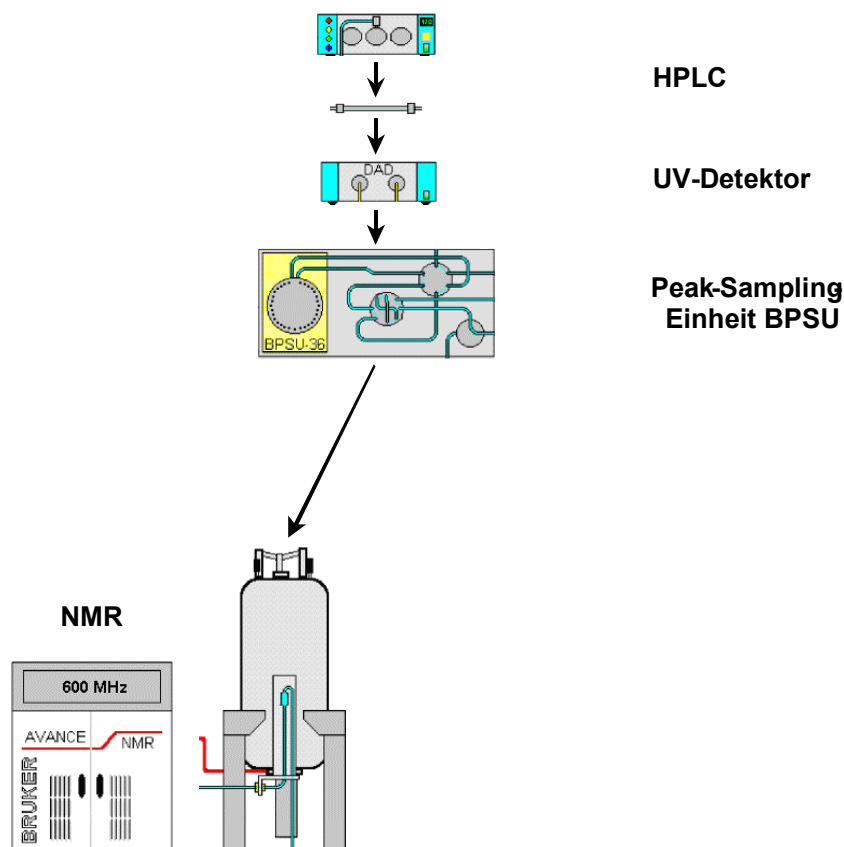
Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten, die HPLC-NMR Experimente durchzuführen.

Im sogenannten On-Flow-Modus werden kontinuierlich NMR-Spektren ohne Unterbrechung des chromatographischen Laufs aufgenommen. Das Ergebnis sind eine Reihe von eindimensionalen (1D) NMR-Spektren, die ein sogenanntes NMR-Chromatogramm darstellen. Im On-Flow-Modus muß ein Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Auflösung der chromatographischen Zeitachse getroffen werden. Um bei gleicher Auflösung mehr Scans aufnehmen zu können, muß die Flußrate



relativ niedrig sein. Üblicherweise liegen die Flußraten bei On-Flow-Experimenten zwischen 0.2-1 ml/min [129]. Ein On-Flow-Chromatogramm wird dann sinnvoll eingesetzt, wenn zunächst ein Überblick über eine Probe unbekannter Zusammensetzung gewonnen werden soll.

**Abb. 19:** Schematischer Aufbau der HPLC-NMR-Kopplung



Im sogenannten Stopped-Flow-Modus wird der Peak zuerst vom UV-Detektor erkannt. Die Pumpe wird angehalten, sobald sich der Substanzpeak im Probenkopf befindet. Gleichzeitig wird in der BPSU ein Schaltventil geschlossen, um den Druck auf der Trennsäule aufrecht zu erhalten und um ein genaues Positionieren des Peaks im NMR-Probenkopf zu ermöglichen. Die erforderliche Zeit zwischen Peakerkennung und Ausschalten der Pumpe ist die sogenannte Transferzeit. Sie hängt vom Volumen der Kapillaren zwischen UV-Detektor und NMR-Meßzelle ab und wird experimentell bestimmt [129].

Im Stopped-Flow-Modus steht ausreichend Zeit zur Verfügung, um auch von Nebenkomponten Spektren zu akkumulieren. Typische Werte liegen etwa bei 128 bis 1000 Scans, für die zwischen fünf Minuten und einer Stunde benötigt werden. Darüber hinaus können auch zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden. Die Peakerkennung durch den UV-Detektor und der Transfer der Peaks

findet in Automation durch die HPLC-Software statt. [129].

Für die HPLC-NMR werden Säulen mit einem größeren Innendurchmesser (4 mm) verwendet, da die zu untersuchende Analyten wegen der geringeren Empfindlichkeit in höheren Konzentrationen auf die Säule injiziert werden.

Die mobile Phase besteht meist aus Acetonitril oder deuteriertem Methanol und einer D<sub>2</sub>O-haltigen Phase. Die chromatographischen Eigenschaften des D<sub>2</sub>O unterscheiden sich etwas von denen des H<sub>2</sub>O, wodurch Retentionsunterschiede im Chromatogramm im Vergleich zur konventionellen HPLC-Chromatographie mit H<sub>2</sub>O-haltigem Eluenten auftreten können. Auch der pD-Wert unterscheidet sich vom pH-Wert. Für die HPLC-NMR wird der pD-Wert mit Phosphat- oder Ammoniumformiatpuffern eingestellt, da diese keine oder nur wenige Signale im <sup>1</sup>H NMR erzeugen.

Die Restprotonensignale des Acetonitrils im <sup>1</sup>H NMR lassen sich durch bestimmte Pulssequenzen, wie der WET-Sequenz mit WET-Pulsfolge, unterdrücken.

Insgesamt stellt die HPLC-NMR Kopplung zusammen mit der HPLC-MS<sup>n</sup> eine effektive Methode zur Untersuchung von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten dar und wurde schon einige Male erfolgreich eingesetzt [42, 127].

#### **2.4. Literaturübersicht zur Verapamilanalytik**

Verapamil ist ein weitverbreiteter Calciumantagonist, der schon seit vielen Jahren auf dem Markt ist. Der Metabolismus dieses Medikamentes ist deshalb relativ gut erforscht.

In den grundlegenden veröffentlichten Studien zum Metabolismus, auf die schon in Kapitel 1.6.4 eingegangen worden ist, wurden die Metaboliten mit Hilfe der GC-MS mit Derivatisierung bestimmt. Da die Derivatisierung relativ zeitaufwendig sein kann und thermisch labile Substanzen nicht mit der GC-MS vermessen werden konnten, wurde die HPLC-MS in der Folge zur Identifizierung von Verapamil und seinen Metaboliten eingesetzt.

Lankford und Bai untersuchten den Metabolismus des Verapamils im Hund und publizierten als erste eine HPLC-MS Methode zur Identifizierung der Hauptmetaboliten im Hundeurin [130].

Eine sehr empfindliche HPLC-MS Methode mit ESI-Ionisierung für die allgemeine Identifizierung und Quantifizierung der Hauptmetaboliten des Verapamils aus biologischen Flüssigkeiten wurde von Richter et al. publiziert. Die Isolation der

Metaboliten erfolgte dabei mit Hilfe der SPE [131].

Da neben Verapamil nur das Norverapamil eine bekannte physiologische Aktivität besitzt (siehe Kapitel 1.6.4), beschränken sich viele publizierte Methoden auf den Nachweis von Verapamil und Norverapamil.

Garcia et al. entwickelten eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Verapamil und Norverapamil aus biologischen Proben. Die Detektion erfolgte mit UV, die Extraktion mit LLE [132].

Cheng et al. entwickelten eine SPE-Methode mit HPLC-UV-Detektion zur Bestimmung von Verapamil und Norverapamil aus dem Plasma [133].

Da Verapamil fluoreszenzaktiv ist, wurden auch Methoden mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten entwickelt. Die Fluoreszenzdetektion ist im Fall von Verapamil empfindlicher als die UV-Detektion. Asafu-Adjaye entwickelte eine SPE-Methode mit HPLC-Fluoreszenzdetektion zum Nachweis der Verapamil- und Norverapamilenantiomere im Urin [134], Sawicki entwickelte eine validierte Methode zur Bestimmung von Verapamil und Norverapamil im Plasma durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion [135].

Zur Extraktion von Verapamil aus Gewebeproben sind erst wenige Methoden publiziert: Negrusz et al. entwickelten eine Methode zur Extraktion von Verapamil und Norverapamil aus Gewebe mit Hilfe der LLE [136]. Hanada et al. isolierten Verapamil aus verschiedenen Gewebeteilen der Ratte nach intravenöser Applikation der reinen Enantiomere [137].

Die Säulenschaltung wurde schon zur Bestimmung der Enantiomeren des Verapamils und seinen Metaboliten eingesetzt. Dabei beschränkte man sich allerdings auf die Kopplung einer chiralen mit einer achiralen Säule, um die Enantiomere des Verapamils und seinen Metaboliten zu trennen [138-140]. Eine online- Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einem "Restricted Access Material" (RAM) für die Extraktion von Verapamil aus Serum wurde bislang nur einmal zuvor beschrieben [141]. Die Methode beschränkte sich auf die Extraktion der Muttersubstanz.

## 2.5. Zusammenfassung des Kapitel 2

In diesem Kapitel konnte dargelegt werden, daß die Analytik von biologischen Matrices sehr komplex ist. Für die Erstellung einer Methode zur Bestimmung von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten sind sehr viele Aspekte zu berücksichtigen.

Der Probenvorbereitung kommt dabei eine Schlüsselstellung zu. Im vorangegangenen Kapitel wurden sowohl die am meisten verwendeten als auch die modernsten Extraktionsmethoden zur Probenvorbereitung vorgestellt. Es bleibt festzuhalten, daß für den Bereich der Bioanalytik die offline SPE nach wie vor die verbreitetste und am meisten angewandte Methode ist, da sie eine hohe Anreicherung von Analyten, wie Arzneistoffmetaboliten, erlaubt. Nachteil dieser Methode ist, daß sie relativ zeitaufwendig ist. Für die Extraktion von Gewebe wird die LLE sehr häufig angewendet. Die MSPD, die sich noch nicht so lange etabliert hat, setzt sich immer mehr zur Extraktion von Geweben und festen Materialien durch. Die vorgestellten automatisierten Methoden für die Extraktion von Metaboliten, wie die RAM-Säulenschaltung und die in-tube SPME, wurden erst vereinzelt oder noch gar nicht für den Nachweis von Arzneistoffmetaboliten aus biologischen Matrices eingesetzt.

Die Applikationen mit den molekular geprägten Adsorbentien sind ebenfalls relativ neu. Diese Technik wurde zwar schon erfolgreich für den Nachweis von Arzneistoffen und strukturverwandten Verbindungen aus biologischen Matrices eingesetzt, es wurde aber bislang noch nicht gezeigt, inwieweit sie auch für die Extraktion von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten geeignet sind.

Außerdem wurden mit der HPLC-MS<sup>n</sup> und der HPLC-NMR zwei leistungsfähige Verfahren für die Strukturaufklärung von Metaboliten vorgestellt. Durch Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie oder der NMR sowie der Integration der HPLC in die Probenvorbereitung, aber auch durch die chemische Stabilität der zu untersuchenden Substanz werden die Parameter zur Erstellung einer leistungsfähigen Chromatographiemethode erheblich eingeschränkt.

Es muß untersucht werden, inwieweit die Kombination dieser verschiedenen Methoden dazu beiträgt, komplexe pharmakologische Zusammenhänge, wie der Aufklärung der Metabolismusfähigkeit des Herzens, zu lösen.

### 3. Experimenteller Teil und Methodenentwicklung

Für das Studium des Verapamilmetabolismus waren Verapamil und seine Metaboliten aus verschiedenen biologischen Matrices zu isolieren. Ein Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag auf dem Studium des Verapamilstoffwechsels im Herz- und Gefäßsystem. Da die hier zu erwartenden Konzentrationen gering waren, wurde die analytische Methode zuerst in einem anderen System, den Rattenhepatozytenzellkulturen entwickelt.

Da so gut wie keine Referenzmetaboliten vorlagen, mußten zuerst die Hauptmetaboliten identifiziert und die Strukturen von eventuell unbekannt Metaboliten zugeordnet werden. Gerade für neu identifizierte Metaboliten war es weiterhin interessant zu untersuchen, inwieweit sie in verschiedenen Spezies gebildet werden. Die Strukturen waren mit der HPLC-MS<sup>n</sup> Technik aufzuklären. Nach Möglichkeit sollte auch die HPLC-NMR ergänzend herangezogen werden, um eine möglichst eindeutige Strukturzuordnung zu ermöglichen. Im Anschluß wurde dann das Herz- und Gefäßmaterial auf gebildete Metaboliten hin untersucht.

Ein weiter Schwerpunkt stellten Untersuchungen dar, inwieweit eine Inhalation von Verapamil als alternative Applikationsmethode zur oralen Aufnahme denkbar ist. Hierfür wurden zahlreiche Grundlagendaten zu Metabolismus und Verteilung des Verapamils in der Lunge sowie zum Metabolismus in alveolarepithelialen Typ II-Zellen und mikrosomalen Membranen der Lunge von unterschiedlichen Spezies benötigt. Um die Daten besser vergleichen zu können, sollte für die verschiedenen Matrices eine möglichst einheitliche Methode entwickelt werden.

Abschließend sollten relativ neue Analysenmethoden wie die vorgestellte MIP-Technologie und die in-tube SPME auf ihre Anwendbarkeit in der Metabolismusforschung überprüft werden.

### 3.1. Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril (Gradient Grade) und Methanol (Gradient Grade) wurden von Malinckrodt-Baker (Deventer, Niederlande), Ammoniumacetat zum Herstellen der Pufferlösungen wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland) geliefert, Essigsäure (98 %) wurde von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen, Chloroform, Diethylether, Natriumsulfat und  $\beta$ -Glucuronidase (367500 units/g) wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) geliefert.

D<sub>2</sub>O für die NMR-Messungen wurde von Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) bezogen, deuteriertes Acetonitril von Riedel-de-Häen (Seelze, Deutschland).

Razemisches Verapamil (Reinheit > 99 %) und Gallopamil (Reinheit > 99 %) sowie die reinen Enantiomere S-Verapamil und R-Verapamil (Reinheit > 95 %) wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), razemisches Norverapamil (Reinheit 99 %) wurde von Research Biochemicals International (Natick, MA, USA) erworben. Die markierten Substanzen D<sub>6</sub>-Verapamil und das <sup>13</sup>C-markierte Verapamil sowie die Metaboliten D-715 und D-702 wurden von Prof. Dr. W. L. Nelson (University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt.

2-Methacrylsäure (MAA), Ethylenglycoldimethacrylsäure (EDMA) und 2,2'-Azo-bis(2-methylpropionitril) (AIBN) zur Herstellung der MIP wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Alle Standards wurden in Wasser gelöst. Das Wasser wurde in einer Millipore Milli-Q-Anlage (Eschborn, Deutschland) aufgereinigt.

Für die Urinbestimmung der Verapamilmetaboliten wurde Verahexal 40 (Hexal, Holzkirchen, Deutschland) eingenommen.

### 3.2. Material und Geräte

Für die Festphasenextraktion wurden 4 ml-Kartuschen von Merck (Darmstadt, Deutschland), die mit 200 mg RP8 Select B-Material gefüllt waren, sowie Multimode XXL Kartuschen mit 300 mg Sorbens von Separtis (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und eine SPE-Extraktionseinheit von Supelco (Deisenhofen Deutschland) verwendet. Die MSPD wurde auf der gleichen Extraktionseinheit durchgeführt. Dafür wurde Lichrospher RP18-Material (25-40  $\mu$ m) von Merck (Darmstadt, Deutschland) in 6 ml-Extraktionskartuschen mit Fritten (2  $\mu$ m, 20 mm D.) von Separtis (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gefüllt. Die Organe wurden mit einem Ultraturrax von IKL-Labortechnik (Staufen, Deutschland) homogenisiert.

Die gleichen Kartuschen und Fritten wurden für die MISPE verwendet.

Für die HPLC-MS Untersuchungen wurde eine Waters HPLC (Milford, MA, USA) ausgestattet mit zwei Pumpen (Modell 490), einem Autosampler (Modell WISP 790), und einem UV-Detektor (Modell 490) verwendet, die mit einem Bruker-Daltonik Ionenfallenmassenspektrometer (Modell Esquire-LC, Bremen, Deutschland) gekoppelt war. Als Kapillarverbindungen wurde PEEK-Tubing (1/16" x 0.13 mm I. D.) mit Handverschraubungen (Latek, Eppelheim, Deutschland) gewählt.

Für die Säulenschaltung mit der RAM-Vorsäule wurde das System um eine zusätzliche Shimadzu-Pumpe (Modell 9A, Columbia, MD, USA) und ein Rheodyne Lab-Pro Schaltventil (Cotati, USA) sowie einen Accurate-Splitter (LC-Packings, San Francisco, CA, USA) erweitert.

Als RAM Vorsäule wurde eine Merck Lichrospher ADS RP8-Vorsäule (25 x 4 mm, 60 µm) mit Inline-Filter und Halterung (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Zur Kopplung mit einer MIP-Vorsäule wurde dieses Systems um eine Merck OSP-2 Einheit mit Merck-Hitachi Gradientenpumpe (Darmstadt, Deutschland) ergänzt.

Für das Befüllen der Mikrosäule wurde ein 1/16" Edelstahlrohr (4.0 mm I. D., 40 mm Länge) mit Fritten (4.0 mm I. D., 1 mm Stärke, Porösität 2 µm; Latek, Eppelheim, Deutschland) verwendet.

Für die Säulenschaltungen wurden Polyetheretherketone (PEEK)-Kapillaren (mit 1/16" mm O. D. x 0.76 mm I. D. zwischen HPLC und Schaltventilen und 1/16" mm O. D. x 0.13 mm I. D. zwischen der analytischen Säule und dem MS) mit PEEK-Handverschraubungen (Latek, Eppelheim, Deutschland) verwendet.

Die MIP-UV-Untersuchungen wurden mit einem Shimadzu-Photometer (Columbia, MD, USA) durchgeführt.

Für die <sup>1</sup>H NMR-Messungen wurde ein Bruker Avance DRX 600 Spektrometer (Rheinstetten, Deutschland), wahlweise ausgestattet mit einem 2.5 mm Mikroprobenkopf oder einem 4 mm z-Gradient-LC- Probenkopf (aktives Detektionsvolumen 120 µl), eingesetzt.

Das HPLC-System bestand aus einer Bruker-Saxonia LC-22 Pumpe (Leipzig, Deutschland), einem Rheodyne 7725 i Injektionsventil (Cotati, USA) und einem Bischoff Lambda-1010-UV-Detektor (Leonberg, Deutschland).

Die in-tube SPME-Messungen wurden mit einer Agilent 1100 HPLC (Waldbronn, Deutschland) mit Autosampler und variablen Wellenlängendetektor durchgeführt.

Als Extraktionskapillaren wurden eine Omega-Wax Kapillare (60 cm L., 0.25 µm

Filmdicke, 0.25 mm I. D.) von Supelco (Bellefonte, PA, USA), eine dreifach beschichtete und eine fünfmal beschichtete Polypyrrolkapillare (60 cm L., 0.25 mm I. D.) verwendet. Zur Kopplung mit dem MS wurde der Lauf nach erfolgter Injektion angehalten und die Säule anschließend in das beschriebene HPLC-MS-System eingebaut.

Als analytische Säulen wurden RP8 Select B-Säulen (125 x 4 mm I. D., 5 µm und 250 x 2 mm I. D., 4 µm) und für die Isolation der Glucuronide aus dem Urin eine semipräparative RP-18-Säule (250 x 10 mm, 10 µm) der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

### **3.3. Probenmaterial**

Die Plasmaproben der Schweine (Göttinger Minipig) wurden von Scantox Biological Laboratories (Lille Skensved, Dänemark), die Plasmaproben der Affen (Cynomolgus-Affe) von CIT (Miserey, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Alle anderen biologischen Proben wurden vom Zentrum für Pharmaforschung und medizinische Biotechnologie des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und Aerosolforschung, Pharmaforschung und klinische Inhalation (Hannover, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle Protokolle zur Gewinnung der untersuchten Proben wie z. B. der Isolation der Zellen aus Organen sowie deren Kultivierung sind in der Dissertation von Dr. med. Thomas Thum [142], den Publikationen von Thum und Borlak [13, 143], Borlak und Thum [144] und der Diplomarbeit von Frau Diplom-Biologin Maren Blickwede [145] erläutert.

### **3.4. Methoden**

#### **3.4.1. Anforderungen an die Methodenentwicklung**

An die zu entwickelnde Methode wurden eine Reihe von Anforderungen gestellt. Zum einen sollte sie die Abtrennung des Analyten von der Matrix sicherstellen. Hierfür war die Art der Probenvorbereitung entscheidend. In Kapitel 2 wurden mehrere Methoden vorgestellt.

Die Methode sollte weiterhin möglichst präzise Resultate liefern und in einem möglichst großen Konzentrationsbereich einsetzbar sein. Desweiteren sollten die Fehler des Verfahrens möglichst klein, die Analysenzeit kurz und die Kosten möglichst niedrig sein.

Zur Sicherstellung der Qualität der Methode mußte das Verfahren zuvor validiert



werden. Am Beginn der Validierung stand die Auswahl geeigneter Referenzsubstanzen.

Bei Metabolismusuntersuchungen liegt oft das Problem vor, daß viele der Metaboliten nicht erwerbbar sind. Desweiteren sind sie oftmals schwer nachzusynthetisieren.

Für die Entwicklung von Analytikmethoden für Verapamil standen nur wenige Referenzsubstanzen zur Verfügung, die in Abb. 20 aufgelistet sind.

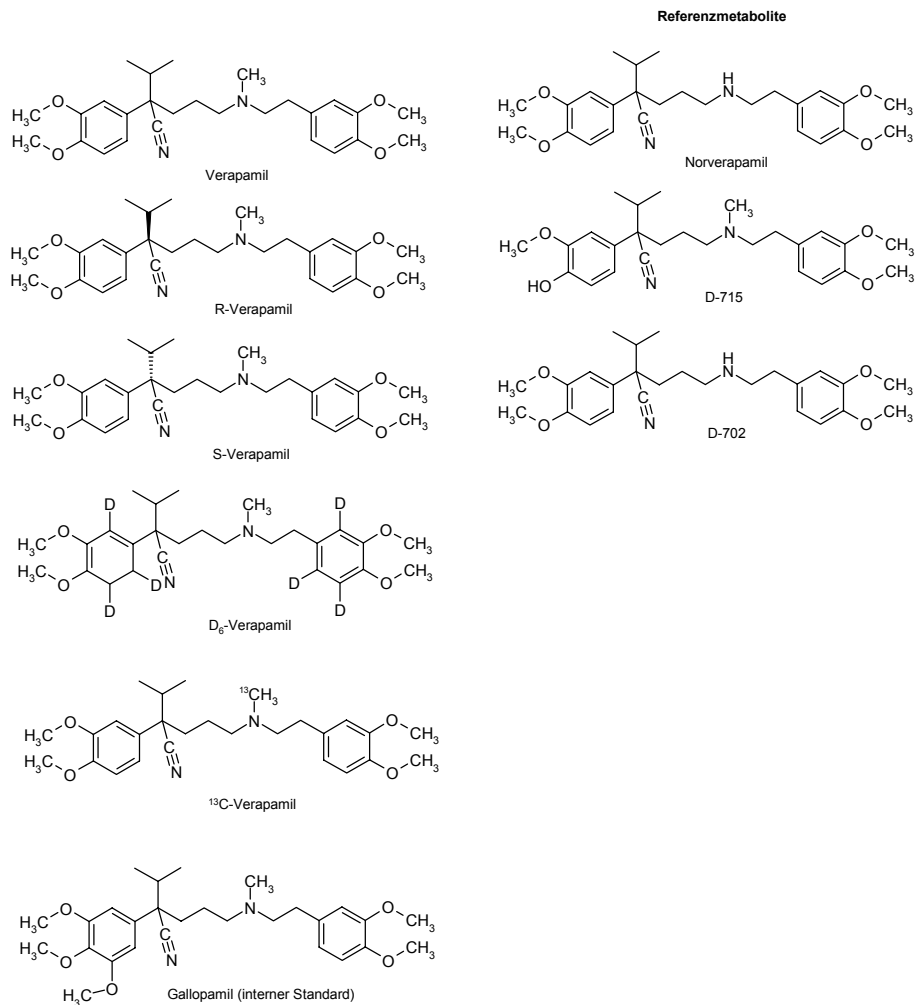
Neben racemischem Verapamil wurden auch bei einigen Inkubationen die reinen Enantiomere eingesetzt, um die Stereoselektivität des Metabolismus zu untersuchen. Norverapamil, D-715 und D-702 waren die einzigen verfügbaren Metaboliten, wobei die Stoffmengen von D-715 und D-702 so gering waren, daß sie nicht routinemäßig als Referenzsubstanz eingesetzt werden konnten. Außerdem wurden sie erst sehr spät zur Verfügung gestellt. In erster Linie wurden sie dafür verwendet, die Strukturen der Metaboliten abzusichern.

Zur weiteren Absicherung der Strukturvorschläge für die Metaboliten wurden Inkubationen mit den deuterierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindungen durchgeführt, die auch sehr spät zur Verfügung standen. Um Schwankungen bei der Aufarbeitung und in der Ionisierungsausbeute auszugleichen, wurde die Quantifizierung des Verapamils in den Plasmaproben mit Gallopamil als internem Standard vorgenommen. Da die meisten Referenzmetaboliten für die Analytik nicht zur Verfügung standen, konnten die Metaboliten nur semiquantitativ relativ zum Verapamil oder zum internen Standard bestimmt werden, da kleine Strukturvariationen der Metaboliten große Änderungen in der Ionisierungsausbeute in der MS bewirken können.

Als Validierungsparameter zur Charakterisierung der Verfahren wurde die Nachweisgrenze, die Linearität, die Wiederfindungen und die Präzision aus den verschiedenen Matrices bestimmt. In der Regel wurde die Linearität über fünf Standardkonzentrationen des Verapamils ermittelt, wie es die allgemeinen Richtlinien für die Methodvalidierung in der Bioanalytik erfordern [146, 147] und der Korrelationskoeffizient als Maß für die Linearität angegeben, obwohl ein guter Korrelationskoeffizient von 0.99 kein hinreichendes Kriterium für eine Linearität ist [148]. Die Standards wurden in der jeweiligen Matrix angesetzt. Die Wiederfindung wurde aus den in der jeweiligen Matrix gelösten Standards von 3-5 Konzentrationswerten bestimmt. Alle Injektionen wurden dreimal wiederholt ( $n = 3$ ). Zur Bestimmung

der Präzision wurde die Standardabweichung nach fünfmaliger Injektion eines Verapamilstandards bestimmt. Nach Injektion von jeweils 5 Proben wurde eine Kontrolle (Standard-Mix: Verapamil, Norverapamil und Gallopamil; Konzentration, 1 µg/ml) vermessen.

**Abb. 20:** Referenzsubstanzen für die Analytik



Vor der Entwicklung der Methode mußte entschieden werden, in welcher Form Verapamil und seine Metaboliten analysiert werden sollten.

Sollten nur Phase-I-Metaboliten untersucht werden, so mußten die Phase-II-Konjugate vorher durch Zusatz von β-Glucuronidase gespalten werden. Sollten auch die Phase-II-Konjugate untersucht werden, so mußten die experimentellen Bedingungen so gewählt werden, daß die Konjugate im Verlauf der Extraktion und der Analytik nicht gespalten wurden.

### **3.4.2. Entwicklung einer HPLC-MS<sup>n</sup> Methode zur Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus biologischem Material**

#### **3.4.2.1. HPLC-Methode**

Zu Beginn mußte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die eine chromatographische Trennung von Verapamil und seinen Metaboliten erlaubte. Für die HPLC-MS-Kopplung war eine Basislinientrennung der Substanzen nicht unbedingt erforderlich, da sie durch Extraktion der Ionenspuren im MS- oder MS<sup>n</sup>-Modus noch getrennt zugeordnet werden konnten.

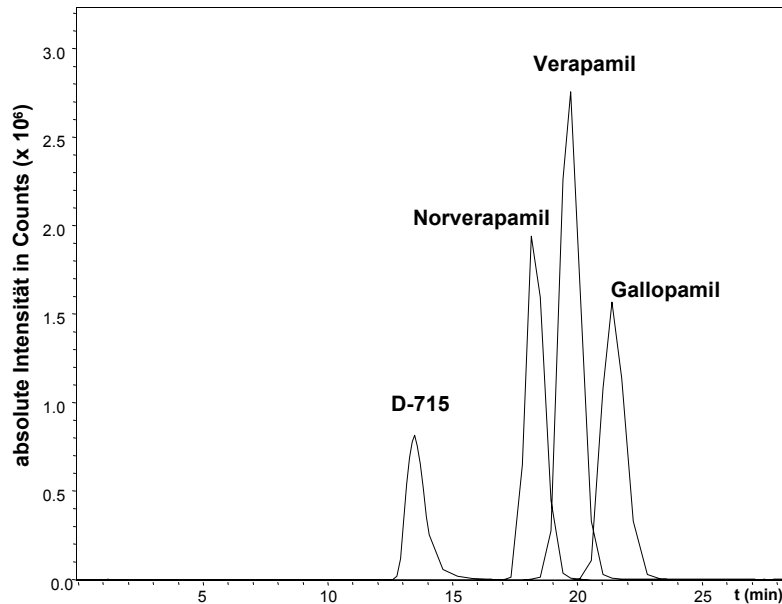
Die Methode sollte aber sowohl Verapamil und seine Phase-I-Metaboliten genügend trennen können als auch die Phase-II-Metaboliten des Verapamils. Die chromatographischen Bedingungen mußten also so gewählt werden, daß sehr polare Verbindungen, wie die Phase-II-Konjugate von Phase-I-Metaboliten und Verapamil, das vergleichsweise relativ unpolar ist, noch getrennt wurden.

Für die Chromatographie wurde eine RP8 Select B-Säule (250 x 2 mm I. D., 4 µm) gewählt, da das RP8 Select B-Material durch spezielle Modifikationen für die Chromatographie von polaren und basischen Verbindungen geeignet war.

Die chromatographischen Parameter, wie die Flußrate und die mobile Phase mußten so gewählt werden, daß eine direkte Kopplung mit dem Massenspektrometer über das ESI-Interface möglich war.

wurde, um eine direkte Kopplung mit dem MS zu ermöglichen. Als Eluent wurde Acetonitril mit einer wäßrigen Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6) eingesetzt. Der Ammoniumacetatpuffer sollte sich rückstandsfrei im MS zersetzen. Der Pufferzusatz sollte eine pH-Werteinstellung von ungefähr 6 gewährleisten, da sich die Glucuronide bei einem pH-Wert niedriger als 5 anfangen zu zersetzen. Acetonitril wurde als organischer Eluent gewählt, um eine möglichst gute Kompatibilität mit den NMR-Bedingungen sicherzustellen (siehe Kapitel 3.4.4). Die Phase-I-Metaboliten wurden isokratisch mit einem Fluß von 0.2 ml/min und einer Zusammensetzung der mobilen Phase aus Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6)/Acetonitril 1/1 (v/v) getrennt. Für die Phase-II-Konjugate wurde eine Gradientenelution entwickelt, die im Anhang abgebildet ist. In Abb. 21 wird das Ionenchromatogramm von vier Standardsubstanzen nach einer isokratischen Trennung (Fluß: 0.6 ml/min) auf einer RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm, 5 µm) gezeigt.

**Abb. 21:** Trennung der vier Standardsubstanzen auf einer RP8 Select B-Säule



#### 3.4.2.2. MS-Methode

Die Ionenquellen-, Kapillaren- und Skimmereinstellungen im ESI-MS-System mußten so gewählt werden, daß das Analyt möglichst unzersetzt mit hoher Intensität detektiert wurde. Die weiteren Linsen- und Octopoleinstellungen waren für die Stabilität der Ionen weniger kritisch.

Da Verapamil und die wichtigsten der publizierten Metaboliten relativ basische Substanzen sind (siehe Tab. 12), wurden die Metabolismusuntersuchungen im Positiv-ESI durchgeführt. Für die Verbindungen, die als Standardsubstanzen vorlagen, konnte die Parameteroptimierung automatisch im Auto-Tune-Modus erfolgen. Dabei wurde der in der mobilen HPLC-Phase vorliegende Analyt direkt mit einer Spritzenpumpe (Flußrate 10 µl/min) in das Massenspektrometer injiziert, das dann eigenständig die optimalen Einstellungsbedingungen für die jeweiligen Parameter wählte. Für neue unbekannte Metaboliten und alle Verbindungen, die nicht als Standardverbindungen zur Verfügung standen, mußten diese Parameter manuell optimiert werden, was oftmals sehr schwierig war, da viele dieser Parameter voneinander anhängig waren. Die optimierten MS Parameter sind im Anhang aufgelistet.

Wenn die Chromatographie eine Basislinientrennung der zu untersuchenden Komponenten erlaubte, konnten für die jeweils getrennt eluierenden Substanzen

Zeitfenster mit unterschiedlichen Parametern definiert werden. Bei koelutierenden Substanzen, die sich in ihrer Ionisierbarkeit unterscheiden, war eine Optimierung der Parameter nur schwer möglich.

Bei den Fragmentierungen im  $MS^n$ -Modus war darauf zu achten, daß die Stoßenergie so gewählt wurde, daß das Mutterion in einer ausreichenden Intensität (ungefähr 10 % von der Ausgangsintensität) detektiert wurde. Im Auto-MS/MS-Modus wurde eine Spannungsrampe durchlaufen, die eine bessere Reproduzierbarkeit der Methode garantieren sollte.

Die Linearität der Methode wurde maßgeblich durch die ESI-Ionisierung und die Ionenfallkapazität bestimmt. Die ESI-Ionisierung lieferte nur lineare Werte bei Konzentrationen von der Nachweisgrenze (NWG) bis zu 10 µg/ml je nach Eigenschaft des Analyten. Im Totalionenchromatogramm war das S/N-Verhältnis meist relativ klein, da viele Matrixbestandteile mitionisiert wurden. Durch Extraktion der Ionenspuren im MS-Modus konnte das Signal/Rausch-Verhältnis (englisch Signal/Noise: S/N) drastisch verbessert werden. Für die Nachweisgrenzen wurden ein Signal/Rausch-Verhältnis (englisch Signal/Noise: S/N) von drei im MS-Modus festgelegt.

Nach Fragmentierung im  $MS^2$ -Modus konnten einige Ionen selektiert werden, wodurch das S/N-Verhältnis noch weiter verbessert werden konnte. Allerdings verlor man bei der Fragmentierung in der Regel eine Größenordnung (Zehnerpotenz) an Empfindlichkeit (Beispiel: Betrag die Signalintensität  $10^6$  Counts im MS-Modus, so entsprach dies nur noch  $10^5$  Counts im  $MS^2$ -Modus). In den weiteren Fragmentierungsstufen sank die Empfindlichkeit dann noch weiter ab, so daß bei  $MS^n$ -Experimenten die Zahl der Stufen durch die Ionisierungsausbeute bei den einzelnen Fragmentierungsschritten bestimmt wurde, die wiederum von den strukturellen Eigenschaften der Substanz abhing.

#### **3.4.2.2.1. Strukturaufklärung mit $MS^n$**

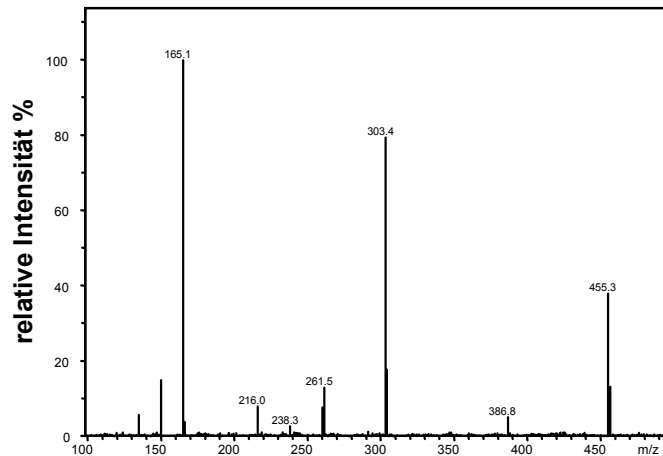
Für die Methodenentwicklung standen nur wenige Metaboliten als Referenzsubstanzen zur Verfügung. In der Einleitung wurde schon ausführlich über den bereits erforschten Metabolismus des Verapamils berichtet. Um diese Metaboliten oder sogar neue, bis dato unbekannte Metaboliten zu identifizieren, nutzte man das Fragmentierungsverhalten der Verbindungen im  $MS^n$  aus.

Im Gegensatz zur Elektronenstoßionisierung ist das Fragmentierungsverhalten von

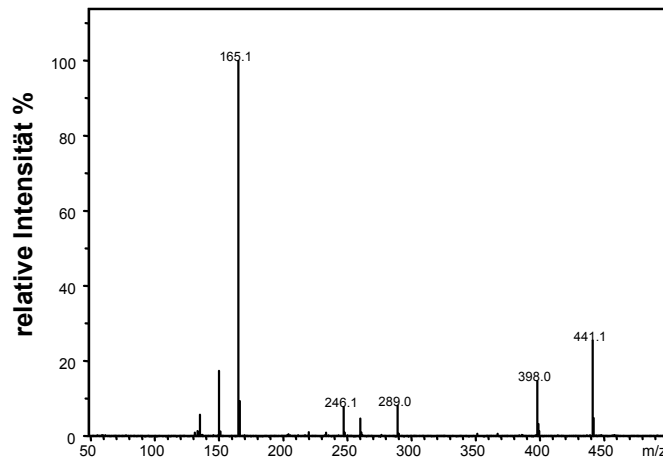
Quasimolekülonen, die nach der ESI-Ionisierung entstehen, noch nicht ausreichend erforscht, so daß keine umfangreichen Spektrenbibliotheken vorhanden waren, die mit der zu untersuchenden Verbindung verglichen werden konnten. In Abb. 22 sind die Fragmentierungen im MS<sup>2</sup>-Modus der Verbindungen Verapamil, Norverapamil und D-715 dargestellt.

**Abb. 22:** Fragmentierung ausgewählter Standards im MS<sup>2</sup>-Modus

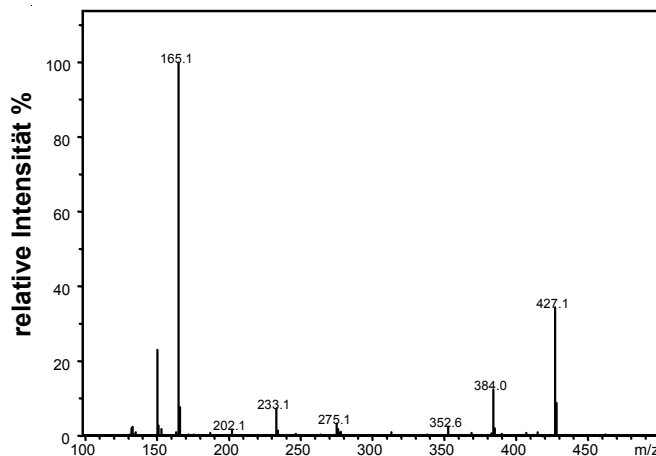
Verapamil



Norverapamil



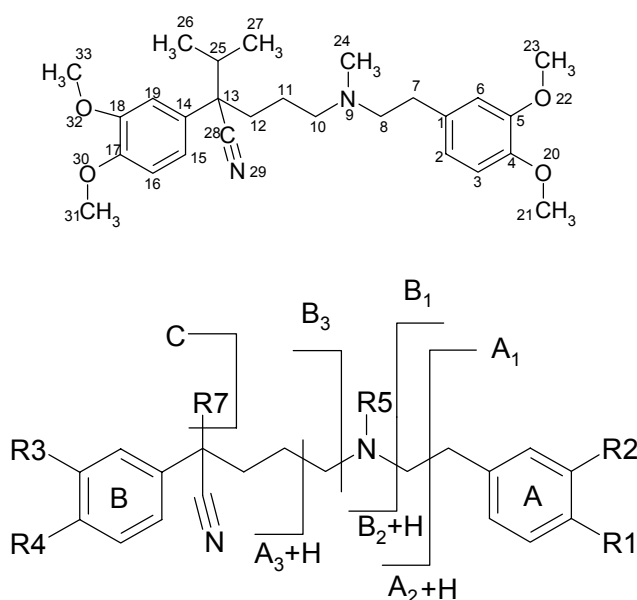
D-715



Aus Abb. 22 kann man entnehmen, daß die Fragmente mit m/z = 165 und 151, die durch N-C-Spaltung mit Protonen- und Ladungstransfer auf der niedersubstituierten

Seite des Verapamils gebildet wurden, gehäuft auftraten. Desweiteren führte die  $\alpha$ -Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte zu den Fragmenten mit  $m/z = 246$  und  $m/z = 260$  und auf der niedersubstituierten Seite mit Protonentransfer zu den Fragmenten mit  $m/z = 303$  und  $m/z = 289$ . Auch die Abspaltung der Isopropylgruppe  $[M+H-43]^+$  trat bei allen drei Substanzen auf. Somit schienen sich kleine Strukturänderungen nicht auf das Fragmentierungsverhalten der Verbindung auszuwirken, so daß ein allgemeines Fragmentierungsschema erstellt werden konnte, das in Abb. 23 gezeigt wird. Mit Hilfe dieses Fragmentierungsschemas ließen sich die Strukturen vieler strukturverwandter Verbindungen relativ genau zuordnen. So ließ sich entscheiden, ob ein Metabolit am Ring A oder am Ring B demethyliert wurde oder ob eine Hydroxylierung beispielsweise an der Isopropylgruppe stattgefunden hat. Eine exakte Bestimmung der Demethylierungsposition, ob nun an R3 oder R4, war mit Hilfe der Massenspektrometrie allein nicht möglich. Diese Information konnte nur die NMR-Spektroskopie liefern.

**Abb. 23:** Allgemeines Fragmentierungsschema für Verapamil und strukturähnliche Verbindungen



mit A: C-C-Spaltungen in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff  
 B: N-C-Spaltungen  
 C: Abspaltung der Isopropylgruppe

### **3.4.3. Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur Isolierung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Zellkulturüberständen, Mikrosomen und Urin**

Bevor die Metaboliten mit der HPLC-MS oder der NMR-Spektroskopie untersucht werden konnten, mußten sie aus der jeweiligen Matrix isoliert und angereichert werden.

Da für die Methodenentwicklung nur sehr wenige Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, mußten zuerst Methoden entwickelt werden, um eine breites Spektrum an Metaboliten zu isolieren und zu identifizieren.

Die metabolisierenden Cytochrom P450-Enzyme werden am stärksten in den Leberzellen exprimiert, weshalb die Metaboliten in den Leberzellen im Vergleich zu Zellen anderer Organe in höheren Konzentrationen gebildet werden. Für die Methodenentwicklung war es deshalb sinnvoll, zuerst zum Aufbau einer Spektrenbibliothek möglichst viele Metaboliten aus Hepatozytenzellkulturüberständen zu identifizieren, bevor die anderen Matrices untersucht wurden. Um Rückschlüsse auf den Metabolismus im menschlichen Organismus ziehen zu können, wurde der Metabolismus auch in humanen Leberzellen und im humanen Urin untersucht.

Die Metaboliten des Verapamils lagen im Zellkulturüberstand, in den Mikrosomen und im Urin gelöst vor. Diese Matrices enthielten neben diesen Metaboliten teilweise noch eine Proteinmatrix (fetales Kälberserum: FCS) und weitere Substanzen (Zucker, Aminosäuren, Antibiotika, endogene Stoffwechselprodukte), die als Nährstoffe den Zellkulturmedium zugesetzt wurden. Aus dieser Matrix waren die Metaboliten abzutrennen und anzureichern, da sie oft in geringen Konzentrationen gebildet wurden.

Für die Extraktion und Anreicherung hat sich in der Bioanalytik von Arzneistoffen vor allem die Festphasenextraktion etabliert (siehe Kapitel 2.1.1.4). Sie erlaubt die Anreicherung einer großen Menge von Analyt auf einer Festphase bei Abtrennung der Matrix.

Vor der Probenvorbereitung war zu entscheiden, ob die Metaboliten als Phase-I-Metaboliten oder als Phase-II-Konjugate nachgewiesen werden sollten. Sollten sie nur als Phase-I-Konjugate identifiziert werden, mußten die Proben mit einer  $\beta$ -Glucuronidase-Lösung inkubiert werden.

Die Probe wurde hierzu mit einer  $\beta$ -Glucuronidase-Lösung (5 mg/ml) behandelt, die in Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 4.5) gelöst war. Die Probe wurde über Nacht



bei 37 °C inkubiert.

Im nächsten Schritt mußten die Proteine aus der Matrix entfernt werden. Dies konnte entweder durch Aussalzen, Ansäuern oder durch Fällung mit organischen Lösemitteln wie Methanol erreicht werden. Das Fällung der Proteine mit Lösemittel (6 ml Methanol/1 ml proteinhaltige Lösung) hatte den Vorteil, daß pH-empfindliche Substanzen, wie z. B. Glucuronide, bei der Probenvorbereitung schonend behandelt wurden. Nach Fällung der Proteine wurden diese abzentrifugiert ( $3000 \text{ U min}^{-1}$ ), und aus dem Überstand konnte abschließend das Lösemittel durch Abblasen im Stickstoffstrom entfernt werden, so daß die Metaboliten in der wäßrigen Matrix gelöst vorlagen.

#### **3.4.3.1. Auswahl der Festphase**

Für die Extraktion standen diverse verschiedene Materialien zur Verfügung [86]. Speziell für die Verapamilanalytik sollte die SPE-Festphase für die Anreicherung von sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Metaboliten geeignet sein. Da Verapamil und die wichtigsten seiner Metaboliten relativ basische Substanzen sind (siehe Tab. 12), sollte die Festphase gerade für die Bestimmung basischer Verbindungen geeignet sein.

Für die SPE-Aufreinigung wurden zwei Phasen erprobt, zum einen eine RP8 Select B-Phase, zum anderen eine sogenannte Mixed-Mode-Phase. Die polarerer RP8-Phasen sind im Gegensatz zu den unpolaren RP18-Phasen auch in der Lage, sehr polare Substanzen, wie Glucuronide von Arzneistoffmetaboliten, zu retenieren.

Die Mixed-Mode-Phase setzte sich aus einer Octadecylphase, die mit kationischen und anionischen Austauscherketten kombiniert ist, zusammen. Diese Phase sollte speziell für die Analytik von Pharmaka geeignet sein.

Es wurden 10 ml Zellkulturmedium wurden mit Verapamil-Standards so versetzt, daß Endkonzentrationen von 1, 50, 100 und sogar bis 1000 ng/ml erreicht wurden, da bei den Inkubationen den Zellen Verapamil in einer 5 µmolaren Endkonzentration zugesetzt wurde.

Die RP8 Select B-Phase wurde mit 4 ml Methanol und 4 ml Wasser konditioniert. Anschließend wurde die Probe aufgegeben. Nach Spülen mit einer wäßrigen Lösung, die 5 % Methanol enthielt, wurde die Phase im Stickstoffstrom getrocknet (30 min), und anschließend wurde Verapamil mit 2 ml einer sauren Methanollösung eluiert

(65 % MeOH, 2 % Essigsäure (v/v)). Die Lösung wurde zur Trockne eingengt und in 200 µl der jeweiligen mobilen HPLC-Phase aufgenommen. 20 µl dieser Lösung wurden in das HPLC-MS-System injiziert und unter den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Bedingungen chromatographiert.

Die Multimode XXL Phase wurde mit 4 ml Methanol und 4 ml Wasser konditioniert. Nach Aufgabe der Probe wurde mit 3 x 1 ml einer methanolischen Lösung [5 % Methanol/1 % Ammoniak (v/v)] gespült. Der Ammoniakzusatz sollte einen Durchbruch der basischen Substanzen verhindern. Anschließend wurden die Metaboliten mit 2 ml einer sauren methanolischen Lösung [65 % MeOH/2 % Essigsäure (v/v)] von der Festphase eluiert. Das Eluat wurde eingengt und in 200 µl der mobilen HPLC-Phase aufgenommen. 20 µl der Lösung wurden in das HPLC-MS-System injiziert unter den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Bedingungen chromatographiert. Die Ergebnisse aus den Wiederfindungsversuchen des Verapamils sind Tab. 5 abgebildet.

**Tab. 5:** Wiederfindungen nach der SPE von Zellkulturmedium (n = 3)

	Verapamilkonzentration in ng/ml				
	1	10	50	100	1000
<b>RP8 Select B</b>	(92 ± 4)%	(89 ± 5)%	(95 ± 4)%	(89 ± 7)%	(91 ± 6)%
<b>MM XL</b>	(67 ± 8)%	(63 ± 5)%	(86 ± 4)%	(78 ± 3)%	(87 ± 7)%

Die Wiederfindungen mit dem RP8 Select B-Material waren besser als die mit der Multimode-Kartusche und somit wurde dieses Material als Sorbens für die Verapamilanreicherung gewählt.

Um später auch die Glucuronide zu isolieren, wurde auf die Elution mit einer sauren Lösung verzichtet und nur mit 2 ml Methanol eluiert. Dies hatte keine Auswirkungen auf die Wiederfindungen.

Für die Isolierung der Glucuronide aus dem Urin konnten keine Wiederfindungen bestimmt werden, da diese nicht als Referenzsubstanzen vorlagen. Auffangen der jeweiligen Waschfraktionen hat aber gezeigt, daß selbst nach Aufgabe von 30 ml Urin keine Glucuronide durchgebrochen sind.

Auch eine Aufgabe von 30 ml Zellkulturmedium mit einer Substanzkonzentration von 1 µg/ml erzeugte keinen Durchbruch, so daß 30 ml Medium mit einer Säule auf jeden Fall aufgearbeitet werden konnten.

Die Wiederfindungen für die drei zu untersuchenden Matrices wurden bestimmt, indem der jeweiligen Matrix Verapamil, Gallopamil und Norverapamil in einer

Konzentration von 50 ng/ml zugesetzt wurde. Die Linearität wurde für 5 Konzentrationen (10, 50, 100, 200 und 500 ng/ml) bestimmt. Als Maß für die Linearität wurde der Korrelationskoeffizient  $R^2$  herangezogen. Abschließend sind die Wiederfindungen, Nachweisgrenzen und Korrelationskoeffizienten für Verapamil, Norverapamil und Gallopamil aus den verwendeten Matrices dargestellt.

**Abb. 24:** Wiederfindungen für Verapamil und Gallopamil aus den untersuchten Matrices

Matrix	Verapamil			Norverapamil			Gallopamil		
	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG (ng/ml)	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG (ng/ml)	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG ng/ml
Zellkultur-medium	(85 ± 4)%	0,9989	5	(81 ± 5)%	0,9874	5	(86 ± 5)	0,9991	5
Mikrosomen	(95 ± 5)%	n.b.	5	(92 ± 3)%	n.b.	6	(97 ± 6)	n.b.	6
Urin	(97 ± 4)%	0,9992	5	(92 ± 6)%	0,9895	5	(96 ± 4)	0,9992	5

Wdf.: Wiederfindung

NWG: Nachweisgrenze

R<sup>2</sup> Lin. : Korrelationskoeffizient für die Linearität

n. b.: nicht bestimmt

Die Präzision wurde durch fünfmalige Injektion der Standards (1 µg/ml) bestimmt und lag in allen Fällen unter 10 %.

### 3.4.3.2. Zusammenfassung

Die SPE stellte eine gute Methode zur Isolierung von Verapamil und seinen Metaboliten aus unterschiedlichen Matrices dar. Durch Verwendung eines RP8 Select B-Sorbens konnten sowohl polare als auch unpolare Verbindungen isoliert, und durch Aufgabe von viel Probelösung konnte ein hoher Anreicherungsfaktor erzielt werden.

Die Wiederfindungen für die 3 Standards Verapamil, Norverapamil und Gallopamil lagen zwischen 85 und 97 %. Der lineare dynamische Bereich reichte von 25 bis 500 ng/ml und die Präzision lag bei allen Messungen unter 10 %, was ein hinreichend guter Wert ist. Allerdings war der Zeitaufwand für die Probenvorbereitung relativ hoch. Allein die Fällung der Proteine und das Abblasen des Lösemittels nahm mehrere Stunden in Anspruch. Für die Spaltung der Glucuronide mußten mindestens 8 h kalkuliert werden. Die Zeitdauer für die SPE allein betrug je nach Probemenge mindestens 30 min, dazu mußten 30 min für das Trocknen der Festphase und 1 h für das Eintrocknen des Eluates im Stickstoffstrom addiert werden, so daß die gesamte Probenvorbereitung mindestens einen Tag in Anspruch nahm. Durch das gleichzeitige Aufarbeiten vieler Proben konnte dieser Zeitaufwand etwas kompensiert

werden.

#### **3.4.4. Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung der Phase-II-Konjugate des Verapamils aus humanem Urin mittels $^1\text{H}$ NMR**

In Kapitel 3.4.2.2.1 wurde darauf hingewiesen, daß mit der Massenspektrometrie allein eine eindeutige Zuordnung der Metaboliten nicht möglich war. Zur näheren Charakterisierung der Metaboliten sollte deshalb die  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie herangezogen werden. Primär wurde sich dabei auf die Phase-II-Konjugate des Verapamils konzentriert, da diese bisher noch nicht direkt bestimmt worden waren.

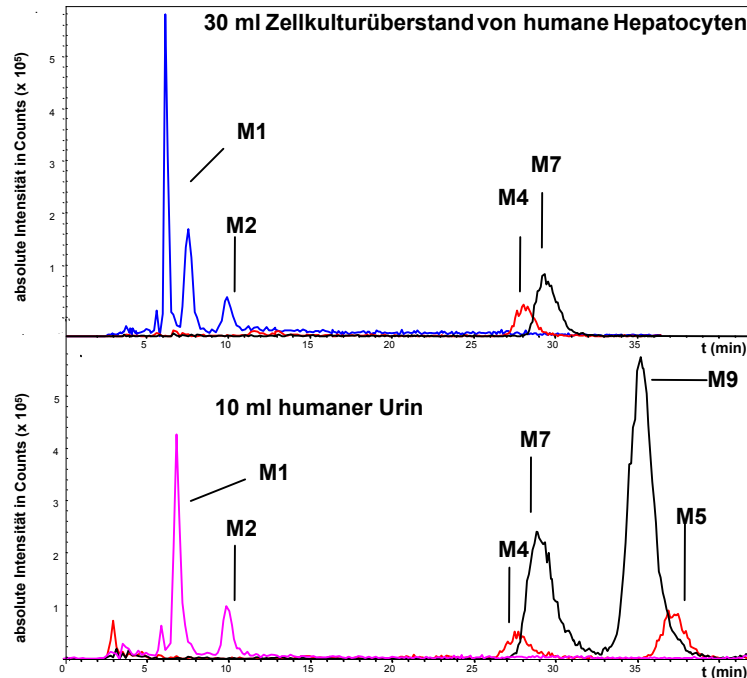
Im Vergleich zur Massenspektrometrie ist die NMR-Spektroskopie relativ unempfindlich, so daß größere Substanzmengen (ca. 1  $\mu\text{g}$ ) benötigt werden, um bei der Aufnahme von NMR-Spektren in einer Zeit von wenigen Stunden ein gutes Signal-Rausch Verhältnis zu erzielen.

Die Konzentration der Metaboliten in den Zellkulturüberständen war vergleichsweise gering (pg/ml bis ng/ml), weshalb die Strukturaufklärung von Metaboliten in dieser Matrix nur möglich wäre, wenn große Mengen an Zellkulturüberständen (mehrere Liter) vereinigt würden, wofür wiederum sehr viel Zellmaterial isoliert werden müßte.

Die Menge an Zellmaterial, die aus Spenderorganen oder einem Spendertier isolieren werden konnte, war für die Gewinnung der notwendigen Konzentration unzureichend, weshalb entweder viele Spenderorgane gesammelt oder viele Spender-tiere hätten getötet werden müssen.

Einfacher war die Bestimmung der Metaboliten aus dem Urin, da sie im Urin in viel höheren Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausgeschieden wurden. Für die Strukturaufklärung war es daher sinnvoller, die Phase-II-Konjugate aus dem Urin zu isolieren und zu bestimmen, um sie dann abschließend über ihre Retentionszeit und ihre Massenspektren auf die in Zellkulturüberständen gebildeten Metaboliten zu referenzieren. Wie man aus Abb. 26 entnehmen kann, sind in 10 ml Urin mehr Metaboliten nachweisbar als in 30 ml Zellkulturüberstand. Es war daher sinnvoll, für die Charakterisierung der Metaboliten mittels  $^1\text{H}$  NMR eine Methode zur Isolation der Phase-II-Konjugate aus humanem Urin zu entwickeln.

**Abb. 25:** Ionenchromatogramme von einigen Glucuroniden aus Zellkulturüberstand und Urin



#### 3.4.4.1. Isolation der Metaboliten aus humanem Urin

Hierfür nahmen zwei gesunde Probanden (27 Jahre, 98 kg/ 61 Jahre, 70 kg) jeweils 2 Tabletten Verahexal zu sich, die jeweils 40 mg Verapamil enthielten. Ihr Urin wurde über 8 h getrennt gesammelt und anschließend gepoolt (1.3 l). Die vereinigte Probe wurde am Rotationsverdampfer auf 500 ml eingengt. 400 ml dieses Konzentrats wurden mittels SPE aufgearbeitet. Die Methode ist unter Kapitel 3.4.3 beschrieben. Anschließend mußte der gewonnene Extrakt (400 µl) aufgereinigt werden, um die Phase-II-Metaboliten von den Phase-I-Metaboliten zu trennen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte auf einer semipräparativen Säule (RP18, 250 x 10 mm I. D., 10 µm). Als mobile Phase wurde ein Lösemittelgemisch aus Acetonitril und einer wäßrigen Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6) eingesetzt. Die Detektion erfolgte UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 230 nm und die Elution bei einem Fluß von 2 ml/min mit folgendem Gradienten:

Zeit (min)	Acetonitrilanteil (%)	Anteil der Ammoniumacetatlösung (%)
0-30	30	70
30-60	70	30
60-90	80	20
90-95	30	70

Die Substanzen, die in den ersten 20 Minuten eluierten, wurden verworfen, die später eluierenden wurden in zwei Fraktionen gesammelt.

Die Fraktion 1 (20-60 min) enthielt die Glucuronide (Phase-II-Metaboliten), die Fraktion 2 (60-90 min) enthielt die unkonjugierten Metaboliten (Phase-I-Metaboliten). Fraktion 1 wurde auf 400 µl eingengt und aliquotiert. 200 µl dieser Fraktion (Fraktion 1A) wurden für die HPLC-NMR-Untersuchungen, die restlichen 200 µl (Fraktion 1B) für die offline Strukturuntersuchungen weiter aufgetrennt.

Dies erfolgte unter isokratischen Bedingungen auf einer RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm I. D., 5 µm): Eluent: Acetonitril/H<sub>2</sub>O [25/75 (v/v)], Fluß 0.3 ml /min. Für die HPLC-NMR-Messungen wurde die Fraktion 1A wiederum in 2 Fraktionen (Fraktion 1A-1 und 1A-2) aufgetrennt. Fraktion 1A-1 von 10-15 Minuten enthielt die Metaboliten M1 und M2 (die ersten 10 Minuten wurden wiederum verworfen). Fraktion 1A-2 von 15-40 Minuten enthielt die Metaboliten M4, M5, M7 und M9. Das Aufbereitungsschema ist in Abb. 26 dargestellt.

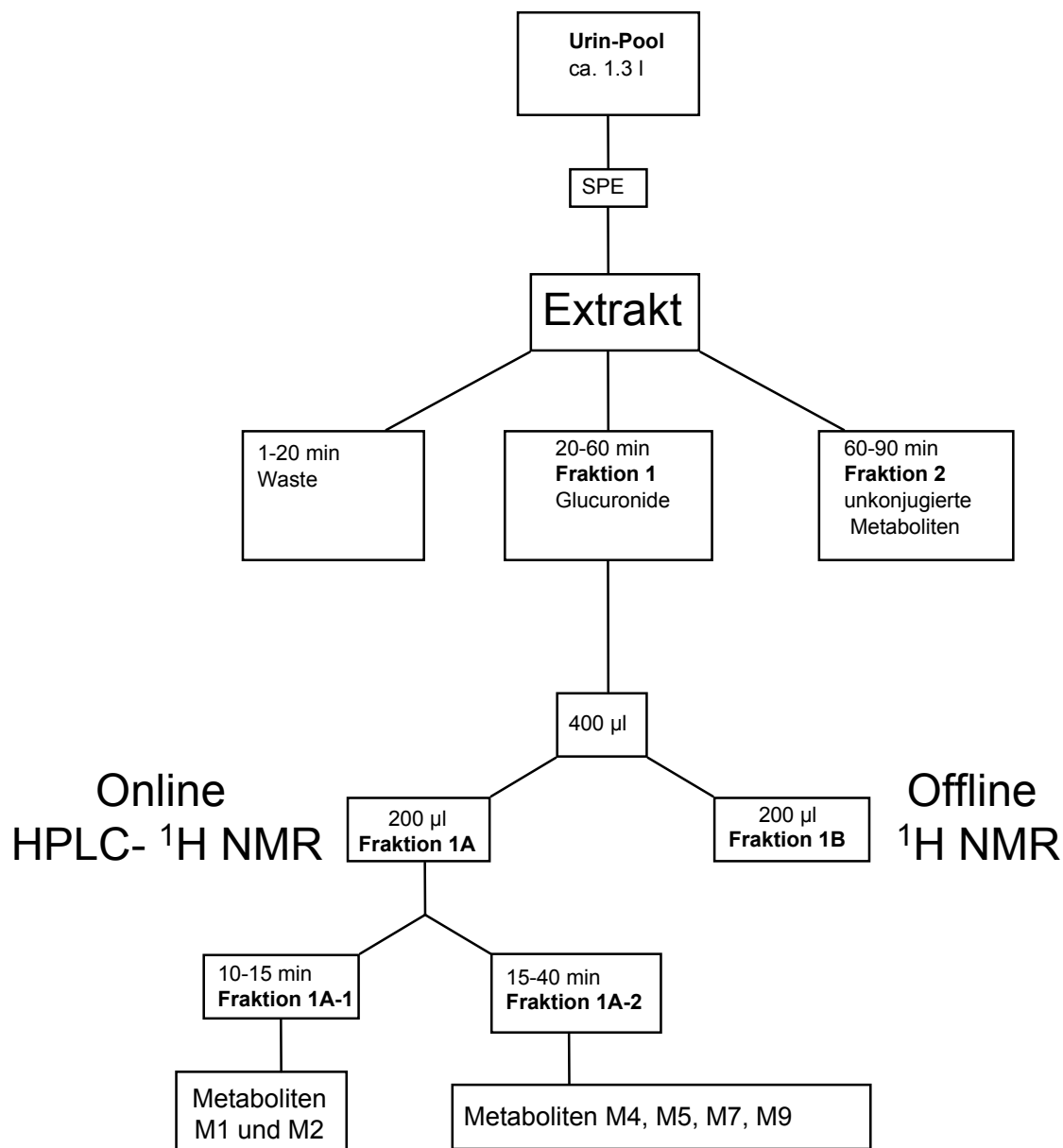
Aus Fraktion 1B wurden 6 Metaboliten über HPLC-Schnitte (20 x 10 µl) isoliert und am Rotationsverdampfer eingengt (siehe Tab. 6). Die gewonnenen Einzelfraktionen wurden zur weiteren Aufreinigung nochmals injiziert und unter identischen chromatographischen Bedingungen erneut geschnitten. Die nachgereinigten Glucuronidfraktionen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und anschließend in deuteriertem NMR-Lösemittel [Acetonitril-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>O; 60/40 (v/v)] aufgenommen und in NMR-Mikroröhrchen (2.0 mm O. D.) gefüllt. Zur Chromatographie wurde eine RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm, 5 µm) verwendet. Als Elutionsmittel diente Acetonitril/D<sub>2</sub>O [25/75 (v/v)]. Die Trennung erfolgte bei einem Fluß von 0.3 ml/min isokratisch. 20 µl der Metabolitenlösung wurden injiziert.

#### **3.4.4.2. <sup>1</sup>H NMR-Messungen**

Für die <sup>1</sup>H NMR-Messungen wurde das unter Kapitel 3.2 beschriebene System verwendet.

Alle <sup>1</sup>H NMR-Spektren wurden bei einer Meßfrequenz von 600.13 MHz und einer Temperatur von 300° K aufgenommen.

**Abb. 26:** Schema für die Aufbereitung der humanen Urinproben



**Tab. 6:** Isolierte Metaboliten aus Schnittfraktionen

Schnittfraktion	Retentionszeit (min)	Metaboliten
1	11.2-12.1	M1
2	12.2-13.1	M2
3	30.1-32.1	M4 und M7
4	33.1-34.1	M5 und M9
5	35.1-37.2	M8 und M12
6	40.1-43.2	M10 und M11

#### **3.4.4.2.1. Experimentelle Angaben zu offline <sup>1</sup>H NMR-Messungen**

Für die offline <sup>1</sup>H NMR-Messungen wurde ein 2.5 mm Mikroprobenkopf eingesetzt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf deuteriertes Acetonitril ( $\delta = 1.975$  ppm) referenziert. Die <sup>1</sup>H NMR-Spektren wurden mit einer Sweepweite von 5684 Hz und 1K Datenpunkten aufgenommen. Es wurden 256 Scans mit einer Delayzeit von 2.4 s akkumuliert. Der 90° Puls betrug 8.9  $\mu$ s (bei 5 dB), die Aquisitionszeit 2.1 s. Die offline 2D NOESY-Experimente wurden mit 96 Scans für jedes der 256  $t_1$  Inkremente aufgenommen. Dabei folgte einem Inkrementdelay von 3  $\mu$ s ein Zeitinkrement von 104  $\mu$ s, was zu einer effektiven Aquisitionszeit von 852 ms in der F1-Dimension führt. Die Daten wurden mit einer Mischzeit von 0.6 s aufgenommen. Jedem Experiment gingen 16 Dummy-Scans mit einem Relaxationsdelay von 1.5 s zwischen jedem Scan voraus. Die 2D NOESY-Spektren basierten auf einer Matrix aus 8000 x 256 Datenpunkten.

Das selektive 1D TOCSY Spektrum wurde mit 512 Scans aufgenommen. Dabei folgte einem Inkrementdelay von 3  $\mu$ s ein Relaxationsdelay von 1.5 s, die Aquisitionszeit betrug 3.4 s. Jedem Experiment gingen 16 Dummy-Scans mit einem Relaxationsdelay von 1.5 s zwischen jedem Scan voraus. Die Sweepweite betrug 4807 Hz, die Mischzeit 100 ms.

#### **3.4.4.2.2. Experimentelle Angaben zu den HPLC-NMR-Messungen**

Für die HPLC-NMR-Messungen wurde ein 4 mm z-Gradient-LC- Probenkopf (aktives Detektionsvolumen 120  $\mu$ l) eingesetzt.

Für die HPLC-NMR-Stopped-Flow-Experimente wurde die Bruker WET-Sequenz lc1wt für multiple Lösemittelunterdrückung verwendet. FIDs wurden nach einem 90° Impuls (9.7  $\mu$ s) und einem Aquisition-Delay von 2.4s zu 32k Datenpunkten akkumuliert (spektrale Weite 9615 Hz), was in einer Gesamtinterscanzeit von 4.50 s resultierte. Es wurden immer 512 Scans akkumuliert. Die Daten wurden vor der Fouriertransformation mit einer Exponentialfunktion multipliziert. Die chemischen Verschiebungen wurden auf Acetonitril ( $\delta = 2.000$  ppm) referenziert.

Für die HPLC-NMR-Stopped-Flow-Experimente wurden zur Lösemittelunterdrückung die Bruker-Pulssequenz lcnosy-wetpdc mit folgenden Parametern gewählt: Die <sup>1</sup>H NMR-Spektren wurden mit 16k x 256 Datenpunkten aufgezeichnet, die spektrale Weite in F2 betrug 7183 Hz, 40 Inkremente wurden in der F1-Dimension benutzt. Der Delay zwischen zwei erfolgreichen Pulsen betrug 2.0 s und die Mixzeit wurde auf



wurde auf 0.6 s gesetzt. Die Daten wurden vor der Fourier-Transformation in die F1-Dimension mit einem Faktor von 2 zero-filled.

#### **3.4.4.2.3. D/H-Rücktausch**

Nach Aufnahme der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren wurde die vermessene Metabolitenfraktion aufgefangen und auf zwei HPLC-Vials (Volumen 2 ml) verteilt (Vial A und Vial B). Aus Vial A (deuterierter Eluent) wurden 400  $\mu\text{l}$  mit einer Spritzenpumpe (Flußrate 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) direkt in das MS-System injiziert und die MS-Spektren der Metaboliten im  $\text{MS}^n$ -Modus vermessen. Die Lösung in Vial B wurde 1:4 mit Ammoniumacetatlösung (0.01M, pH = 6) verdünnt (D/H Rücktausch). 400 $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit einer Spritzenpumpe (Flußrate 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) direkt in das MS-System injiziert und die MS-Spektren der Metaboliten im  $\text{MS}^n$ -Modus vermessen.

#### **3.4.5. Entwicklung einer Methode zur Untersuchung des Metabolismus in der Lunge**

In einer Studie sollte überprüft werden, inwieweit eine inhalative Applikation des Verapamils alternativ zur systemischen Gabe möglich ist. Hierfür waren die Konzentrationen des Verapamils und seinen Metaboliten in verschiedenen Matrices zu untersuchen, darunter:

- Zellkulturüberstände von alveolarepithelialen Typ II-Zellen der Lunge von Ratte und Schwein
- Mikrosomale Membranen der Lunge von Ratte und Schwein
- Lungengewebe der Ratte

Die Zellkulturüberstände der alveolarepithelialen Typ II-Zellen und der mikrosomalen Membranen der Lunge sowie die Plasmaproben stellten flüssige, wäßrige Matrices mit mehr oder weniger hohem Proteinanteil dar, in dem die Analyten gelöst vorlagen. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten sollte für diese Analyten eine einheitliche Methode entwickelt werden, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Werte sicherzustellen.

Für die Gewebeproben war eine separate Methode zu entwickeln, da die Analyten nicht gelöst, sondern noch in einer festen Matrix gebunden vorlagen.

### **3.4.5.1. Untersuchung des Metabolismus in Zellkulturüberständen von alveolarepithelialer Typ II-Zellen und mikrosomalen Membranen der Lunge, sowie Plasma**

Für Analysen wäßriger proteinhaltiger Lösungen haben sich die in Kapitel 2.1.2.1 beschriebenen "Restricted Access Materials" (RAM) schon in einigen Fällen erfolgreich bewährt. Die Verwendung dieser Materialien hatte den Vorteil, daß die Proteine in der Lösung nicht durch einen zusätzlichen Schritt abgetrennt werden mußten, sondern diese Probenvorbereitung HPLC-integriert, durch eine Säulenschaltung automatisiert durchgeführt werden konnte.

Der Geräteaufbau ist in Abb. 13 dargestellt.

Die integrierte Säulenschaltung setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

- Zentrifugation der Probe zur Abtrennung von Partikeln
- Fraktionierung der Proteine auf der mit RAM-Partikeln befüllten Vorsäule
- Analyttransfer auf die chromatographische Trennsäule durch Ventilschaltung
- Chromatographie der Analyten
- Detektion

Die Abtrennung der Partikel durch Zentrifugation ( $3000 \text{ U min}^{-1}$ ) war deshalb wichtig, da sie sich in den Fritten und dem Säulenmaterial festsetzen und nach einiger Zeit Verstopfungen verursachen würden, so daß eine reproduzierbare Chromatographie nicht mehr möglich gewesen wäre. Um ein Ausfallen von Partikeln während der Probenvorbereitung zu verhindern, wurde ein Inlinefilter zwischen Injektionssystem und Vorsäule gesetzt, der eine Kontaminierung der Vorsäule unterbinden sollte. Dieser Filter war regelmäßig zu wechseln.

#### **3.4.5.1.1. Chromatographische Bedingungen**

Als RAM-Vorsäule wurde eine Lichrospher ADS RP8-Vorsäule gewählt, da vor allem die polaren Metaboliten des Verapamils auf dem RP8-Material besser reteniert wurden als auf RP 18-Material.

Die RAM-Vorsäulen sind so dimensioniert ( $25 \times 4 \text{ mm}$ ,  $60 \mu\text{m}$ ), daß sie nur mit höheren Flußraten zwischen  $0.6$  und  $1.0 \text{ ml/min}$  betrieben werden können, wenn nicht Peakverbreiterungen in der Chromatographie auftreten sollen. Deshalb läßt sich diese RAM-Vorsäule auch nicht mit einer Säule geringeren Durchmessers (z. B.  $250 \times 2 \text{ mm}$ ,  $4 \mu\text{m}$ ) koppeln, sondern nur mit Säulen entsprechend höheren Durchmessers und verringerter Länge, um Peakverbreiterungen zu vermeiden. Für

die Methodenentwicklung wurde eine kürzere RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm, 5 µm) eingesetzt.

Um einen hohen Probendurchsatz ohne lange Äquilibrierungszeiten zu gewährleisten, sollte die Trennung nach Möglichkeit isokratisch [Acetonitril/Ammoniumacetatpufferlösung (0.01 M, pH = 6), 1/1 (v/v)] bei einem Fluß von 0.6 ml/min durchgeführt werden. Die Länge des Chromatographielaufes betrug 25 min. Für die direkte Kopplung mit dem MS mußte der Fluß mit Hilfe eines Splitters reduziert werden (1:4 bei einer Flußrate von 0.6 ml/min). Die MS-Bedingungen sind im Anhang aufgelistet.

#### **3.4.5.1.2. Bestimmung der Ventilschaltzeiten**

Für eine automatisierte Fraktionierung der Probe mußten zuerst die Ventilschaltzeiten bestimmt werden, die von der Höhe des Flusses und der Zusammensetzung der mobilen Phase abhing.

Im zweiten Schritt der Probenaufbereitung wurden die Analyten von den Proteinen auf der Vorsäule abgetrennt. Während dieses Fraktionierungsschrittes mußte sichergestellt werden, daß die Proteine nicht durch Kontakt mit organischem Lösemittel ausfielen.

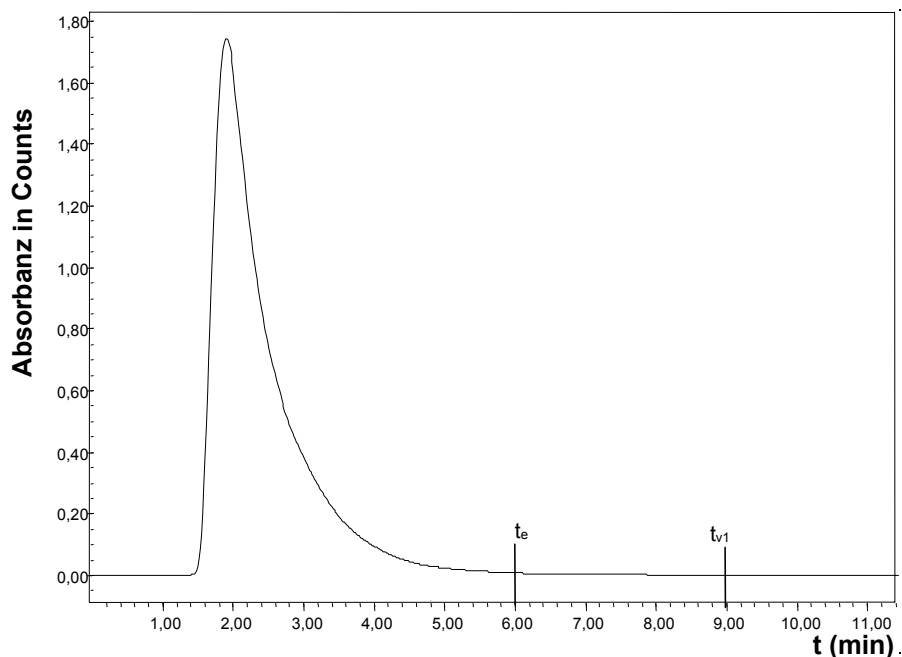
Der Beginn des Proteinpräzipitierens hing vom Anteil des organischen Lösemittels im Eluenten ab. Für methanolhaltige Lösungen begann dies bei einem Anteil von 15-20 % organischer Phase, für acetonitrilhaltige schon bei 10-15 %. Ein gewisser Anteil an organischem Lösemittel war allerdings vorteilhaft, da so die Bindung zwischen Protein und Analyt gespalten (sofern sie nicht kovalent war) und sehr polare Matrixbestandteile von der Phase gespült werden. Ein Zusatz von 5 % organischem Lösemittel zu der Elutionslösung ist in der Regel ausreichend. Durch Pufferzusatz wurde die Proteinelutionslösung auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, um einem Ausfallen der Proteine im Schaltungssystem vorzubeugen.

Für die Proteinelutionslösung wurde deswegen und aufgrund der Zusammensetzung der mobilen Phase eine Ammoniumacetatlösung (0.01M, pH = 6) mit 5 % Anteil an Acetonitril als Modifier gewählt. Die Proteine wurden bei einem Fluß von 0.8 ml/min abgetrennt.

Zunächst mußte die Zeit bestimmt werden, die für eine vollständige Elution der Proteine notwendig war. Hierfür wurde die Vorsäule direkt mit dem UV-Detektor gekoppelt und die Elution der Proteine bei 280 nm verfolgt. Als Proteinlösung wurde unbehandeltes Rattenplasma (50 µl) direkt eingespritzt. In Abb. 27 wird das

Chromatogramm der Proteinelution gezeigt.

**Abb. 27:** UV-Chromatogramm der Proteinelution bei 280 nm



Nach 6 Minuten waren alle Proteine von der ADS-Phase eluiert ( $t_e = 6$  min). Damit beim Transferschritt keine Proteine präzipitierten und die Säule verstopfte und um keine Proteine zu verschleppen, wurde als Ventilschaltzeit ( $t_{v1} = t_e + 3$  min) gewählt. Nach 9 min sollten sich auf jeden Fall keine Proteine mehr auf der ADS-Vorsäule befinden, so daß das Ventil umgeschaltet und die Analyten mit der mobile Phase auf die HPLC-Säule transferiert werden konnten.

Anschließend wurde ein Verapamilstandard (10  $\mu\text{g/ml}$ ) unter den Proteinelutionsbedingungen injiziert, um einen eventuellen Durchbruch dieser Substanzen zu bestimmen. Als nach 2 h noch keine Substanz von der Säule eluiert war, wurde das Experiment abgebrochen. Auf die Bestimmung des maximalen Durchbruchs wurde verzichtet, da nur geringe Analytmengen auf der Säule angereichert werden sollten.

Im dritten Schritt der automatisierten Probenvorbereitung wurden die Analyten nach erfolgter Fraktionierung durch Umschalten des Ventils im Backflush-Verfahren mit der mobilen Phase der HPLC auf die chromatographische Säule transferiert.

Die Zeit, die zur vollständigen Elution des Analyten von der ADS-Vorsäule auf die analytische Säule benötigt wurde, bezeichnet man als Transferzeit  $t_T$ .

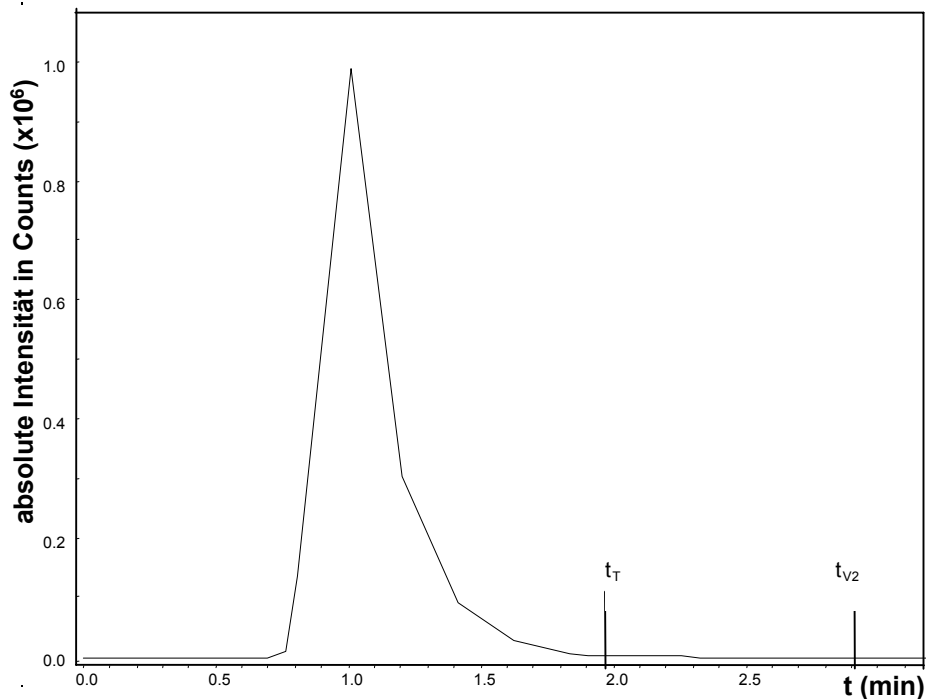
Zur Bestimmung dieser Zeit wurde die RAM-Vorsäule direkt mit dem HPLC-MS-System gekoppelt und ein Verapamilstandard (10  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die Vorsäule injiziert. Da nur wenige Referenzmetaboliten zur Verfügung standen und Verapamil die

unpolarste dieser Substanzen war, wurde die Transferzeit für Verapamil bestimmt, da die unpolarste Substanz auch die längste Elutionszeit von der RAM-Vorsäule haben sollte.

$t_T$  bezeichnete den frühesten Zeitpunkt, an dem das Ventil in seine Ausgangsposition zurückgeschaltet werden konnte. Zur Sicherheit setzte man einen zusätzlichen Zeitpuffer, um keine Analyten zu verschleppen. Die Ventilschaltzeit betrug so  $t_{V2} = t_T + 1 \text{ min}$ .

In Abb. 28 wird das Ionenchromatogramm des Verapamils abgebildet, dem die Transferzeit entnommen werden kann.

**Abb. 28:** Bestimmung der Transferzeit des Verapamils (Ionenchromatogramm)



Nach 3 min konnte das Ventil also wieder in die Ausgangsposition umgelegt werden. Die Länge der Transferzeit hing von der Höhe des Flusses und von der Zusammensetzung der mobilen Phase ab.

#### 3.4.5.1.3. Validierung der Methode

Zur Bestimmung der Linearität wurden je 1 ml Plasma und Zellkulturmedium mit einer Verapamil-Standardlösung und dem internen Standard Gallopamil versetzt, um für Verapamil auf Endkonzentrationen von 10, 20, 40, 50, 70 und 100 ng/ml und für Gallopamil eine Endkonzentration von 50 ng/ml zu erreichen. 50  $\mu$ l dieser Lösungen wurden auf die RAM-Vorsäule injiziert. Um Verschleppungen zu vermeiden, wurden

nach jeder Probe 50 µl Methanol auf die Vorsäule injiziert. Aus diesem Wert konnte der Verschleppungsgrad (Carry-over) berechnet werden. Er lag in der Regel unter 5 %.

Zur Beurteilung der Linearität wurden die berechneten Korrelationskoeffizienten herangezogen. Die Daten belegen eine gute Linearität im untersuchten Konzentrationsbereich.

Die Wiederfindungen wurden für Verapamil, Norverapamil und Gallopamil in Rattenplasma und Zellkulturüberständen bestimmt, nachdem sie der jeweiligen Matrix in 5 verschiedenen Konzentrationen (20, 50, 70, 100 und 200 ng/ml) zugesetzt worden waren. In der Tab. 7 sind die mittleren Wiederfindungen dargestellt. Die Daten zeigen, daß für Verapamil sehr gute Wiederfindungen erzielt werden konnten. Die Präzision lag bei den ersten Messungen unter 20 %, was für eine Quantifizierung noch akzeptabel war. Nach ca. 2000 Injektionen verschlechterte sich die Präzision auf einen Wert von 30 %.

**Tab. 7:** Wiederfindungen von Verapamil aus den unterschiedlichen Matrices.

Matrix	Verapamil			Norverapamil		
	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG (ng/ml)	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG (ng/ml)
Zellkultur- medium	(97 ± 8)%	0,9990	5	(84 ± 7)%	0,9874	5
Plasma	(97 ± 4)%	0,9968	7	(92 ± 6)%	0,9910	8

Wdf.: Wiederfindung

NWG: Nachweisgrenze

R<sup>2</sup> Lin.: Korrelationskoeffizient für die Linearität

#### 3.4.5.1.4. Zusammenfassung

Verapamil läßt sich gut mit einer RAM-Vorsäule aus einer proteinhaltigen biologischen Matrix isolieren. Die Proteine konnten ohne weiteren Probenvorbereitungsschritt abgetrennt werden. Vorexperimente mit Zellkulturüberständen haben außerdem gezeigt, daß sich selbst polare Metaboliten und Glucuronide auf dieser Phase isolieren ließen. Die Präzision des Verfahrens war mit unter 20 % zumindest am Anfang des Verfahrens gut, der Carry-Over war vernachlässigbar klein, wirkte sich aber auf die Nachweisgrenzen (5-9 ng/ml) und somit auf die Empfindlichkeit des Verfahrens aus. Möglicherweise konnten aufgrund dieses Carry-Overs in geringen Konzentrationen gebildete Metaboliten nicht erfaßt werden. Für die Quantifizierung des Verapamils mit einem internem Standard war dies weniger entscheidend, da das S/N-Verhältnis in Realproben meist deutlich über 3

lag. Insgesamt konnte so eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung des Metabolismus in Zellkulturüberständen, Mikrosomen und Plasma entwickelt werden. Durch die online-Probenvorbereitung mit der HPLC konnte viel Zeit (12 min Fraktionierung + 25 min für den chromatographischen Lauf) gegenüber der konventionellen SPE (mehrere Stunden) eingespart werden. Bei Verwendung einer geeigneten Steuerungssoftware ließe sich die Fraktionierung parallel zur Probenvorbereitung durchführen, wodurch die Gesamtanalysenzeit nur noch durch die Länge des chromatographischen Laufes limitiert werden würde.

#### **3.4.5.2. Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Organen mittels MSPD**

Im Gegensatz zu Zellkulturüberständen, Mikrosomenlösungen und Plasmaproben lag der Analyt in Gewebeproben nicht in gelöster Form vor, sondern war in einer festen Matrix gebunden. Vor der Analyse mußte die Gewebematrix extrahiert werden. In Kapitel 2 wurden mehrere Verfahren vorgestellt, die sich in der Vergangenheit bewährt haben. Gerade in den letzten fünf Jahren hat sich die "Matrix Solid Phase Dispersion" (MSPD) (siehe Kapitel 0) etabliert. Für die Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Gewebematerial ist aber bislang noch keine Methode entwickelt worden. Die Methode sollte nicht nur für die Untersuchung des Metabolismus in der Lunge, sondern auch im Herzgewebe der Ratte eingesetzt werden.

Für die MSPD wurden 0.5 g Organgewebe und 2 g Lichrospher RP18-Material (25-40 µm) eingewogen. Zum Homogenisieren mußte das zerkleinerte Gewebe in Wasser gelöst werden. Der Wasseranteil durfte aber nicht zu hoch sein, damit das Material beim Verreiben nicht zu feucht wurde, da es sich sonst schlechter in die Extraktionskartusche füllen ließ. Außerdem würde der beschriebene Verteilungsmechanismus auf der Oberfläche des Materials nicht mehr funktionieren, da nicht mehr alles Wasser an den freien Silanolgruppen gebunden werden könnte. Deshalb wurde der Wasserzusatz auf 1 ml limitiert. Zur späteren Quantifizierung wurde der Lösung ein interner Standard (Gallopamil, 1 µg/ml) auf eine Endkonzentration von 50 ng/ml zugesetzt. Der MSPD-Prozeß wird schematisch in Abbildung 11 (Kapitel 3) dargestellt. Nach Verreiben mit dem RP18-Material wurde die Mischung in Kartuschen überführt, die mit Fritten abgedichtet wurden.

#### **3.4.5.2.1. Extraktion der Analyten**

Im ersten Schritt sollten die Matrixbestandteile (z. B. Proteine, Fettsäuren) von den Analyten abgetrennt werden.

Verapamil und seine Metaboliten haben recht unterschiedliche Polaritäten, so daß eine stufenweise Elution nach Polaritäten sinnvoll schien. Sandvoss [129] entwickelte eine stufenweise Elution von Seesternextrakten, um eine bestimmte Saponinfraktion zu isolieren. Hierfür wurde die Extraktion mit 100 % Wasseranteil begonnen, wobei man im Laufe der Extraktion den Wasseranteil reduzierte und den Acetonitrilanteil erhöhte (bis auf 100 %).

Zur Entwicklung einer Methode wurden 0.5 g eines homogenisierten Lungengewebeextrakts der Ratte mit den Standards Norverapamil, Gallopamil und Verapamil versetzt. Anschließend wurde stufenweise eluiert: Begonnen wurde mit einem Wasseranteil von 100 %, nachfolgend mit einem Wasseranteil von 90 % und 10 % Acetonitril usw. Bei einem Acetonitrilanteil von 50 % begannen die Analyten durchzubringen. Gleichzeitig enthielt der Extrakt neben den Analyten eine ganze Reihe von Matrixinterferenzen, und die Wiederfindungen waren auch bei Erhöhung des organischen Anteils sehr schlecht (< 50%), so daß diese stufenweise Elution für die Extraktion von Verapamil und seinen Metaboliten nicht geeignet war. Eine wesentliche Verbesserung der Extraktion konnte durch Verwendung einer anderen Elutionslösung erreicht werden.

Die Matrixbestandteile wurden durch Spülen mit einer wäßrigen Lösung (Acetonitrilanteil 40 %) entfernt. Nach Spülen mit 8 ml dieser Lösung wurde noch kein nennenswerter Durchbruch des Analyten registriert. Die Extraktion erfolgte mit einer Dichlormethan/Essigesterlösung [90/10 (v/v)]. Zu Beginn wurde mit Portionen von je 1 ml eluiert. Nach Elution mit 8 ml waren die Referenzanalyte nahezu quantitativ von der Phase gespült worden.

Das Eluat wurde unter einem Stickstoffstrom eingeengt und der Rückstand in 200 µl Methanol aufgenommen. Die Analytik erfolgte mit dem gleichen HPLC-MS-System wie unter Kapitel 3.4.2 beschrieben. Für die Analytik wurden die gleichen chromatographischen Bedingungen wie in Kapitel 3.4.5.1.1 beschrieben, gewählt.

Die Chromatogramme zeigten auch, daß deutlich weniger Matrixbestandteile im Eluat vorhanden waren.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde Lungengewebe (je 0.5 g) mit Verapamil und Norverapamil in 5 unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 500, 1000 und



2000 ng/g (Gewebe) für jeweils 2 Organe bestimmt. Zu diesen Proben wurden der interne Standard Gallopamil in einer Konzentration von 50 ng/ml gesetzt.

Die mittleren Wiederfindungen, der Korrelationskoeffizient  $R^2$  und die Nachweisgrenzen des Verfahrens sind in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8:** Wiederfindungen, Linearitäten und Nachweisgrenzen des MSPD-Verfahrens

Matrix	Verapamil			Norverapamil		
	Wdf.	$R^2$ Lin.	NWG (ng/g)	Wdf.	$R^2$ Lin.	NWG (ng/g)
Lungen- gewebe	(96 ± 12)%	0,9982	10	(84±9)%	0,9874	14
Herz- gewebe	(89 ± 15)%	0,9783	12	(79 ± 20)%	0,9763	16

Wdf.: Wiederfindung

NWG: Nachweisgrenze

$R^2$  Lin.: Korrelationskoeffizient als Maß für die Linearität

Die Präzision lag in der Regel unter 20 %, was ein akzeptabler Wert war.

### 3.4.5.2.2. Zusammenfassung

MSPD stellt eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung von Analyten aus Organen dar. Die Nachweisgrenzen sowie die Wiederfindungen waren für Verapamil und Norverapamil gut. Die Präzision war für eine Quantifizierung des Verapamils in den Matrices ausreichend, da die Schwankungen zwischen den Spezies im Normalfall zwischen 30 und 50 % und somit wesentlich höher als die Meßgenauigkeit liegen.

Ein Nachteil des Verfahrens war die zeitaufwendige Probenvorbereitung. Für das Einwiegen, Zerkleinern und Homogenisieren der Probe wurden pro Probe mindestens 1 h benötigt, da alle verwendeten Geräte hinterher von Geweberesten gesäubert werden mußten. Das Vermischen in der Reibschale und Abfüllen der Probe in die vorgesehenen Kartuschen kostete mit anschließender Reinigung der Geräte ebenfalls ca. 1 h Zeit pro Probe. Die Extraktion nahm ca. 30 min in Anspruch, aber das Einengen des Eluates dauerte wesentlich länger, so daß die Gesamtanalysenzeit vor allem durch die Probenvorbereitung bestimmt wurde.

### **3.4.6. Entwicklung von molekular geprägten Adsorbentien für Metabolismustudien**

Über den Einsatz der molekular geprägten Adsorbentien in der Bioanalytik wurde schon in Kapitel 3.1.1 ausgiebig berichtet. Bislang wurden sie zwar für die Extraktion einiger Herzmedikamente, wie Propanolol [149] oder Nifedipin [150], und strukturverwandte Verbindungen erfolgreich eingesetzt, es wurde aber bisher noch nicht gezeigt, inwieweit sie für die Extraktion von Arzneistoffmetaboliten, die oft noch viele Strukturgleichheiten mit der Muttersubstanz haben, einsetzbar sind.

Damit überhaupt ein MIP für Verapamil herstellbar war, mußte zuerst überprüft werden, ob es zwischen der Substanz und den Polymermonomeren nicht-kovalente Wechselwirkungen gab, die Voraussetzung für eine spätere molekulare Prägung waren. Da Verapamil eine basische Verbindung ( $pK_s = 9.2$ ) ist, wurde als Polymermonomer die Methacrylsäure (MAA) eingesetzt.

#### **3.4.6.1.1. UV-Spektroskopische Analyse**

Für Verapamil wurde sich auf eine qualitative Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Monomer und Templatmolekül beschränkt.

Bei Verwendung des kommerziellen Hydrochlorids wurden für Verapamil im UV-Spektrum keine Verschiebungen der Absorptionsbande gesehen. Erst nach Extraktion der freien Base konnte eine schwache Wechselwirkung im UV-Spektrum bei 280 nm beobachtet werden. Die UV-Spektren sind im Anhang abgebildet.

Zur Extraktion der freien Base wurde zu einer wäßrigen Lösung von 700 mg Verapamil-Hydrochlorid  $NH_4OH$  bis  $pH = 10$  gegeben. Die freie Base wurde mit Diethylether extrahiert (4 x 50 ml). Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt. Die Ausbeute betrug 555 mg. Die freie Base wurde in Chloroform gelöst.

Je 2.5 ml dieser Verapamillösung (0.1 mM gelöst in  $CHCl_3$ ) wurden in eine 10 mm Proben- und eine Referenzküvette des UV-VIS Spektrophotometers gefüllt. Sechs Additionen zu je 1  $\mu l$  eines 1.25 M MAA-Aliquots wurden in die Probenküvette gefüllt, und nach 2 min Durchmischen und 5 min Äquilibrierung wurde das UV-Spektrum aufgezeichnet. Ein zweites UV-Spektrum wurde nach 20 min aufgenommen, um Veränderungen in der UV-Absorption zu reproduzieren. Das UV-Spektrum des MAA-Monomers wurde anschließend ohne Zugabe des Templatmoleküls aufgezeichnet.

### 3.4.6.1.2. Polymerisation

Die molekular geprägten Adsorbentien wurden nach der von Mosbach et al. [90] entwickelten Methode hergestellt.

Die Polymerisationsmischung setzte sich aus MAA (frisch destilliert), EDMA als Quervernetzer und racemischem Verapamil (freie Base) zusammen. Die Reaktion wurde in Chloroform in einem molaren Verhältnis von MAA zu Verapamil von 2 : 1 durchgeführt.

Folgende Reagenzien wurden eingewogen und in ein 4 ml Vial zusammengegeben:

Verapamil	107 mg
MAA	242 mg
EDMA	295 mg
AIBN	57 mg
CHCl <sub>3</sub>	3.0 ml

Die Lösung wurde unter Stickstoff für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast. Die Polymerisation wurde 24 h bei 60°C im Wasserbad durchgeführt. Parallel dazu wurde die Polymerisation unter den gleichen Bedingungen, nur ohne Verapamilzusatz, durchgeführt.

Danach wurde das Polymer für 1 h im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet, um anschließend im Mörser in kleine Partikel zerkleinert zu werden.

Die kleineren Partikelfractionen mit einem Partikeldurchmesser von unter 50 µm wurden durch Sieben und dreimaliges Sedimentieren in Methanol abgetrennt, da sie bei der späteren Chromatographie die Säulen und Fritten verstopft hätten.

Nach erfolgter Polymerisation mußte das Templatmolekül aus dem MIP entfernt werden. Durch Soxhlet-Extraktion für 24 h mit einer Methanol/Essigsäurelösung [90/10 (v/v)] konnte ein Großteil des eingesetzten Verapamils zurückgewonnen werden.

In der weiteren Aufarbeitung mußte das Lösemittel aus dem Polymer entweder unter Vakuum oder unter Erwärmung entfernt werden.

Nach erfolgter Extraktion wurden die Partikel wieder für 1 h im Trockenschrank getrocknet. Beim Trocknen war darauf zu achten, daß die Temperatur 60°C nicht überstieg, da Ausdehnungseffekte im Polymer die molekulare Prägung unwiderruflich zerstören könnten. Leider ließ sich nicht alles Verapamil zurückgewinnen, was in der Folge dann zu Blindwerten im Meßsystem führte. Dieser Effekt kann vermieden werden, wenn man für die Herstellung des Polymers nicht das eigentliche

Targetmolekül, sondern eine strukturverwandte Verbindung verwendet. Für Verapamil war dies aber nicht möglich.

### 3.4.6.1.3. Bestimmung der molekularen Prägung (Batch binding assay)

Zur Bestimmung der Bindungseffizienz zwischen MIP und Templatmolekül wurde in Gefäß 1 und Gefäß 2 jeweils ein gewisser Teil an geprägtem und in Gefäß 3 der gleiche Teil an nicht-geprägtem Polymer (100 mg) gegeben und in Acetonitril (2 ml) suspendiert. Zu den Lösungen in Gefäß 1 und Gefäß 3 wurden 20 µl des Templatmoleküls (Verapamil, 1 mg/ml, gelöst in H<sub>2</sub>O) zugesetzt. Gefäß 1 enthielt also nur das molekular geprägte Polymer mit Verapamilzusatz, Gefäß 2 enthielt nur das molekular geprägte Polymer ohne Verapamilzusatz, und Gefäß 3 beinhaltete das nicht geprägte Polymer mit Verapamilzusatz. Danach wurden die Lösungen gerührt. Nach 12 Stunden wurden 200 µl des Überstandes abgenommen und die Verapamilkonzentration im Überstand bestimmt. Hierfür wurden die in Kapitel 3.4.5.1.1 beschriebenen chromatographischen Bedingungen gewählt.

Beim geprägten Polymer sollte das Verapamil in die freien Bindungsstellen diffundieren und dort zurückgehalten werden. Daher sollte die Restkonzentration im Überstand geringer sein als im Überstand des Gefäßes mit nicht geprägtem Polymer. Da aber selbst im nichtgeprägten Polymer noch genügend freie Bindungsstellen vorhanden waren, nahm auch dort in der Regel die Konzentration im Überstand der Lösung ab. Aus dem Überstand aus Lösung 2 ließ sich errechnen, welcher Anteil des Verapamils noch nach der Soxhletextraktion im Polymer gebunden war. Dieser Blindwert, auch als "leaching" bezeichnet, konnte vom Konzentrationswert der Lösung 1 subtrahiert werden. Das Konzentrationsverhältnis der Lösung 1 zu Lösung 3 ergab den "Imprinting-Effekt". Er beschreibt, welcher Anteil des Verapamils im geprägten Polymer gegenüber dem nicht geprägten retiniert wird. Die Werte sind in Tab. 9 dargestellt.

**Tab. 9:** Bestimmung des Prägungs-Effektes

		Peakflächen-einheiten	Standardabweichung (%) (n=3)	Imprinting-Effekt
Lösung 1	MIP + Verapamil	2,98 10 <sup>8</sup>	2	50%
Lösung 2	MIP ohne Verapamil	8,50 10 <sup>7</sup>	3	Blindwert
Lösung 3	Kontrolle + Verapamil	4,31 10 <sup>8</sup>	1	

MIP: molecular imprinted polymer (MIP)

Kontrolle: non imprinted polymer (NIP)

Bei dem hergestellten MIP wurden ca. 50 % des Verapamils in den Bindungsstellen des Polymers gegenüber dem nicht geprägten Polymer gebunden.

Das mit Verapamil geprägte Polymer war also für die Extraktion von Verapamil geeignet.

Es bleibt zu testen, ob es auch für die Extraktion von Verapamilmetaboliten aus biologischen Proben geeignet ist.

#### **3.4.6.2. MISPE**

Zur Durchführung einer offline-Festphasenextraktion mit molekular geprägten Adsorbentien (MISPE) wurden je 200 mg des geprägten und des nicht geprägten Sorbens eingewogen und in 6 ml-Extraktionskartuschen mit Fritten gefüllt.

Bevor eine wäßrige Probe mit Analyten auf die Phase gegeben werden konnte, mußte das Material mit einer organischen Phase konditioniert werden, vorzugsweise einer Methanol/Essigsäure-Lösung [99/1 (v/v)] und Acetonitril, da das Ausmaß der molekularen Prägung auch in Acetonitril bestimmt wurde. Für die Methodenentwicklung war entscheidend, wieviel wäßrige Lösung auf die Phase gegeben werden konnte, ohne ein Durchbrechen des Analyten zu verursachen. Ein Durchbruch bis zu 5 % wurde als akzeptabel angesehen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Volumina an Wasser (1, 3, 5, 7, 10 ml) mit der gleichen Menge an Referenzsubstanz (50 ng) versetzt. Als Referenzsubstanzen wurden Norverapamil, Verapamil und Gallopamil eingesetzt. Nach Zugabe von maximal 5 ml der Analytlösung lag der Durchbruch bei allen verwendeten Substanzen bei über 5 % (bei n = 3).

Als nächstes wurde der Matrixeinfluß untersucht. Zu diesem Zweck wurde humaner Urin 1:10 mit Wasser verdünnt und mit den Standards versetzt. Als weitere Matrix wurde Zellkulturmedium ohne Proteininhalt verwendet, das mit den gleichen Konzentrationen an Referenzsubstanzen versetzt wurde. Hier zeigte sich, daß bei Verwendung des Zellkulturmediums schon nach Zugabe von 3 ml der Durchbruch bei allen Analyten über 5 % lag. Bei der Verwendung von verdünntem Urin konnten wiederum 5 ml aufgegeben werden.

Im nächsten Schritt mußte untersucht werden, mit wieviel Acetonitril gespült werden durfte, ohne daß die Analyten durchbrachen. Hierzu wurde die Phase zuerst mit Methanol/Essigsäurelösung [99/1 (v/v)] und Acetonitril konditioniert, um anschließend 5 ml einer wäßrigen Probe, die mit den Analyten versetzt war,

aufzugeben. Anschließend wurde mit unterschiedlichen Volumina an Acetonitril gespült (1, 3, 5, 7, 10 ml). Als Ergebnis konnte mit 5 ml Acetonitril gespült werden, ohne dass nennenswerter Durchbruch (< 5 %) der Analyten auftrat.

Danach wurde die Matrixabhängigkeit dieses Spülschrittes untersucht. Hierzu wurden die Analyten Norverapamil, Verapamil und Gallopamil wieder in 5 ml verdünntem Urin oder Zellkulturmedium in einer Endkonzentration von 50 ng/ml gelöst. Nach Konditionierung und Beladen des geprägten Sorbens wurde mit den beschriebenen unterschiedlichen Volumina an Acetonitril gespült. Hier zeigte sich, daß bei der Elution des Urinextraktes nach 5 ml signifikanter Durchbruch auftrat, während bei Verwendung von Zellkulturmedium bei der gleichen Analytkonzentration schon Durchbruch nach Spülen mit 3 ml Acetonitril zu verzeichnen war.

Zum Schluß wurde das Elutionsvolumen für eine möglichst quantitative Elution der Analyten bestimmt. Hierzu wurde die Kartusche mit 5 ml einer Methanol/Essigsäurelösung [99/1 (v/v)] und 5 ml Acetonitril konditioniert und mit 5 ml einer wäßrigen Lösung der Analyten (50 ng/ml) beladen. Nach Spülen mit 5 ml Acetonitril wurde mit je 1 ml Methanol/Essigsäure [99/1 (v/v)] eluiert. Die Eluate wurden getrennt aufgefangen und analysiert. Nach 5 ml waren die Analyten nahezu quantitativ von der Säule eluiert. Um Verschleppungen vorzubeugen, wurde die Kartusche zum Ende nochmal zusätzlich mit 5 ml Methanol/Essigsäurelösung [99/1 (v/v)] gespült.

Abschließend wurden die Wiederfindungen für Verapamil und Gallopamil (50 ng/ml) aus verdünntem Urin und Zellkulturmedium bestimmt (n = 3). Der Durchbruch, die Spüllösung und die Eluatfraktion wurden gesammelt und die Konzentration der Komponenten bestimmt. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit nicht geprägtem Material wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 dargestellt.

Im verdünnten Urin konnte ein leichter Prägungseffekt von Verapamil und Gallopamil gegenüber den nichtgeprägten Verbindungen festgestellt werden. Die molekulare Prägung wirkte sich somit auch auf strukturverwandte Verbindungen wie Gallopamil aus. Im Zellkulturmedium konnte eine Anreicherung auf der MIP-Phase nicht erreicht werden. Offenbar verminderten Matrixeffekte eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den untersuchten Verbindungen und der MIP-Phase, was zu einem schnellen Durchbruch führte (vergleiche Tab. 9 und 10). Inwieweit andere Metaboliten von der MIP-Phase retiniert werden, bleibt zu untersuchen.

**Tab. 10:** Bestimmung des Prägungseffektes für Verapamil und Gallopamil bei der MISPE (Verteilung der Analyten auf Durchbruch, Spülfraction, Eluat in Abhängigkeit von der Matrix)

	Urin					
	Durchbruch		Spülfraction		Eluat	
	MIP (%)	Kontrolle (%)	MIP (%)	Kontrolle (%)	MIP (%)	Kontrolle (%)
<b>Verapamil</b>	8 ± 3	13 ± 8	21 ± 4	38 ± 12	80 ± 7	57 ± 10
<b>Gallopamil</b>	4 ± 3	4 ± 1	2 ± 2	29 ± 10	94 ± 6	72 ± 10

	Medium					
	Durchbruch		Spülfraction		Eluat	
	MIP (%)	Kontrolle (%)	MIP (%)	Kontrolle (%)	MIP (%)	Kontrolle (%)
<b>Verapamil</b>	2 ± 2	8 ± 4	66 ± 4	56 ± 9	32 ± 9	31 ± 10
<b>Gallopamil</b>	1 ± 2	6 ± 1	68 ± 2	86 ± 5	30 ± 11	23 ± 4

### 3.4.6.3. Säulenschaltung von einer RAM-Vorsäule mit einer MIP-Vorsäule und einer analytischen Säule

Für die Säulenschaltung von molekular geprägten Polymeren mit einem "Restricted Access Material" (RAM) wurde der in Kapitel 2.1.2.2 beschriebene Geräteaufbau verwendet. Zum Befüllen einer Mikrosäule wurden die MIP-Partikel in ein kleines Volumen Methanol gegeben und die Lösung wurde in ein Edelstahlrohr gefüllt. Die fertiggepackte Säule wurde mit Fritten versiegelt.

Von der biologischen Probe wurden 950 µl abgenommen und mit 50 µl des internen Standard (Gallopamil, 1 µg/ml) versetzt.

Die Probe wurde anschließend für 10 min bei 3000 U min<sup>-1</sup> zentrifugiert.

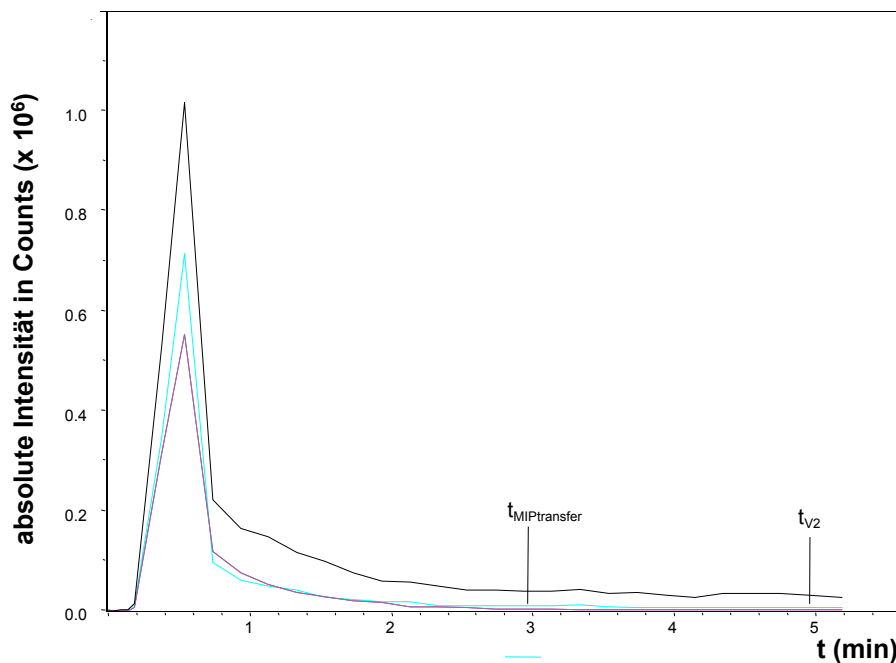
Anschließend wurde die Probe auf die Lichrospher ADS RP-8-Vorsäule injiziert. Von den Plasmaproben wurden maximal 50 µl, von den Mikrosomen und Zellüberständen wurden maximal 100 µl eingespritzt. Die Proteine wurden durch zehninütiges Spülen mit einer wässrigen Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6), die 5 % Acetonitril enthielt, entfernt. Nach Umschalten des Schaltventils 1 wurden die Analyten mit Acetonitril auf die MIP-Säule transferiert. Für die Ventilschaltzeiten diese ersten Schritts wurden die Parameter aus Kapitel 3.4.5.1. übernommen.

Für die Bestimmung der Schaltzeiten von Ventil 2 war es wichtig, eventuellen Durchbruch festzustellen. Da selbst nach 5 min kein nennenswerter Durchbruch an Analyten beobachtet werden konnte, wurde auf eine Optimierung der Acetonitrilflußrate verzichtet.

Um die Transferzeit der Analyten von der MIP-Vorsäule auf die analytische Säule zu

bestimmen, wurde die MIP-Vorsäule direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt. Als Eluent wurde eine Acetonitril/Wasserlösung, die mit 1 % Essigsäure (v/v) versetzt war, bei einer vorgegebenen Flußrate von 0.6 ml/min verwendet. Nach 3 min waren alle Substanzen von der MIP-Vorsäule eluiert. Um Verschleppungen zu vermeiden, wurde die Ventilschaltzeit auf  $t_{V2} = 5$  min gesetzt (siehe Abb. 30).

**Abb. 29:** Transferzeit von Verapamil und Gallopamil von der MIP-Vorsäule auf die analytische Säule



Nach 5 min konnte also das zweite Ventil geschaltet werden, und die Analyten wurden im Backflushverfahren auf die analytische RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm, 5 µm) transferiert. Die Länge des Chromatographielaufes betrug 25 Minuten.

#### 3.4.6.3.1. Peakverbreiterung durch MIP

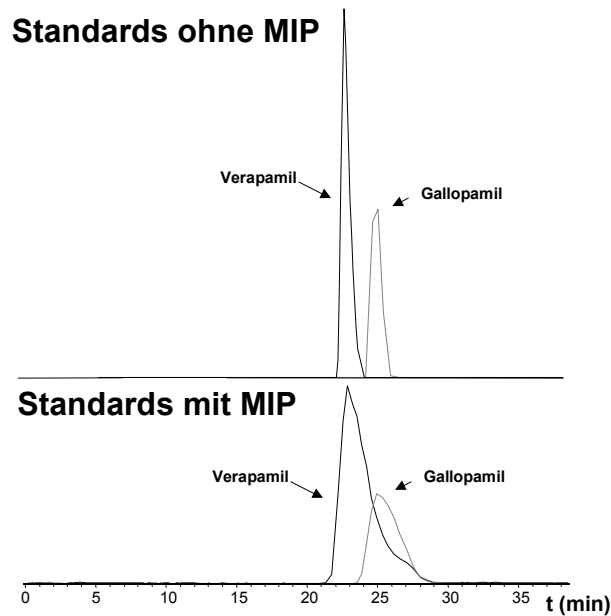
Ein Nachteil der MIP war, daß die Analyten eine hohe Affinität zum Trägermaterial besaßen und nur langsam von der Phase eluierten. Dies führte bei der Chromatographie zu starken Peakverbreiterungen, was die chromatographische Auflösung erheblich beeinträchtigte. Für Verapamil und Gallopamil ist dieser Effekt in Abb. 30 dargestellt.

Zur Bestimmung der Peakverbreiterung hat Mullett [91] ein Verfahren entwickelt, bei dem eine verdünnte Lösung von Aceton auf die Vorsäule injiziert wurde. Die Ketogruppe des Acetons ging auf der MIP-Vorsäule Wechselwirkungen mit den Monomeren der MAA ein, Wasserstoffbrückenbindungen wurden ausgebildet.

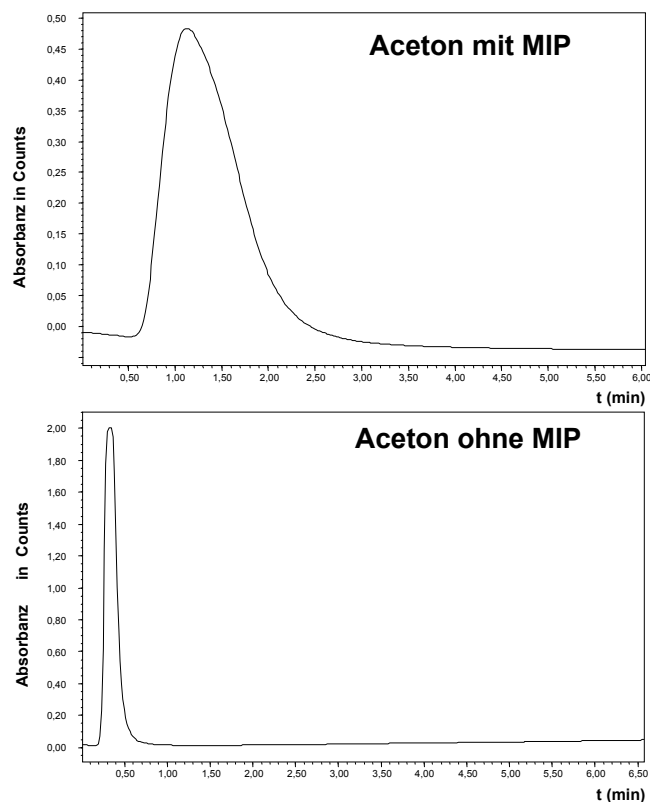


Dadurch wurde das Elutionsprofil im Vergleich zu einer Injektion ohne MIP Vorsäule stark verbreitert. Wie Abb. 31 entnommen werden kann, war die Peakverbreiterung durch die MIP-Vorsäule etwa fünfmal so groß wie ohne Vorsäule.

**Abb. 30:** Peakverbreiterung von Verapamil und Gallopamil durch MIP



**Abb. 31:** Bestimmung der Peakverbreiterung durch MIP (UV:  $\lambda = 230$  nm)



Bei der normalen online-SPE Kopplung von MIP konnte diese Peakverbreiterung

durch die "Pulsed Elution" umgangen werden [151]. Dabei wurde kurzzeitig ein protisches Lösemittel wie Methanol auf die MIP-Phase injiziert. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Material und Analyt wurden schlagartig gelöst und der Analyt konnte ohne große Peakverbreiterungen chromatographiert werden. Die "Pulsed Elution" konnte bei dieser Form der Säulenschaltung nicht angewendet werden. Stattdessen wurde ein starker Lösemittelgradient angelegt (siehe Anhang), der mit einer Acetonitril/Wasser- Mischung [25/ 75 (v/v)], angesäuert mit 1 % Essigsäure, startete und bei einem Anteil von 75 % Acetonitril endete.

### 3.4.6.3.2. Bestimmung des Prägungseffektes

Auch bei der Säulenschaltung wurde der Prägungseffekt in drei Matrices (Urin, Plasma, Zellkulturmedium) durch Vergleich mit einer Säule mit nicht geprägtem Polymermaterial untersucht. Hierfür wurden die zu untersuchenden Matrices mit 5 unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50, 100, 250, 500 ng/ml) Verapamil und Gallopamil versetzt. Durch Extraktion und Vergleich der Peakflächen bei Verwendung der geprägten und nicht geprägten Vorsäule, konnte der Prägungseffekt ermittelt werden.

**Tab. 11:** Prägungseffekt der Analyten bei RAM-MIP-Säulenschaltung in Abhängigkeit von der Matrix

	Verapamil			Gallopamil		
	MIP/ Kontrolle	RSD %	R <sup>2</sup> Lin.	MIP/ Kontrolle	RSD %	R <sup>2</sup> Lin.
<b>Urin</b>	1.5	10	0.9996	1.8	10	0.9992
<b>Plasma</b>	1.2	25	0.9982	1.1	25	0.9763
<b>Medium</b>	1.1	15	0.9762	1.1	15	0.9643

R<sup>2</sup> Lin.: Korrelationskoeffizient für die Linearität

RSD : relative Standardabweichung (relative standard deviation)

Für die Standardsubstanzen trat für Verapamil und Gallopamil im Urin ein deutlicher Prägungseffekt auf. Offenbar waren auch Matrixeinflüsse für die molekulare Prägung entscheidend, da in Plasma und Zellkulturmedium der Prägungseffekt deutlich geringer war.

Die Linearität und Wiederfindungen waren bei diesen Experimenten nicht von Relevanz, da primär untersucht werden sollte, inwieweit die Metaboliten überhaupt auf einer MIP-Vorsäule isoliert werden konnten. Dennoch wurde die Linearität für die drei Matrices Urin, Plasma und Zellkulturmedium durch Ansetzen der Standards in 5

Konzentrationen (25, 50, 125, 250 und 500 ng/ml) bestimmt. 50 µl der Lösung wurden in das System injiziert.

Da die Linearitäten (außer in Urin) unzureichend waren, wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Auch eine Bestimmung der Nachweisgrenzen war durch hohe Blindwerte des Verapamils nicht sinnvoll.

#### **3.4.6.3.3. Zusammenfassung**

Die automatisierte Säulenschaltung von einer RAM- und einer MIP-Vorsäule war prinzipiell möglich. Allerdings führte die starke Retention der Substanzen auf den MIP zu Peakverbreiterungen und einer verminderten chromatographischen Auflösung. Die Retention auf dem MIP-Material war matrixabhängig, zumindest für Urin wurden sehr gute Linearitäten und Präzisionen erzielt. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit diese Technik für die qualitative Bestimmung der Metaboliten aus biologischen Matrices wie Plasma, Urin und Zellkulturmedium einsetzbar ist.

Der wesentliche Vorteil des Verfahrens war die Selektivität der Analytextraktion bei gleichzeitiger Automation. Biologische Proben konnten so ohne zeitaufwendige Probenvorbereitung wie bei der normalen Säulenschaltung mit RAM-Vorsäulen direkt in das HPLC-MS-System injiziert werden. Die totale Analysenzeit mit integrierter Probenvorbereitung betrug ca. 40 min pro Probe und liegt damit immer noch deutlich niedriger als bei der SPE.

#### **3.4.7. Weiterentwicklung der in-tube SPME für Metabolismusstudien**

Die in-tube SPME wurde schon erfolgreich in der Bioanalytik für die Bestimmung von Arzneistoffen aus biologischen Flüssigkeiten eingesetzt (siehe Kapitel 2.1.2.3). Die Methode wurde schon in Kapitel 2.1.2.3.1 erläutert. Für den Einsatz in der Metabolismusforschung sind aber noch keine Applikationen beschrieben. Im folgenden wird die Methodenentwicklung für eine in-tube SPME-Methode beschrieben.

##### **3.4.7.1. Wahl der Extraktionskapillaren**

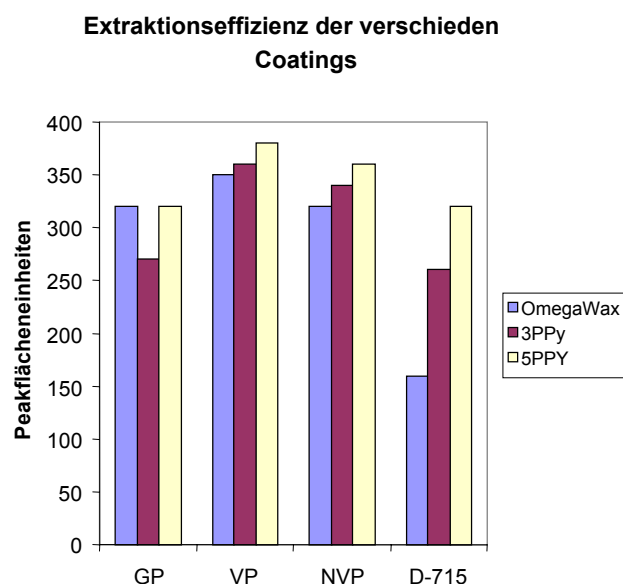
Am Anfang der Methodenentwicklung stand die Auswahl einer geeigneten Extraktionskapillare.

Die Kapillare sollte möglichst viel Analyt aus der Matrix extrahieren, da die Metaboliten meist nur in geringen Konzentrationen in den biologischen Matrices

vorkommen. Für diese Eigenschaften waren die Art und Dicke der Kapillarbeschichtung wichtig. Zu Beginn wurden 3 verschiedene Kapillaren getestet: Eine Omega-Wax-Kapillare, eine dreifach beschichtete und eine fünffach beschichtete Polypyrrolkapillare (PPY).

Zur Überprüfung der Extraktionseffizienz mußten Adsorptionsprofile aufgenommen werden. Je mehr Analyt aus der wässrigen Lösung extrahiert wurde, desto geeigneter war das Material für die Extraktion. Für die Aufnahme dieser Adsorptionsprofile wurde eine wässrige Lösung mit den Standards Verapamil, Norverapamil, Gallopamil und D-715 (siehe Abb. 20) hergestellt (Endkonzentration jeweils 2.5 µg/ml). Extrahiert wurde mit einer Geschwindigkeit von 50 µl/min pro Extraktionszyklus. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

**Abb. 32:** Extraktionseffizienz der verschiedenen Faserbeschichtungen (Coatings)



Die Polypyrrolkapillaren wiesen eine höhere Extraktionseffizienz auf als die Omega-Wax-Kapillaren und waren somit für die Extraktion von Arzneistoffmetaboliten geeigneter.

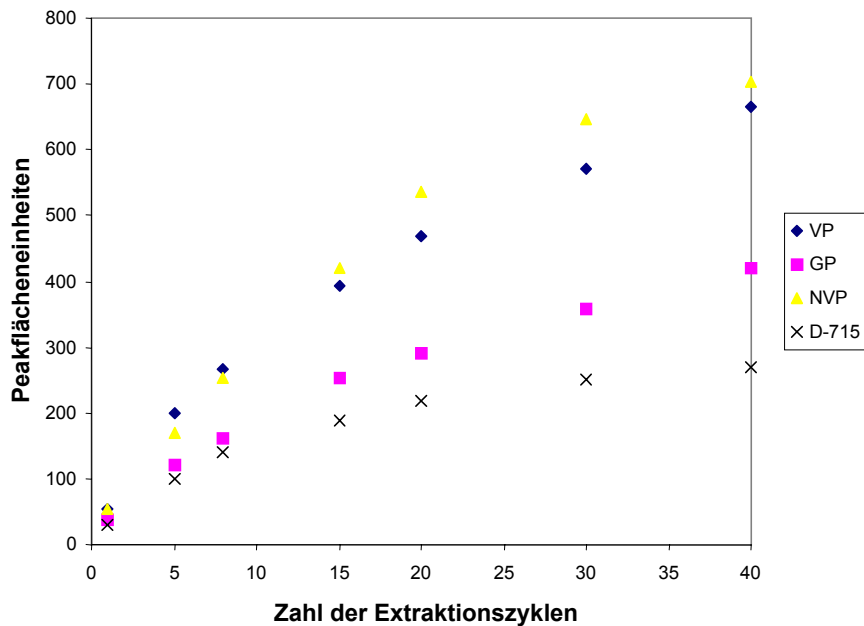
### 3.4.7.2. Bestimmung der Zahl der Extraktionszyklen und Extraktionsgeschwindigkeit

Die Einstellung des Extraktionsgleichgewichtes wurde maßgeblich von der Zahl der Extraktionszyklen und der Extraktionsgeschwindigkeit beeinflusst (siehe Kapitel 2.1.2.3.1). Durch eine höhere Zahl von Extraktionszyklen und eine höhere Extraktionsgeschwindigkeit wurde die Ausbeute an extrahiertem Analyt höher, allerdings dauerte die Einstellung des Gleichgewichtes länger als bei Wahl einer

niedrigeren Extraktionsgeschwindigkeit.

In Abb. 33 ist die Abhängigkeit der Extraktionseffizienz der vier Referenzsubstanzen von der Zahl der Extraktionszyklen bei neutralem pH-Wert (pH = 7) dargestellt.

**Abb. 33:** Abhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung von der Zahl der Extraktionszyklen



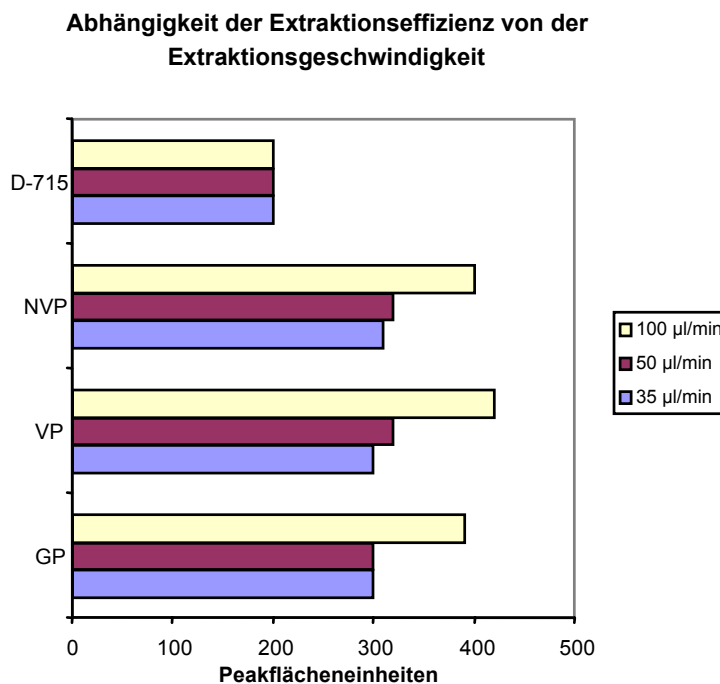
mit VP: Verapamil  
GP: Gallopamil  
NVP: Norverapamil

Nach 40 Extraktionszyklen wurde für die untersuchten Substanzen der Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht. Weil bei der SPME-Technik nur ein kleiner Teil der Analyten aus der Lösung extrahiert wird und die Metaboliten meist nur in geringen Konzentrationen gebildet wurden, war für eine möglichst große Meßempfindlichkeit eine Annäherung an den Gleichgewichtszustand durch eine möglichst große Zahl von Extraktionszyklen notwendig. Da bei dem verwendeten Gerät nicht mehr als vierzig Extraktionszyklen programmiert werden konnten, wurden alle Proben mit dieser Anzahl an Zyklen extrahiert, um ein Maximum an Empfindlichkeit zu erzielen.

Die Einstellung des Gleichgewichtes wurde auch maßgeblich durch die Extraktionsgeschwindigkeit beeinflusst. Je höher die Geschwindigkeit war, desto länger dauerte die Einstellung des Gleichgewichtes. Allerdings konnten durch eine Erhöhung der Geschwindigkeit unter Umständen mehr Analyten extrahiert werden. Bei zu hohen Extraktionsgeschwindigkeiten kann der Analyt aufgrund verminderter Wechsel-

wirkungen mit der Kapillarbeschichtung nicht mehr in ausreichendem Maße extrahiert werden. Übliche Extraktionsgeschwindigkeiten liegen zwischen 50 und 150  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Abhängigkeit von der Extraktionsgeschwindigkeit wurde für eine dreifachbeschichtete Polypyrrolkapillare für drei Geschwindigkeiten bestimmt: 35  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Eine wässrige Standardlösung (4 Standards: Verapamil (VP), Gallopamil (GP), Norverapamil (NVP), und D-715 ) wurde extrahiert.

**Abb. 34:** Abhängigkeit zwischen Extraktionseffizienz und Extraktionsgeschwindigkeit

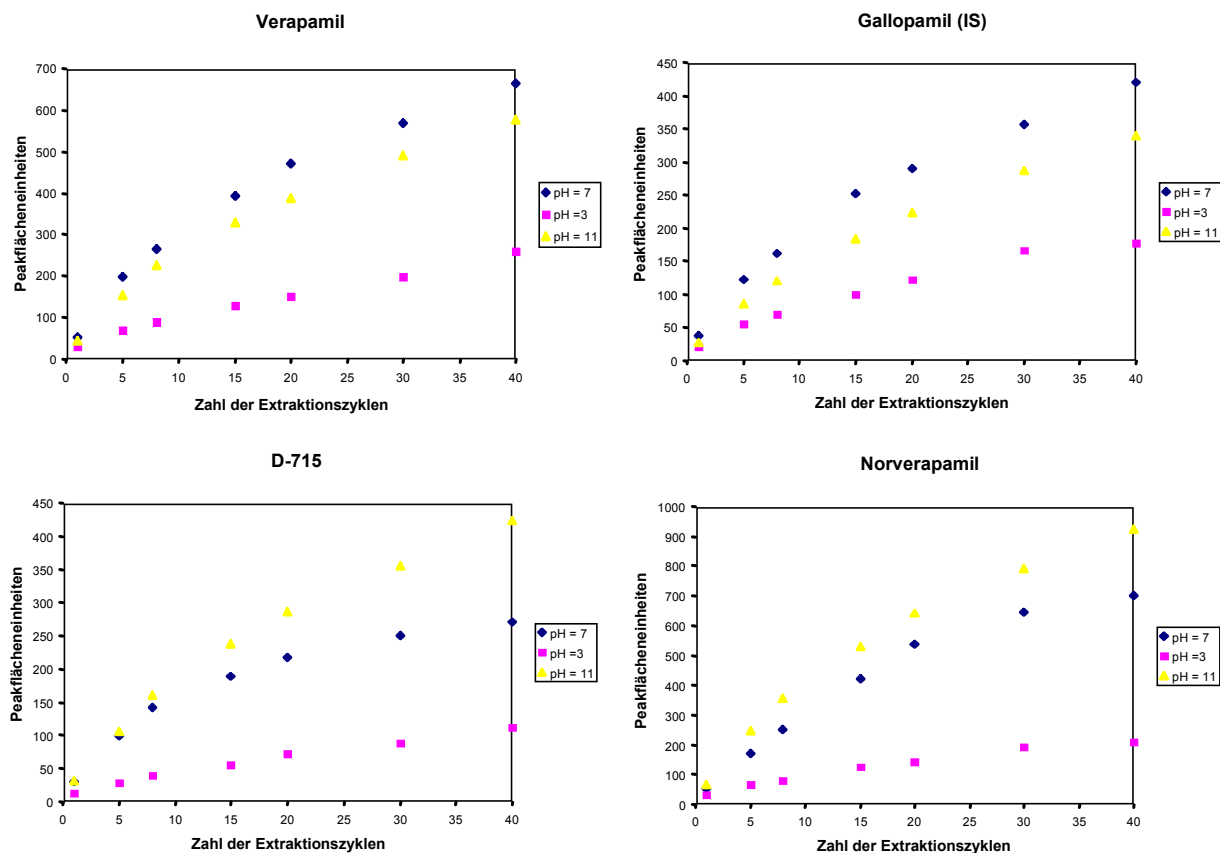


Bei einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurde die größte Analytmenge extrahiert, weshalb sie für die Extraktion der biologischen Proben gewählt wurde.

### 3.4.7.3. pH-Abhängigkeit der Extraktion

Die Extraktionseffizienz hing in wässriger Lösung unter anderem auch vom pH-Wert ab. Gerade die Adsorptionswechselwirkungen (Säure-Base-,  $\pi$ - $\pi$ -, Dipol-Dipol-, Wasserstoffbrückenbindungen-, Ionenaustausch- und hydrophobe Wechselwirkungen) zwischen der Polypyrrolbeschichtung und stickstoffhaltigen Analyten, wie dem Verapamil und seinen Metaboliten, wurden durch den pH-Wert der Lösung bestimmt. Es wurde für die vier Referenzsubstanzen die pH-Abhängigkeit im sauren (pH = 3), im neutralen (pH = 7) und im basischen Mileu (pH = 11) untersucht, die in Abb. 35 dargestellt ist.

**Abb. 35:** pH-Abhängigkeit der Extraktion



Wie man Abb. 35 entnehmen kann, stieg für die Metaboliten D-715 und Norverapamil die Extraktionseffizienz bei basischem pH-Wert an, während für Verapamil und Gallopamil eine Extraktion bei neutralem pH-Wert am optimalsten war.

Bei Betrachtung des Säure-Base-Gleichgewichtes der Analyten ließ sich dies verstehen: Weil bei niedrigem pH-Wert die Pyrrolbeschichtung (schwache Säure) in oxidierter Form und die Analyten in protonierter Form vorlagen, führten elektrostatische Abstoßungen zu verminderter Extraktionseffizienz. Bei höherem pH-Wert wurde der Anteil der protonierten Analyten reduziert und der Anteil der Analyten, die als freie Base vorlagen, stieg. Nun konnten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und den Molekülen der Kapillarbeschichtung stattfinden, was sich in einer gesteigerten Extraktionseffizienz äußerte.

Die  $pK_s$ -Werte für Verapamil und Gallopamil lagen bei 9, die von Norverapamil und D-715 bei 10 (siehe Tab. 12).

Bei einem höheren pH-Wert von 11 ließen sich deshalb die Metaboliten D-715 und Norverapamil am besten extrahieren, da sie dann vollkommen in der deprotonierten Form vorlagen. Da bei den Metabolismusstudien gerade für die Metaboliten ein

Höchstmaß an Extraktionseffizienz erzielt werden sollte, wurden alle Extraktionen bei einem pH-Wert von 11 durchgeführt.

**Tab. 12:** pKs-Werte von Gallopamil, Verapamil und seiner Hauptmetaboliten

Verbindung	pKs <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	pKs <sub>2</sub> <sup>1)</sup>
Verapamil	9.04	-
Norverapamil	9.87	-
Gallopamil	9.01	-
D-617	10.35	-
D-620	9.84	-
D-702	10.32	9.80
D-703	9.15	9.01
D-715	9.88	9.09
D-717	10.35	9.09

<sup>1)</sup> pK<sub>s</sub>-Werte entnommen aus: <http://www.acdlabs.com>

#### 3.4.7.4. Desorption und Analyttransfer

Wie in Abbildung 7 (Kapitel 2) dargestellt, wurde nach erfolgter Anreicherung der Analyten auf der Polymerschicht der Kapillaren das Schaltventil umgelegt und die Analyten von der mobilen Phase auf die analytische Säule transferiert. Der Anteil des organischen Lösemittels in der mobilen Phase mußte so hoch sein, daß die Analyten möglichst vollständig von der Phase desorbiert wurden, um Verschleppungen bei späteren Extraktionen zu vermeiden.

Für die Desorption der Analyten waren die Zusammensetzung und der Fluß der mobilen Phase entscheidend. Die bislang verwendete mobile Phase, die sich aus einer Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6) und Acetonitril in einem Verhältnis von 1:1 (v:v) zusammensetzte, desorbierte die Analyten selektiv von der PPY-Phase, so daß auf eine weitere Optimierung der Desorptionsbedingungen verzichtet wurde.

#### 3.4.7.5. Wahl der experimentellen Bedingungen

Um Peakverbreiterungen auf der analytischen Säule zu vermeiden, wurde eine kürzere RP8 Select B-Säule (125 x 4 mm, 5 µm) verwendet. Als mobile Phase wurden Ammoniumacetatlösung (0.01 M, pH = 6) und Acetonitril [50/50 (v/v)] bei einem Fluß von 0.6 ml pro Minute eingesetzt.

Für die Extraktion wurde eine dreifach beschichtete PPY-Kapillare (60 cm Länge, 0.2 mm I. D.) verwendet. Die Extraktion wurde mit 40 Extraktionszyklen bei einer Geschwindigkeit von 100 µl/min und einem pH-Wert von 11 durchgeführt.

Die Wiederfindungen wurden mit einer HPLC mit UV-Detektion (230 nm) für 5



Konzentrationen (100, 200, 300, 600, 800 ng/ml) bei einem pH-Wert von 11 mit 40 Extraktionszyklen bestimmt. Zum Vergleich wurde eine Standardlösung der 4 Referenzsubstanzen (125 ng/ml) direkt injiziert (n = 3). In Tab. 13 sind die mittleren Wiederfindungen mit Standardabweichungen, sowie die Linearität und Nachweisgrenzen angegeben. Zur Bestimmung der Präzision wurde eine Standardlösung von Verapamil, Gallopamil, Norverapamil und D-715 (Konzentration je 2.5 µg/ml) fünfmal injiziert. Die Präzision für diese Messungen lag unter 12 %.

**Tab. 13:** Wiederfindungen, Linearität und Nachweisgrenzen der vier Referenzsubstanzen bei der in-tube SPME

Matrix	Verapamil			Gallopamil			Norverapamil			D-715		
	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG	Wdf.	R <sup>2</sup> Lin.	NWG
Urin	(4,5 ± 2)%	0.9991	52	(3,7 ± 0,2)%	0,9992	53	(3,7±0,3)%	0,9990	65	(3,2 ± 0,6)%	0,9990	82
Plasma	(3,3 ± 0,2)%	0,9982	72	(3,3 ± 0,4)%	0,9991	69	(3,7± 0,3)%	0,9978	83	(6,5 ± 0,5)%	0,9892	92
Zellkultur-medium	(4,0 ± 0,3)%	0,9896	71	(4,1 ± 0,3)%	0,9924	68	(4,0 ± 0,5)%	0,9868	79	(3,2 ± 0,3)%	0,9872	101

Wdf: Wiederfindungen

NWG: Nachweisgrenzen

R<sup>2</sup> Lin. : Korrelationskoeffizient als Maß für die Linearität

Da die SPME keine erschöpfende Extraktionstechnik ist, sondern die Extraktion auf der Einstellung eines Gleichgewichtes beruht, waren die Wiederfindungen vergleichsweise gering.

Die gesamte Methodenentwicklung wurde auf einer Agilent-HPLC-Anlage vorgenommen. Für die späteren Applikationen stoppte man den HPLC-Lauf nach Injektion auf die analytische Säule und koppelte anschließend die Säule mit dem HPLC-MS-System. Dieser Schritt war notwendig, da die Steuerungssoftware des HPLC-MS-Systems für eine automatische Durchführung der in-tube SPME nicht programmiert werden konnte.

#### 3.4.7.6. Zusammenfassung der Methodenentwicklung für die in-tube SPME

Es konnte eine Methode für die Bestimmung von Gallopamil, Verapamil und zwei seinen Metaboliten entwickelt werden. Die Linearität und Präzision der Methode waren gut. Ein Nachteil der Methode war die geringere Empfindlichkeit aufgrund nicht erschöpfender Extraktion. Es muß sich zeigen, ob die Empfindlichkeit für die Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus biologischen Proben ausreicht. Für die spätere Bestimmung wurde das System deshalb mit einem

MS-System für eine bessere Meßempfindlichkeit gekoppelt. Ein Vorteil des Verfahrens war seine Automatisierbarkeit. Durch Integration der HPLC in die Probenvorbereitung konnte die Gesamtanalysenzeit auf 40 min verkürzt werden, sofern die Proteine aus den Proben durch Fällung vorher abgetrennt wurden.

#### **3.4.8. Zusammenfassung des Kapitel 3**

Für die Anreicherung und Strukturaufklärung von Metaboliten stellte die Kombination der SPE mit der HPLC-MS die leistungsfähigste Methode dar. Sie wurde daher für die Isolation und Strukturaufklärung der meisten Metaboliten eingesetzt, speziell bei der Untersuchung des Metabolismus im Herz-und Gefäßsystem.

Für die Messung der Organextrakte wurde die MSPD angewandt, obwohl sie eine sehr zeitaufwendige Probenvorbereitung erfordert. Es gibt aber kaum effektivere Alternativverfahren.

Die Säulenschaltung mit der RAM-Vorsäule war eine effektive Methode für die Bestimmung von Pharmakokinetiken aus Plasma oder Zellkulturüberständen.

Die bislang ermittelten Daten aus den MIP-Techniken und der in-tube SPME sind vielversprechend. Inwieweit die Verfahren aber zur Isolation von Arzneistoff-metaboliten aus biologischen Matrices anwendbar sind, muß anhand einer Applikation gezeigt werden.

## 4. Ergebnisse

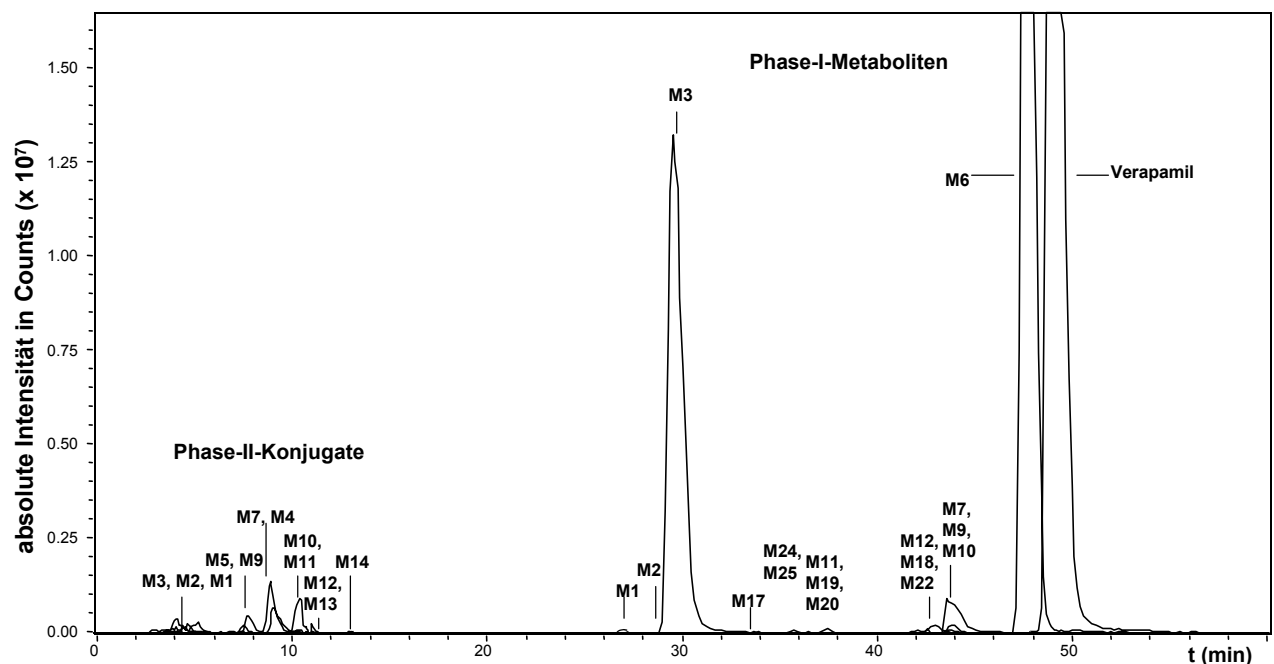
### 4.1. Strukturaufklärung der Metaboliten

#### 4.1.1. Strukturaufklärung der Metaboliten mit HPLC-MS<sup>n</sup>

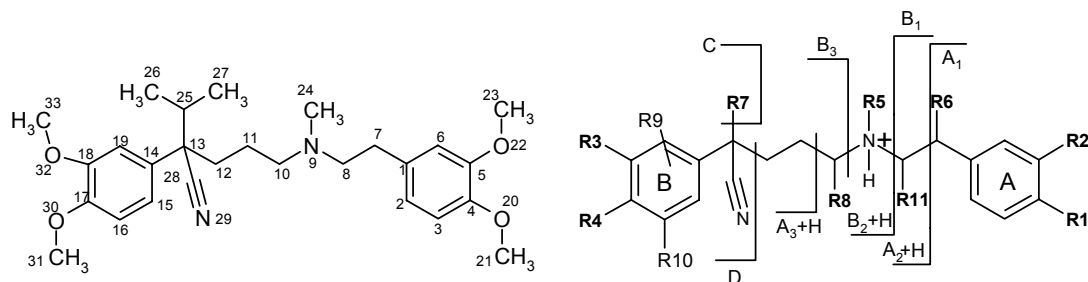
Zu Beginn der Metabolismusstudien sollten möglichst viele Metaboliten mit Hilfe der HPLC-MS<sup>n</sup> identifiziert werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Strukturaufklärung von neuen bis heute unbekannten Metaboliten. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erzielen, wurden die Metaboliten aus humanem Urin und Zellkulturüberständen aus kultivierten Rattenhepatozyten mit Hilfe der SPE aufkonzentriert und anschließend identifiziert. Ein Ionenchromatogramm nach der chromatographischen Trennung von Verapamil und seinen Metaboliten aus einem Pool aus 30 ml Zellkulturüberständen aus Rattenhepatozyten ist in Abb. 36 dargestellt. Auf die Bildung der Metaboliten in den unterschiedlichen Matrices wird eingehend in Kapitel 4.2 eingegangen.

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten wurde ihr Fragmentierungsmuster mit dem des Verapamils verglichen. Zusätzlich wurden Inkubationen mit D<sub>6</sub>-Verapamil durchgeführt und in Einzelfällen für die Strukturaufklärung herangezogen. Die Ergebnisse der Strukturaufklärung sind in Tab. 14 dargestellt. Dabei wurden die Metabolitenstrukturen unter Vorbehalt vorgeschlagen.

**Abb. 36:** Ionenchromatogramm von Verapamil und seinen Metaboliten aus Rattenhepatozyten



Tab. 14: Hauptfragmentierungen von Verapamil und seinen Metaboliten



Nr.	Phase I	Substituenten											Phase I	Phase II	$\alpha$ -Spaltung			N-C-Spaltung			C	D <sup>9)</sup>	weitere Ionen
	R <sub>t</sub>	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	[M+H] <sup>+</sup> oder m/z	[M+H] <sup>+</sup>	A <sub>1</sub> <sup>4)</sup>	A <sub>2</sub> +H	A <sub>3</sub> <sup>4)</sup> +H	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> +H	B <sub>3</sub> <sup>4)</sup>			
M1 <sup>3)</sup>	25.6	-	-	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	277	453	-	-	-	-	-	260	234	-	218
M2 <sup>3)</sup>	28.6	-	-	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	277	453	-	-	-	-	-	246	234	-	-
M3 <sup>3)</sup>	30.0	-	-	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	291	453	-	-	-	-	-	260	248	-	435 (-H <sub>2</sub> O), 417 (-2H <sub>2</sub> O), 369, 333
M4 <sup>2)</sup>	42.0	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	427	603	-	-	-	151	277	260	384	-	-
M5 <sup>5)</sup>	42.9	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	427	603	151	275	-	165	-	-	384	-	133, 150, 206, 233
M6 <sup>5)</sup>	47.1	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	441	617	151	289	246	165	-	-	398	-	-
M7 <sup>2)</sup>	43.2	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	441	617	-	303	-	151	291	260	248	-	-
M8 <sup>1)</sup>	42.8	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	457	633	-	289	-	181	277	260	414	-	235, 439 (-H <sub>2</sub> O)
M9 <sup>2)</sup>	44.0	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	441	617	151	289	-	165	-	-	246	-	133, 372
M10 <sup>1,5)</sup>	45.0	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	441	617	-	303	-	151	291	260	248	-	187, 373
M11	38.7	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	427	603	-	289	-	151	277	246	384	220	234, 315, 350
M12 <sup>1)</sup>	39.0	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	471	647	-	-	-	181	291	260	248	-	453 (-H <sub>2</sub> O)
M13 <sup>2)</sup>	34.3	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OH	H	H	H	H	471	647	150	319	261	165	-	-	413	-	453 (-H <sub>2</sub> O)
M14 <sup>2)</sup>	49.8	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	455	631	150	303	-	165	-	-	-	-	133, 216, 238, 262, 387
M15 <sup>3)</sup>	21.9	-	-	OCH <sub>3</sub>	OH	H	-	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	263	-	-	-	-	-	-	246	221	203	128, 198, 229
M16	28.1	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH	H	H	H	457	-	150	305	247	165	-	276	-	220	135, 206, 439 (-H <sub>2</sub> O)

	Phase I	Substituenten											Phase I	Phase II	α-Spaltung			N-C-Spaltung					
<b>M17</b>	31.9	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	OH	H	471	-	150	319	-	165	-	276	-	-	191, 249, 440 (-OCH <sub>3</sub> )
<b>M18</b>	41.5	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OH	H	H	H	H	457	-	150	-	-	165	-	247	398	220	194, 284, 303, 383, 398, 439 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M19</b> <sup>1)</sup>	35.4	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	OH	H	457	-	151	307	-	165	-	276	-	-	135, 206, 305, 384, 440 (-OH)
<b>M20</b> <sup>1)</sup>	36.7	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	OH	H	471	-	-	319	-	165	-	276	-	234	138, 206, 219, 248, 258 (276-H <sub>2</sub> O), 259 (276-OH)
<b>M21</b> <sup>2)</sup>	39.3	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	471	-	-	303	-	181	291	260	248	-	453 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M22</b> <sup>2)</sup>	42.0	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	471	-	-	-	-	165	-	260	-	-	453 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M23</b> <sup>2)</sup>	<sup>6)</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CHO	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	H	H	H	469	-	-	-	-	165	-	-	-	-	196, 233, 441 (-CO)
<b>M24</b>	36.1	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	413	-	150	261	-	165	-	-	-	-	135, 191, 221, 367, 377, 395 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M25</b> <sup>1)</sup>	37.4	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	H	H	H	413	-	-	277	-	151	263	246	370	-	119, 206, 220, 234, 395 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M26</b> <sup>1,5)</sup>	<sup>6)</sup>	OCH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	-	-	H	471	-	-	-	-	-	291	260	248	-	151, 171, 339, 398, 427 (-CO <sub>2</sub> ), 453 (-H <sub>2</sub> O), 454 (-OH)
<b>M27</b> <sup>5)</sup>	<sup>6)</sup>	OCHO	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	-	-	H	469	-	-	-	-	-	291	260	248	-	151, 177, 196, 277, 371, 396, 423
<b>M28</b>	39.3	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	413	-	-	-	-	-	277	260	234	-	235
<b>M29</b> <sup>1)</sup>	41.4	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	457	633	-	-	-	167	291	261	-	-	203, 234, 277, 439 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M30</b>	41.9	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	OH	H	457	633	-	-	-	-	-	262	-	-	192, 216, 234, 439 (-H <sub>2</sub> O), 615 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M31</b> <sup>1)</sup>	40.3	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	OH	457	633	-	306	-	181	277	260	414	-	149, 166, 235, 289, 341, 439 (-H <sub>2</sub> O)
<b>M32</b>	42.1	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	H	H	457	633	-	-	-	181	277	260	-	-	319, 439 (-H <sub>2</sub> O)

<sup>1)</sup> Position der Hydroxygruppe konnte nicht eindeutig identifiziert werden.

<sup>2)</sup> Strukturen wurden durch Inkubation von Rattenhepatozyten mit D<sub>6</sub>-Verapamil bestätigt (ca. 30 ml).

<sup>3)</sup> Phenylalkylhälfte wurde oxidativ dealkyliert.

<sup>4)</sup> Spaltung wird von Ladungstransfer begleitet

<sup>5)</sup> Metabolit wurde aus Zellkulturüberständen von kultivierten Rattenkardiomyozyten nachgewiesen.

<sup>6)</sup> Metaboliten wurden unter anderen chromatographischen Bedingungen detektiert

#### 4.1.1.1. Diskussion der MS-Spektren

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten wurde ihr Fragmentierungsmuster mit dem des Verapamils verglichen (Tab. 14). Wenn die Metaboliten sowohl in der konjugierten Form als auch in der unkonjugierten Form vorlagen, wird nur die Fragmentierung des Konjugats diskutiert. Die Fragmentierung des protonierten unkonjugierten Metaboliten ist im Fall von Glucuroniden mit der Fragmentierung des Ions mit  $[M+H-176]^+$  identisch.

Metabolit **M1** (D-620-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 453$  (2 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) sehr intensiv auf. Der Verlust von 176 amu (Glucuronsäure- $H_2O$ ) im  $MS^2$ -Spektrum führt zu  $m/z = 277$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin.

Das mit hoher Intensität gebildete Ion mit  $m/z = 277$  weist auf eine oxidative Abspaltung der niedersubstituierten Phenylalkylhälfte mit zusätzlicher Demethylierung im Molekül hin (178 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils). Eine weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 277$  im  $MS^3$ -Modus führt zu den Fragmentionen mit  $m/z = 234$  (Abspaltung der Isopropylgruppe) und  $m/z = 260$  (Abspaltung von Ammoniak), was beweist, daß eine zusätzliche N-Demethylierung im Molekül stattgefunden hat (Tab. 14). Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M2**:

Im Full-Scan-MS tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 453$  (2 amu niedriger als die Mutterverbindung) sehr intensiv auf, der Verlust von 176 amu (Glucuronsäure- $H_2O$ ) im  $MS^2$ -Spektrum führt zu  $m/z = 277$  (178 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin.

Das mit hoher Intensität gebildete Ion mit  $m/z = 277$  weist auf eine oxidative Abspaltung der niedersubstituierten Phenylalkylhälfte mit zusätzlicher Demethylierung im Molekül hin. Eine weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 277$  im  $MS^3$ -Modus führt zu den Fragmentionen mit  $m/z = 234$  (gebildet durch Abspaltung der Isopropylgruppe) und  $m/z = 246$  (Tab. 14). Das Ion mit  $m/z = 246$  (gebildet durch Abspaltung von Methylamin) wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte gebildet und beweist, daß die Demethylierung nur an den an C-17 und C-18 (Ring B) gebundenen

Methoxygruppen stattgefunden haben kann. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M3** (D 617-Glucosid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 453$  (2 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) sehr intensiv auf, der Verlust von 162 amu (Glucose-H<sub>2</sub>O) im MS<sup>2</sup>-Spektrum führt zu  $m/z = 291$  und weist auf die Bildung eines Glucosids hin. Die Abspaltung von H<sub>2</sub>O aus dem Glucosid führt zu den Ionen mit  $m/z = 435$  und  $m/z = 417$ .

Das mit hoher Intensität gebildete Ion mit  $m/z = 291$  (164 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) weist auf eine oxidative Abspaltung der niedersubstituierten Phenylalkylhälfte im Molekül hin. Eine weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 291$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Fragmentationen mit  $m/z = 248$  (Abspaltung der Isopropylgruppe) und  $m/z = 260$ . Das Ion mit  $m/z = 260$  (Abspaltung von Methylamin) wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte gebildet. Da keine Methoxygruppe demethyliert wurde, kann die Konjugation mit Glucose nur am Stickstoff stattgefunden haben. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M4**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 603$  sehr intensiv auf, der Verlust von 176 amu (Glucuronsäure-H<sub>2</sub>O) im MS<sup>2</sup>-Spektrum führt zu  $m/z = 427$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 427$  (28 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) deutet auf eine oxidative doppelte Dealkylierung von zwei Methylgruppen hin. Durch Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus werden die Ionen mit  $m/z = 151$ ,  $m/z = 260$ ,  $m/z = 277$  und  $m/z = 384$  (Tab. 14) gebildet, die auf eine Demethylierung einer Methoxygruppe an Position C-4 oder C-5 (Ring A) hinweisen. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 277$  (mit Protonentransfer) und  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer). Das Ion mit  $m/z = 260$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) unterstützt eine oxidative Demethylierung der Methoxygruppen an C-4 oder C-5 (Ring A) und indiziert eine zusätzliche Demethylierung am Stickstoff. Abspaltung der Isopropylgruppe

vom Molekülion führt zu  $m/z = 384$ , was die Struktur bestätigt. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M5** (D-715-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 603$  sehr intensiv auf. Der Verlust von 176 amu (Glucuronsäure- $H_2O$ ) im  $MS^2$ -Spektrum führt zu  $m/z = 427$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 427$  (28 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) weist auf eine oxidative doppelte Dealkylierung von zwei Methylgruppen hin. Durch Fragmentierung im  $MS^3$ -Modus werden die Ionen mit  $m/z = 151$ ,  $m/z = 165$ ,  $m/z = 275$  und  $m/z = 384$  (Tab. 14) gebildet. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff führt zu den Ionen mit  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer) und mit  $m/z = 275$  (mit Protonentransfer), die auf eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an Position C-17 oder C-18 (Ring B) und eine N-Demethylierung deuten. Das Ion mit  $m/z = 165$  wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte gebildet und unterstützt eine Demethylierung einer Methoxygruppe am Ring B und eine N-Demethylierung. Der Verlust der Isopropylgruppe führt zum Ion mit  $m/z = 384$ . Der Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. Abb. 63.

Metabolit **M6** (Norverapamil-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 617$  sehr intensiv auf. Die Abspaltung von 176 amu im  $MS^2$ -Modus führt zu  $m/z = 441$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 441$  (14 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) indiziert eine oxidative Dealkylierung einer Methylgruppe. Fragmentierung im  $MS^3$ -Modus führt zu einem intensiven Peak des Ions mit  $m/z = 165$  und zu weiteren Ionen mit  $m/z = 151$ , 246, 289 und 398 (Tab. 14), die auf eine oxidative N-Demethylierung hinweisen. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 165$ . C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff führt zu den Ionen mit  $m/z = 289$  (mit Protonentransfer) und  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer). C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff (mit Protonen- und Ladungstransfer) führt zum Ion mit  $m/z = 246$ . Durch Verlust der Isopropylgruppe wird das Ion mit  $m/z = 398$  gebildet. Die Fragmentierungen des Aglykons wurden durch



Vergleich mit einer synthetischen Referenzverbindung bestätigt. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M7** (D-702-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 617$  sehr intensiv auf. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu  $m/z = 441$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 441$  (14 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) indiziert eine oxidative Dealkylierung einer Methylgruppe. Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu intensiven Peaks der Ionen mit  $m/z = 151$ , 291 und 303 (Tab. 14), die auf eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an Position C-4 oder C-5 (Ring A) hinweisen. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 291$  (mit Protonentransfer) und  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer). Die Ionen mit  $m/z = 260$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) und  $m/z = 303$  (gebildet durch C-C-Spaltung mit Protonentransfer auf der niedersubstituierten Seite) unterstützen eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an C-4 oder C-5 (Ring A). Das Fragmention mit  $m/z = 248$  (Abspaltung der Isopropylgruppe von  $m/z = 291$ ) ist im Einklang mit einer oxidativen Demethylierung einer Methoxygruppe an C-4 oder C-5. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

Metabolit **M8**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 633$  (179 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 457$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 181$ , 260, 277, 289, 414 und 439 (Tab. 14). Eine Wasserabspaltung vom Ion mit  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zum Ion mit  $m/z = 439$  und weist auf eine Hydroxylierung im Molekül hin. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 181$  (mit Ladungstransfer) und  $m/z = 277$  (mit Protonentransfer), die eine Hydroxylierung des Phenylalkylrestes und eine Demethylierung am Stickstoff indizieren. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff mit Protonentransfer führt zum Ion

mit  $m/z = 289$ . Der Verlust der Isopropylgruppe führt zum Ion mit  $m/z = 414$ . Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 277$  im  $MS^4$ -Modus (Tab. 14) führt zu den Ionen mit  $m/z = 260$  (Abspaltung von Ammoniak) und  $m/z = 234$  (Abspaltung der Isopropylgruppe), die im Einklang mit der N-Demethylierung sind. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M9** (D-703-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 617$  (162 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im  $MS^2$ -Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 441$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 441$  (14 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) deutet auf eine oxidative Dealkylierung einer Methylgruppe hin. Durch Fragmentierung im  $MS^3$ -Modus werden die Ionen mit  $m/z = 165$  (N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Seite) und  $m/z = 289$  (C-C-Spaltung mit Protonentransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff) sowie  $m/z = 151$  (C-C-Spaltung mit Ladungstransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff) gebildet, die auf eine Demethylierung am Stickstoff oder an einer der Methoxygruppen in Position C-17 oder C-18 (Ring B) hinweisen (Tab. 14). Die Abspaltung der Isopropylgruppe vom Ion mit  $m/z = 289$  führt zum Ion mit  $m/z = 246$ , was im Einklang mit einer Demethylierung einer Methoxygruppe in Position C-17 oder C-18 (Ring B) ist. Die Struktur des Aglykons wurde durch Vergleich der Fragmentierungen mit einer synthetischen Referenzverbindung bestätigt. Der Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M10**:

Der Metabolit M10 zeigt die gleichen Ionen im Full-Scan-MS-Spektrum wie der Metabolit M7 (Tab. 14). Weil sich die Massenspektren nur in der Intensität der Ionen mit  $m/z = 291$  und  $m/z = 303$  unterscheiden, wird eine alternative Demethylierung einer Methoxygruppe an Position C-17 oder C-18 vorgeschlagen. Der Metabolit erscheint auch in der unkonjugierten Form. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M11**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 603$  (148 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 427$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Ion mit  $m/z = 427$  (28 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) deutet auf die oxidative Demethylierung von zwei Methylgruppen. Weitere Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Fragmentationen mit  $m/z = 151, 246, 277, 289$  und 384 (Tab. 14). N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 151$  (begleitet von Ladungstransfer) und  $m/z = 277$  (begleitet von Protonentransfer) und indiziert eine Demethylierung einer Methoxygruppe am Ring A. Die Ionen mit  $m/z = 289$  (gebildet durch C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Seite mit Protonentransfer) und  $m/z = 246$  (gebildet durch die Abspaltung der Isopropylgruppe) sind im Einklang mit einer Demethylierung einer Methoxygruppe am Ring A. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M12**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 647$  (192 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 471$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Fragmention mit  $m/z = 471$  (16 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) weist auf eine Hydroxylierung des Verapamils hin. Durch weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 471$  im MS<sup>3</sup>-Modus werden die Ionen  $m/z = 181, 248, 260, 291$  und 453 gebildet (Tab. 14). Eine Wasserabspaltung führt zum Ion mit  $m/z = 453$  und bestätigt, daß eine Hydroxylierung stattgefunden hat. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 291$  (mit Protonentransfer) und  $m/z = 181$  (mit Ladungstransfer), was eine Hydroxylierung der Phenylalkylhälfte indiziert. Die Ionen mit  $m/z = 260$  (gebildet durch N-C Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) und mit  $m/z = 248$  (gebildet durch Abspaltung der Isopropylgruppe vom Ion mit  $m/z = 291$ ) sind im Einklang mit einer Hydroxylierung des Phenylalkylaminrestes. Folglich kann die Hydroxylierung an C-2, C-3, C-6 oder C-7 stattgefunden haben. Da die Metaboliten M9 und M10 keine Wasserabspaltung zeigen, obwohl sie am aromatischen Ring hydroxyliert sind, wird für M12 eine

Hydroxylierung in Position C-7 vorgeschlagen. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M13**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 647$  (192 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion auf  $m/z = 471$  weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Das Fragmention mit  $m/z = 471$  (16 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) deutet auf eine Hydroxylierung des Verapamils hin. Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 471$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 165$ , 319 und 413 (Tab. 14). Die beobachtete Wasserabspaltung von  $m/z = 471$  unter Bildung von  $m/z = 453$  unterstützt eine Hydroxylierung im Molekül. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff führt zu einem intensiven Peak bei  $m/z = 319$  (mit Protonentransfer) und bei  $m/z = 150$  (mit Ladungs- und Protonentransfer) und indiziert eine Hydroxylierung der höhersubstituierten Hälfte. Das Ion mit  $m/z = 165$  wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte gebildet und bestätigt, daß die Hydroxylierung in der höhersubstituierten Hälfte stattgefunden haben muß. Das Ion mit  $m/z = 413$  beweist, daß die Hydroxylierung an der Isopropylgruppe erfolgt sein muß, weil es einer Abspaltung von  $C_3H_6OH$  entspricht. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M14** (Verapamil-Glucuronid):

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 631$  (176 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 455$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Eine weitere Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 165$  (N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Seite) und  $m/z = 303$  (C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff mit Protonentransfer), die mit den Fragmentionen des Verapamils übereinstimmen und beweisen, daß Verapamil am Stickstoff glucuronidiert wurde (Tab. 14). C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff (mit Protonen- und Ladungstransfer) führt zum Ion mit

$m/z = 150$ . Verapamil wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M15**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 263$  (192 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine oxidative Dealkylierung der Phenylalkylhälfte mit zwei zusätzlichen Demethylierungen deutet. Eine Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 246$ , 221 und 203 (Tab. 14). Die Abspaltung von Ammoniak führt zum Ion mit  $m/z = 246$  und beweist, daß eine N-Demethylierung stattgefunden haben muß. Das Ion mit  $m/z = 203$  (gebildet durch C-C-Spaltung zwischen dem quartären Kohlenstoff C-13 und C-12 mit Protonentransfer) und das Ion mit  $m/z = 221$  (gebildet durch Abspaltung von Propen aus der Isopropylgruppe) untermauern eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an C-17 oder C-18. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M16**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 457$  (2 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 150$ , 165, 247, 276, 305 und 439 (Tab. 14). Wasserabspaltung führt zum Ion mit  $m/z = 439$  und weist auf eine Hydroxylierung im Molekül hin. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 165$  und schließt eine Demethylierung am Ring A aus. Die Ionen mit  $m/z = 276$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) und mit  $m/z = 305$  (gebildet durch C-C-Spaltung mit Protonentransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Seite) weisen auf eine Hydroxylierung der höhersubstituierten Hälfte und auf eine N-Demethylierung hin. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff mit Protonen- und Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 247$  und schließt eine Hydroxylierung der höhersubstituierten Hälfte aus. Folglich kann die Hydroxylierung nur an C-10 stattgefunden haben. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M17**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 471$  (16 amu höher

als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Fragmentionen mit m/z = 165, 249, 276, 319 und 440. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit m/z = 165 und schließt eine Demethylierung am Ring A aus. Die Fragmentionen mit m/z = 276 (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) und mit m/z = 319 (gebildet durch C-C-Spaltung mit Protonentransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Seite) weisen auf eine Hydroxylierung der höhersubstituierten Hälfte hin. C-C-Spaltung zwischen C-11 und C-12 mit Protonentransfer führt zum Ion mit m/z = 249. Folglich kann die Hydroxylierung nur an Ring B, C-12 oder der Isopropylgruppe stattgefunden haben. Die Abspaltung von 17 amu deutet auf die Abspaltung einer Hydroxygruppe hin. Da für die in der Alkylseitenkette hydroxylierten Metaboliten M8, M12, M13, M16 und M22 eine Wasserabspaltung beobachtet wurde, ist eine Hydroxylierung des aromatischen Rings B wahrscheinlich. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63 .

#### Metabolit **M18**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 457$  (2 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Demethylierung und Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit m/z = 150, 165, 220, 247, 398 und 439 (Tab. 14). Wasserabspaltung führt zum Ion mit m/z = 439 und indiziert, daß eine Hydroxylierung im Molekül stattgefunden hat. Die Ionen mit m/z = 165 (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer) und mit m/z = 150 (C-C-Spaltung mit Protonen- und Ladungstransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Hälfte) schließen eine Demethylierung am Ring A aus. N-C-Spaltung mit Protonen- und Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit m/z = 247, was eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an C-17 oder C-18 und eine Hydroxylierung indiziert. Das Ion mit m/z = 220 wird durch C-C-Spaltung zwischen C-11 und C-12 mit Protonentransfer gebildet und beweist, daß sowohl die Hydroxylierung als auch die Demethylierung im höhersubstituierten Teil stattgefunden hat. Das Ion mit m/z = 398 zeigt, daß die Hydroxylierung an der Isopropylgruppe stattgefunden haben muß, weil es einer Abspaltung von  $C_3H_6OH$  entspricht. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M19**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 457$  (2 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Demethylierung und Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 151, 165, 276, 307$  und  $440$  (Tab. 14). Die Abspaltung eines Hydroxyradikals vom Molekülion führt zum Ion mit  $m/z = 440$  und bestätigt, daß eine Hydroxylierung im Molekül stattgefunden hat. N-C-Spaltung und  $\alpha$ -Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führen zu den Ionen mit  $m/z = 165$  und  $m/z = 151$ , die eine Demethylierung und Hydroxylierung in der niedersubstituierten Hälfte ausschließen. Die Ionen mit  $m/z = 276$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Seite) und  $m/z = 307$  (gebildet durch  $\alpha$ -Spaltung mit Protonentransfer auf der niedersubstituierten Hälfte) weisen auf eine Hydroxylierung in der höhersubstituierten Hälfte und eine oxidative Demethylierung am Ring B hin. Da keine Wasserabspaltung, sondern der Verlust eines Hydroxyradikals beobachtet wird ( $m/z = 457 \rightarrow m/z = 440$ ), ist eine Hydroxylierung von Ring B wahrscheinlich. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M20**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 471$  (16 amu höher als die Mutterverbindung) auf, was auf eine Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 165, 206, 234, 258, 259$  und  $276$  (Tab. 14). N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 165$  und schließt eine oxidative Demethylierung des Ring A aus. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 276$  und weist auf eine Hydroxylierung in der höhersubstituierten Hälfte hin. Weitere Fragmentierung von  $m/z = 276$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 234$  und  $258$ . Das Ion mit  $m/z = 234$  kann durch Abspaltung der Isopropylgruppe oder durch C-C-Spaltung zwischen C-12 und C-13 gebildet werden. Wasserabspaltung und die Abspaltung einer Hydroxygruppe vom gebildeten Ion mit  $m/z = 276$  führen zu den Ionen mit  $m/z = 258$  und  $m/z = 259$ , die eine Hydroxylierung in der höhersubstituierten Hälfte indizieren. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die

MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M21**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 471$  (16 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Die Fragmentationen von M21 sind mit denen des unkonjugierten Metaboliten M12 identisch (allerdings unterscheiden sich die Retentionszeiten). Da durch die Hydroxylierung an C-7 ein neues Stereozentrum entsteht, könnte M21 ein Diastereomer des Metaboliten M12 sein. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M22**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 471$  (16 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Hydroxylierung des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zum Ion mit  $m/z = 453$  und bestätigt eine Hydroxylierung im Molekül. Die Ionen mit  $m/z = 165$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte) und mit  $m/z = 151$  (gebildet durch C-C-Spaltung mit Ladungstransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Hälfte) schließen eine oxidative Hydroxylierung der niedersubstituierten Hälfte aus. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 260$ , was ebenfalls eine oxidative Hydroxylierung sowohl der höher- als auch der niedersubstituierten Hälfte ausschließt. Die oxidative Hydroxylierung kann also nur direkt am Stickstoff (Hydroxylamin des N-Oxids) oder an der stickstoffgebundenen Methylgruppe erfolgt sein. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, daß sich das N-Oxid in wäßriger Lösung via Cope-Eliminierung zu einem Hydroxylamin und Dimethoxystyrol zersetzt [72]. Weil beide Zersetzungsprodukte nicht detektiert wurden und das Fragmentierungsverhalten des N-Oxids sich deutlich von dem des Verapamils unterscheidet, kann die Bildung des N-Oxids ausgeschlossen werden (die massenspektrometrischen Daten des N-Oxids wurden mit Hilfe der Flüssig-Sekundärionenmassenspektroskopie aufgenommen: Das Quasimolekülion war mit  $[M+H]^+ = 471$  identisch mit dem des Metaboliten M21, allerdings wurde im MS<sup>2</sup>-Modus das Fragmention mit  $m/z = 455$  gebildet, so daß das N-Oxid ausgeschlossen werden konnte [72]). Es wird deshalb eine oxidative Hydroxylierung der



stickstoffgebundenen Methylgruppe zum Carbinolamin vorgeschlagen, obwohl die meisten Carbinolamine in Lösung nicht stabil sind. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M23**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 469$  (14 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu einem intensiven Peak des Ions mit  $m/z = 165$  und zu den weiteren Ionen mit  $m/z = 151$  und 441 (Tab. 14).

Die Ionen mit  $m/z = 165$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte) und mit  $m/z = 151$  (gebildet durch C-C-Spaltung mit Ladungstransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff) schließen eine Oxidierung der niedersubstituierten Molekülhälfte aus. Die Abspaltung von CO führt zu dem Fragmention mit  $m/z = 441$ , was auf die Anwesenheit einer Carbonylgruppe hinweist. Weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 441$  führt ausschließlich zu dem Ion mit  $m/z = 165$ . Die MS-Daten des Metaboliten M23 stimmen weitestgehend mit dem des Norverapamil (M6) überein. Aufgrund der CO-Abspaltung wird eine Oxidation der stickstoffgebundenen Methylgruppe zum N-Formylamin vorgeschlagen. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M24**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 413$  (42 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine dreifache oxidative Demethylierung im Molekül hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 150, 165, 261$  und 395 (Tab. 14). Die Ionen mit  $m/z = 165$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte) und  $m/z = 150$  (gebildet durch C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff mit Protonen- und Ladungstransfer) schließen eine oxidative Demethylierung am Ring A aus. Das Ion mit  $m/z = 261$  wird durch C-C-Spaltung mit Protonentransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff gebildet und weist auf eine oxidative Demethylierung der N-Methylgruppe und der beiden Methoxygruppen an Ring B hin. Wasserabspaltung aus den beiden vicinalen Hydroxygruppen am Ring B, die durch oxidative Demethylierung gebildet wurden, führt zum Ion mit  $m/z = 395$

(Normalerweise führt ein einzelne Hydroxygruppe, die am aromatischen Ring gebunden ist, zu einer Abspaltung eines Hydroxyradikals). Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M25**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 413$  (42 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine dreifache oxidative Demethylierung im Molekül hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 151, 263, 246, 277, 370$  und  $395$  (Tab. 14). N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer) und  $m/z = 263$  (mit Protonentransfer). Das Ion mit  $m/z = 151$  weist auf eine oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe am Ring A hin, während das Ion mit  $m/z = 263$  auf eine doppelte Demethylierung im höhersubstituierten Molekülteil anzeigt. C-C-Spaltung mit Protonentransfer in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff führt zum Ion mit  $m/z = 277$ . Das Ion mit  $m/z = 246$  wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte gebildet und weist auf eine oxidative Demethylierung des Stickstoffs und eine zusätzliche oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe am Ring B hin. Die Abspaltung von Wasser vom Quasimolekülion führt zum Ion mit  $m/z = 395$ . Die Abspaltung der Isopropylgruppe führt zum Ion mit  $m/z = 370$ . Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M26**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 471$  (16 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Hydroxylierung des Verapamils hinweist.

Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 291$  und  $453$ . Wasserabspaltung führt zum Ion mit  $m/z = 453$  und weist auf eine Hydroxylierung im Molekül hin (Tab. 14). Das Ion mit  $m/z = 291$  wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Seite gebildet und schließt eine Hydroxylierung der höhersubstituierten Hälfte aus. Fragmentierung von  $m/z = 291$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 248$  (Abspaltung der Isopropylgruppe) und  $m/z = 260$  (Abspaltung von Methylamin), die eine Hydroxylierung in der niedersubstituierten Hälfte unterstützen. Die Hydroxylierung kann folglich an C-2, C-3, C-6, C-7,

C-8, C-31 oder C-33 stattgefunden haben. Sowohl beim Metaboliten M25 als auch beim O-Demethylverapamil M7 tritt keine Wasserabspaltung auf, was gegen eine Hydroxylierung des aromatischen Ringes spricht. Die Hydroxylierung kann nur an C-7, C-8, C-31 oder C-32 stattgefunden haben. Da die Fragmentierungen des Metaboliten M26 weitestgehend mit denen des Metaboliten M27 übereinstimmen, wird für M26 eine Hydroxylierung der Methoxygruppe an C-31 als Oxidationsvorläufer des O-Demethylverapamil (M7) angenommen. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M27**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 469$  (14 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine Oxidation des Verapamils hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu einem intensiven Peak des Ions mit  $m/z = 291$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Protonentransfer auf der niedersubstituierten Hälfte). Eine weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z = 291$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 248$  (Abspaltung der Isopropylgruppe) und  $m/z = 260$  (Abspaltung von Methylamin), die auf eine Oxidation in der niedersubstituierten Hälfte hinweisen. Metabolit M27 stimmt in seinen Fragmentierungen weitestgehend mit denen von M26 überein. Faßt man alle MS-Daten zusammen, so ist die Bildung einer Aldehydvorstufe als Oxidationsvorläufer des O-Demethylverapamil wahrscheinlich. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M28**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 413$  (42 amu niedriger als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf eine dreifache oxidative Demethylierung im Molekül hinweist. Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Modus führt zu dem Ion mit  $m/z = 277$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Protonentransfer auf der niedersubstituierten Hälfte) und eine weitere Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus zu den Ionen mit  $m/z = 234$  (gebildet durch Abspaltung der Isopropylgruppe), 235 (gebildet durch Abspaltung von Propen aus der Isopropylgruppe) und  $m/z = 260$  (gebildet durch Abspaltung von Ammoniak), die auf eine oxidative Demethylierung des Stickstoffs und der Methoxygruppen an Ring A hinweisen (Tab. 14). Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M29**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 633$  (179 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion führt zu  $m/z = 457$  und weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Fragmentierung im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 167, 234, 261, 291$  und  $439$  (Tab. 14). Eine Wasserabspaltung vom Ion mit  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus ergibt das Ion mit  $m/z = 439$  und indiziert eine Hydroxylierung des Verapamils.

N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 167$  (mit Ladungstransfer) und  $m/z = 291$  (mit Protonentransfer), die eine Hydroxylierung der niedersubstituierten Hälfte und eine zusätzliche oxidative Demethylierung einer Methoxygruppe an Ring A indizieren. Dies wird durch die Ionen mit  $m/z = 261$  (gebildet durch N-C-Spaltung mit Ladungs- und Protonentransfer auf der höhersubstituierten Seite) und  $m/z = 234$  (gebildet durch C-C-Spaltung zwischen C-11 und C-12 mit Ladungs- und Protonentransfer) unterstützt. Die Hydroxylierung kann also nur an C-2, C-3, C-6, C-7 und C-8 stattgefunden haben. Weil eine Wasserabspaltung beobachtet wird, ist eine Hydroxylierung der Alkylkette wahrscheinlich. Da Metabolit M31 an Position C-8 hydroxyliert wird, ist eine Hydroxylierung an C-7 wahrscheinlicher. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M30**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 633$  (179 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf. Eine Wasserabspaltung vom Molekülion führt zum intensiven Ion mit  $m/z = 615$  und weist auf eine Hydroxylierung im Molekül hin. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion auf  $m/z = 457$  deutet auf die Bildung eines Glucuronids. Im MS<sup>2</sup>-Modus wurden außerdem die Ionen mit  $m/z = 234, 262, 438$  und  $439$  gebildet (Tab. 14). Wasserabspaltung vom Ion mit  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zum Ion mit  $m/z = 439$  und weist ebenfalls auf eine Hydroxylierung im Molekül hin.

N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der höhersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 262$ , das auf eine oxidative Demethylierung an Ring B und eine Hydroxylierung in der höhersubstituierten Hälfte hinweist. Das Ion mit  $m/z = 234$  (gebildet durch

C-C-Spaltung mit Ladungstransfer zwischen C-11 und C-12) schränkt die Position der Hydroxylierung auf C-11, die Isopropylgruppe und den Ring B ein. Eine einfache Hydroxylierung des aromatischen Rings führt in der Regel zur Abspaltung einer Hydroxygruppe. Bei den Metaboliten mit hydroxylierter Isopropylgruppe M13 und M18 wurde keine Wasserabspaltung aus dem Molekülion des Glucuronids beobachtet. Deshalb wird für Metabolit M30 eine Hydroxylierung des aromatischen Rings B vicinal zur Hydroxylgruppe, die durch oxidative Demethylierung gebildet wurde, angenommen. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M31**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 633$  (179 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf, was auf ein Konjugat deutet. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion auf  $m/z = 457$  weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Fragmentierung von  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 181, 260, 277, 306, 414$  und  $439$  (Tab. 14). Eine Wasserabspaltung vom Ion mit  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zum Ion mit  $m/z = 439$  und indiziert eine Hydroxylierung. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 181$  (mit Ladungstransfer) und  $m/z = 277$  (mit Protonentransfer), die auf eine Hydroxylierung im Phenylalkylrest und eine oxidative Demethylierung in der höhersubstituierten Hälfte hinweisen. N-C-Spaltung auf der höhersubstituierten Hälfte mit Ladungs- und Protonentransfer führt zum Ion mit  $m/z = 260$ , das auf eine oxidative Demethylierung der N-Methylgruppe deutet. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff führt zum Ion mit  $m/z = 306$  und beweist, daß die Hydroxylierung nur an C-8 stattgefunden haben kann. Die Abspaltung der Isopropylgruppe führt zum Ion mit  $m/z = 414$ . Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### Metabolit **M32**:

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 633$  (179 amu höher als das Quasimolekülion des Verapamils) auf. Die Abspaltung von 176 amu im MS<sup>2</sup>-Modus vom Vorläuferion auf  $m/z = 457$  weist auf die Bildung eines Glucuronids hin. Fragmentierung von  $m/z = 457$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Ionen mit  $m/z = 181, 260,$

277, 319 und 439. Eine Wasserabspaltung vom Ion mit  $m/z = 457$  im  $MS^3$ -Modus führt zum Ion mit  $m/z = 439$  und indiziert eine Hydroxylierung. N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zu den Ionen mit  $m/z = 181$  (mit Ladungstransfer) und  $m/z = 277$  (mit Protonentransfer), die auf eine Hydroxylierung im Phenylalkylrest und eine oxidative Demethylierung in der höhersubstituierten Hälfte hinweisen. Abspaltung von Ammoniak vom Ion mit  $m/z = 277$  führt zum Ion mit  $m/z = 260$  und beweist, daß an der N-Methylgruppe eine oxidative Demethylierung stattgefunden hat. Aufgrund der Wasserabspaltung wird eine Hydroxylierung an C-7 oder C-8 vorgeschlagen. Da für den Metaboliten M31 eine Hydroxylierung an C-8 erfolgte, wird für M32 eine Hydroxylierung an C-7 wie beim Metaboliten M8 vorgeschlagen. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Metaboliten um Diastereomeren. Dieser Metabolit wurde auch in der unkonjugierten Form detektiert. Die MS-Daten sind im Einklang mit der Struktur in Abb. 63.

#### **4.1.2. Zusammenfassung**

Insgesamt konnten über die Zuordnung der Fragmentierungen die Strukturen von 32 Metaboliten bestimmt werden, von denen 18 als Phase-II-Konjugat auftraten.

Eine eindeutige Unterscheidung der Positionen der oxidativen O-Demethylierungen an den Methoxygruppen (C-4 oder C-5 am Ring A und C-17 oder C-18 am Ring B) war mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht möglich. Ebenso konnte die Verknüpfungsposition der Glucuronsäure z. B. bei den Metaboliten M2 und M5 nicht eindeutig festgelegt werden, da, wie das Beispiel des Verapamilglucuronids (M14) zeigt, die Verknüpfung nicht nur am Sauerstoff, sondern auch am Stickstoff erfolgen kann.

Zur Charakterisierung dieser Verknüpfungsposition und zur Bestimmung der O-Demethylierungsposition wurden die Hauptglucuronide im humanem Urin mit der  $^1H$  NMR-Spektroskopie vermessen.

#### **4.1.3. Strukturaufklärung der Phase-II-Metaboliten des Verapamils mittels offline $^1H$ NMR, $MS^n$ und HPLC-NMR**

In Kapitel 3.2 wurde erläutert, daß eine eindeutige Identifizierung der Metaboliten nur möglich war, wenn ergänzend zur Massenspektrometrie auch die  $^1H$  NMR-Spektroskopie zugezogen wurde, da Stellungsisomeren sonst nicht zugeordnet werden konnten.

Da über die Stellungsisomerie der Phase-I-Metaboliten des Verapamils schon relativ viel bekannt ist, stand die Zuordnung der Phase-II-Metaboliten des Verapamils im Vorder-

grund, die hauptsächlich als Glucuronide vorlagen. Prinzipiell kann die Kopplung entweder am Sauerstoff einer Hydroxygruppe oder am Stickstoff erfolgen. Eine Unterscheidung dieser Verknüpfungspositionen war mit Hilfe der Massenspektrometrie allein nicht möglich.

Ebenso konnte nicht unterschieden werden, ob die Demethylierung einer Methoxygruppe und die anschließende Glucuronidierung in meta- oder para-Stellung des substituierten Aromatenringes erfolgte. Zur näheren Charakterisierung der Verknüpfungsposition wurden die Phase-II-Metaboliten des Verapamils, die in den höchsten Konzentrationen im Urin ausgeschieden wurden, mit Hilfe der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie untersucht.

#### **4.1.3.1. Ergebnisse aus den offline $^1\text{H}$ NMR-Messungen**

Alle geschnittenen Fraktionen wurden mittels  $^1\text{H}$  NMR vermessen. Allerdings waren die Metabolitenkonzentrationen in den Fraktionen 1, 5 und 6 zu gering, um eine eindeutige Strukturzuordnung mit Hilfe von  $^1\text{H}$  NMR-Daten treffen zu können.

Die Zuordnung der Signale im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum des Verapamils erfolgte zunächst anhand von Literaturdaten [60] und wurde für die aromatischen Protonen darüber hinaus durch Analyse der Spinsysteme verifiziert. Die Zuordnung der Methoxygruppen erfolgte über das 2D NOESY-Spektrum, da nur Cross-Peaks zwischen Methoxygruppen und nachbarständigen aromatischen Protonen beobachtet wurden. Auch der Ort der Demethylierung in den Metaboliten wurde aus den 2D NOESY-Spektren bestimmt: Das Fehlen eines Cross-Peaks zwischen einer Methoxygruppe und einem der aromatischen Protonen H-3, H-6, H-16 bzw. H-19 zeigt an, daß in der Nachbarposition eine Demethylierung stattgefunden hat. Die  $^1\text{H}$  NMR-Daten und die beobachteten Cross-Peaks für Verapamil und seine identifizierten Phase-II-Metaboliten sind in Tab. 15 und 17 sowie Abb. 37 dargestellt.

**Tab. 15:** <sup>1</sup>H NMR-Daten von Verapamil und seinen Phase-II-Metaboliten

Proton	Chemische Verschiebungen [ppm]						Kopplungskonstante [Hz]		
	Verapamil	M2-I	M2-II	M5-I	M5-II	M9			
	δ	δ	δ	δ	δ	δ	<sup>3</sup> J vicinal	<sup>3</sup> J ortho	<sup>3</sup> J meta
H-16 (d)	6.920	7.106	7.128	7.123	7.103	7.128	-	8.4	-
H-19 (d)	6.834	6.886	6.967	6.938	6.880	6.941	-	-	2.1
H-15 (dd)	6.942	6.975	6.910	6.905	6.956	6.920	-	8.4	2.1
H-3 (d)	6.833	-	-	6.860	6.860	6.859	-	8.4	-
H-6 (d)	6.755	-	-	6.794	6.794	6.791	-	-	2.1
H-2 (dd)	6.719	-	-	6.730	6.730	6.719	-	8.4	2.1
H-7, H-8, H-10 (m)	2.755-3.055	2.723-2.883	2.723-2.797	2.755-3.055	2.755-3.055	2.755-3.055	-	-	-
H-11 (m)	1.562, 1.232	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	1.562, 1.232	-	-	-
H-12 (m)	2.073-2.174	2.122-2.261	2.122-2.261	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	2.073-2.174	-	-	-
H <sub>3</sub> -21 (s)	3.729	-	-	3.731	3.731	3.731	-	-	-
H <sub>3</sub> -23 (s)	3.729	-	-	3.738	3.738	3.738	-	-	-
H <sub>3</sub> -33 (s)	3.759	3.811	3.826	3.815	3.805	3.810	-	-	-
H <sub>3</sub> -31 (s)	3.745	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>3</sub> -24 (s breit)	2.607	2.485	2.485	-	-	2.582	-	-	-
H-25 (m)	1.502	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	-	-	-
H <sub>3</sub> -27	1.090	1.115	1.115	1.098	1.087	1.087	6.6	-	-
H <sub>3</sub> -26	0.686	0.722	0.722	0.702	0.707	0.704	6.6	-	-
H <sub>1</sub> -1' (d)	-	4.993	4.975	4.958	4.969	4.946	7.2	-	-
H-2', H-3', H-4', H-5' (m)	-	3.704-3.503	3.693-3.503	3.481-3.670	-	3.481-3.670	-	-	-

<sup>1)</sup> Signalmultiplizität: d Dublett, dd Doppeldublett, m Multipllett, s Singulett

<sup>2)</sup> Signale konnten aufgrund von Matrixüberlagerungen nicht eindeutig zugeordnet werden

<sup>3)</sup> Nummerierung des Verapamils wird zum besseren Vergleich beibehalten

<sup>4)</sup> Lösemittelzusammensetzung AcCN-D<sub>3</sub>/ D<sub>2</sub>O 60/40 (v/v), die chemischen Verschiebungen wurden auf AcCN-D<sub>3</sub> (1.975 ppm) referenziert.

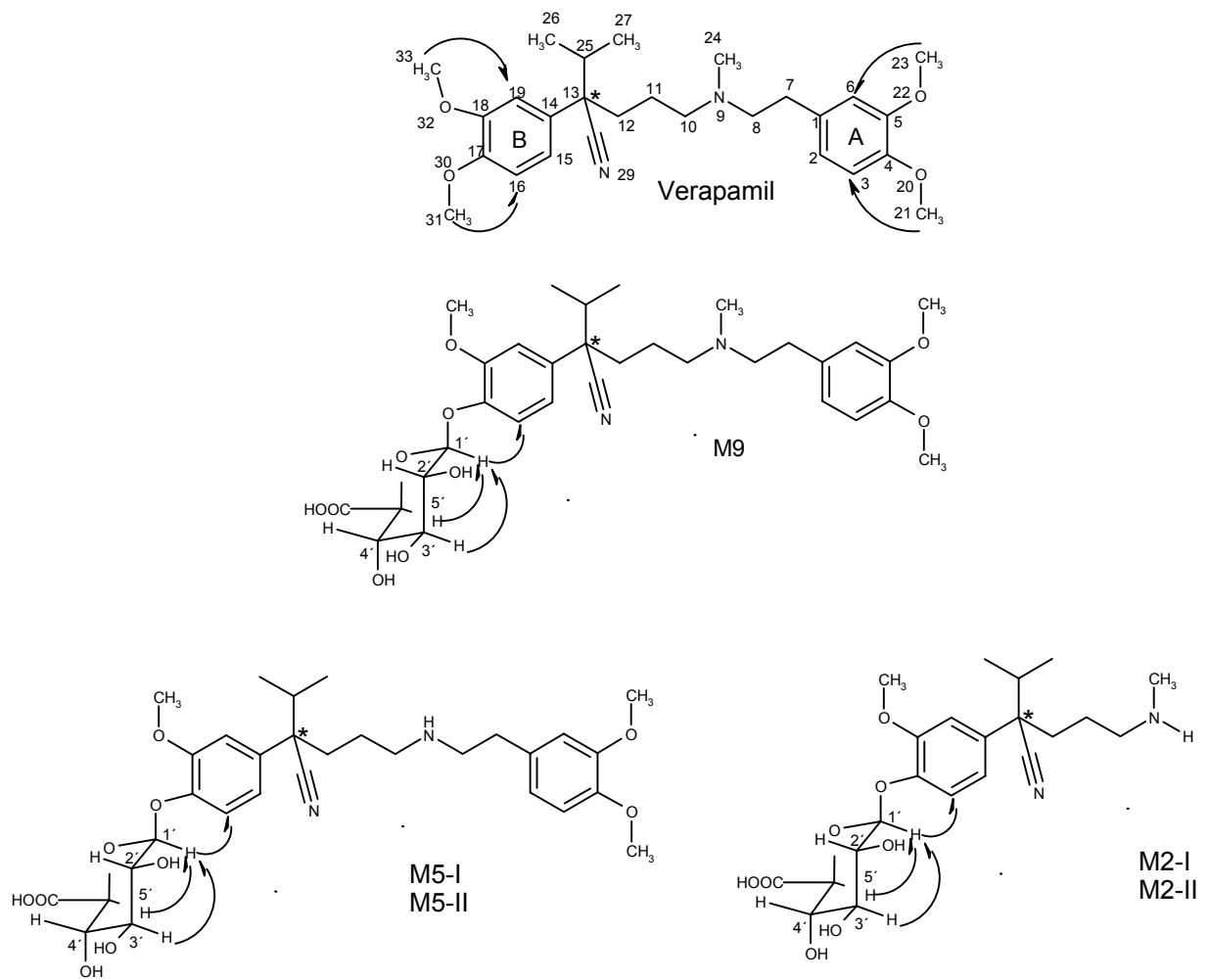
**Tab. 16:** Beobachtete Cross-Peaks im 2D NOESY-Spektrum

Verbindung	Cross-Peaks <sup>1)</sup>						
	H <sub>3</sub> -33/H-19	H <sub>3</sub> -31/H-16	H <sub>3</sub> -23/H-6	H <sub>3</sub> -21/H-3	H-1'/H-16	H-1'/H-3'	H-1'/H-5'
Verapamil	x	x	x	x	-	-	-
M2-I	x	-	-	-	x	x	x
M2-II	x	-	-	-	x	x	x
M5-I	x	-	x	x	x	x	x
M5-II	x	-	x	x	x	x	x
M9	x	-	x	x	x	x	x

<sup>1)</sup> Cross-Peaks wurden auch im Long Range COSY-Spektrum beobachtet



**Abb. 37:** Beobachtete Cross-Peaks für Verapamil und seine Metaboliten im 2D NOESY-Spektrum



#### 4.1.3.1.1. Diskussion der $^1\text{H}$ NMR-Daten von Metabolit M2

Die Strukturinformationen aus den MS-Daten für den Metaboliten M2 werden durch die  $^1\text{H}$  NMR-Daten unterstützt und ergänzt.

Im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum der Schnittfraktion 2 beobachtet man einen doppelten Signalsatz mit einem Intensitätsverhältnis von ca. 3:1 (M2-I: M2-II), was auf zwei sehr ähnliche Substanzen hindeutet (Abb. 38 und 39). Im MS-Spektrum sind diese Verbindungen aufgrund ihres identischen Fragmentierungsmusters nicht unterscheidbar. Eine mögliche Erklärung für die Struktur dieser beiden Isomeren wird später gegeben.

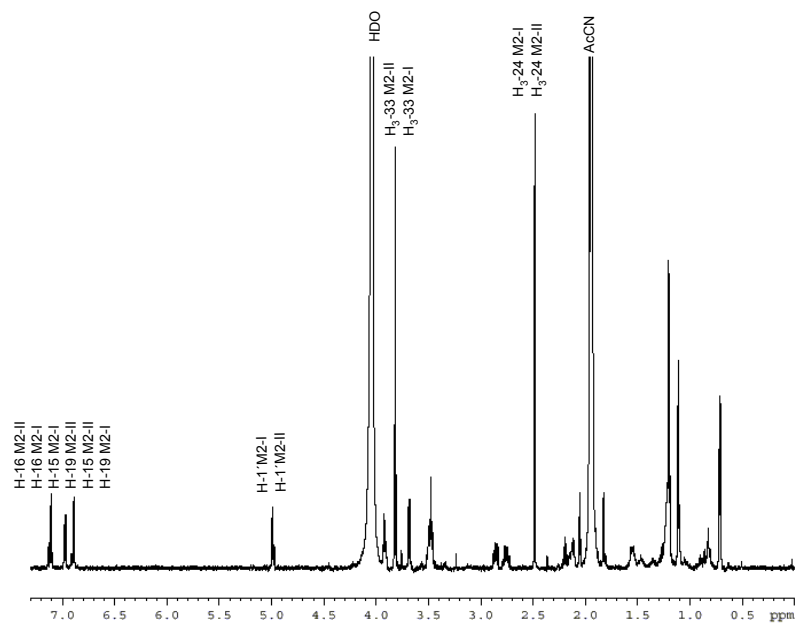
Im aromatischen Bereich beobachtet man eine teilweise Überlappung der Signale (Abb. 39). Das Fehlen der Protonensignale von H-2, H-3 und H-6 weist auf die Abspaltung der Phenylalkylseitenkette hin. Bei 4.993 ppm (M2-I) und 4.975 ppm (M2-II) beobachtet man zwei teilweise überlagerte Dubletts, die von dem anomeren Proton des Glucuronsäurerestes in beiden Isomeren herrühren (Abb. 40).

Die N-Methylgruppensignale überlagern sich für beide Isomeren bei 2.485 ppm und unterstützen den massenspektrometrischen Befund, daß keine N-Demethylierung stattgefunden hat (Abb. 38)

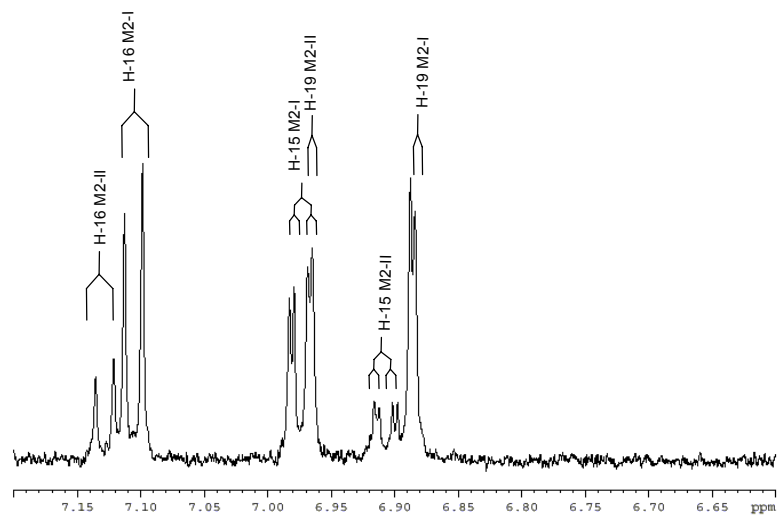
Bei 3.811 und 3.826 ppm beobachtet man zwei Singulett, die aufgrund ihrer Intensität der Methoxygruppe der jeweiligen Isomeren zugeordnet werden können (Abb. 41).

Im 2D NOESY-Spektrum beobachtet man für beide Isomeren keinen Cross-Peak von einer Methoxygruppe zu dem aromatischen Proton H-16, dafür aber für M2-I von dem anomeren Proton H-1' zu H-16 (Abb. 43 und Tab. 16). Für die Nebenkomponente (M2-II) wurde aufgrund der geringen Konzentration bei den offline  $^1\text{H}$  NMR-Messungen kein Cross-Peak von dem anomeren Proton H-1' zu H-16 beobachtet, dafür aber im 2D WET NOESY des Metaboliten M2-I bei den HPLC-NMR-Messungen (siehe Abb. 57). Für die Strukturen von M2-I und M2-II bedeutet dies, daß die Methoxygruppe an Position C-17 demethyliert und die Hydroxygruppe in der Folge glucuronidiert wurde.

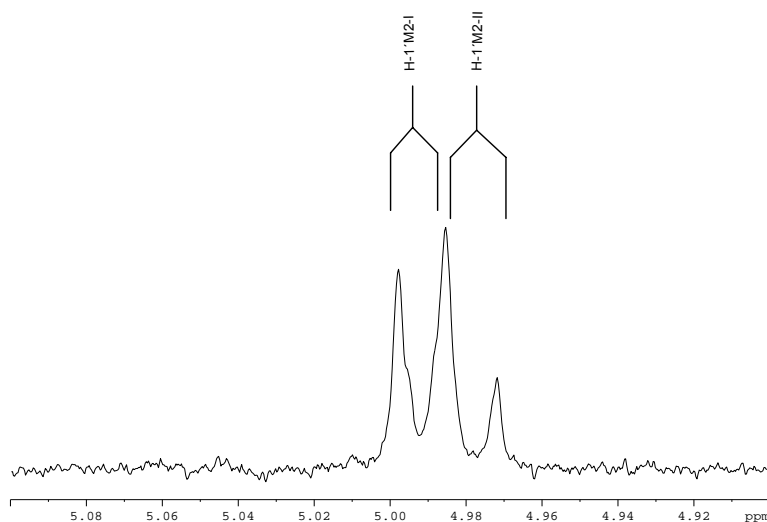
**Abb. 38:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Übersichtsspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II



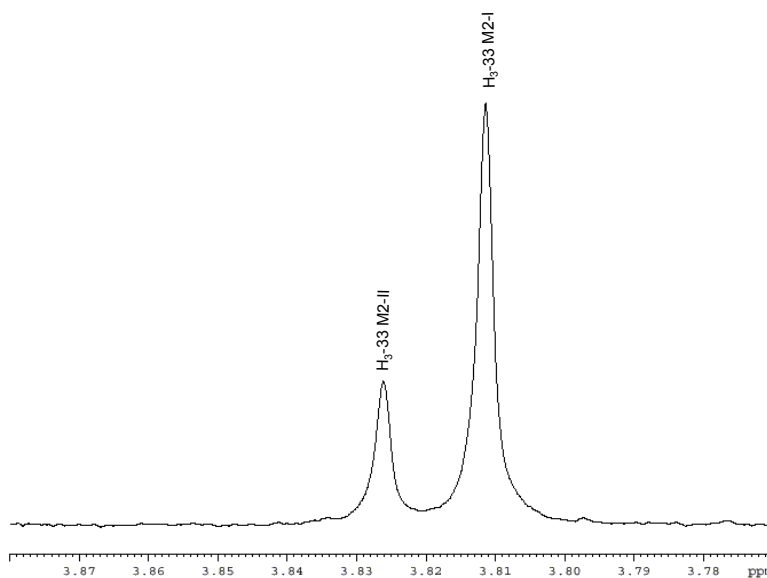
**Abb. 39:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)



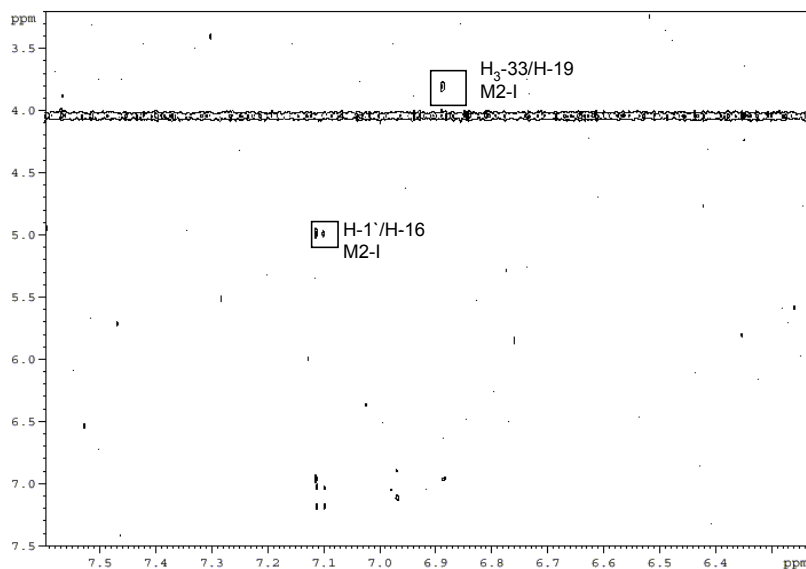
**Abb. 40:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)



**Abb. 41:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)



**Abb. 42:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR 2D NOESY-Teilspektrum



detektierte Cross-Peaks im 2D NOESY-Spektrum zwischen den Protonen der Methoxygruppen und den aromatischen Protonen sowie zwischen dem anomeren Proton H-1' und dem aromatischen Proton H-16

#### 4.1.3.1.2. Diskussion der $^1\text{H}$ NMR-Daten von Metabolit M5

Die Strukturinformationen aus den MS-Daten für den Metaboliten M5 werden durch die  $^1\text{H}$  NMR-Daten unterstützt und ergänzt.

Das  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum weist einen doppelten Signalsatz (Abb. 43) im Verhältnis 60:40 (M5-I:M5-II) auf, was auf das Vorhandensein von zwei sehr ähnlichen Substanzen hindeutet. Im Bereich aromatischer Protonen beobachtet man eine vollständige Überlappung der Signale für die Protonen H-2, H-3 und H-6 (Abb. 43). Dies deutet darauf hin, daß die beiden Metaboliten im Phenylalkylamin-Teil des Moleküls identisch sind. Bei 4.958 ppm und 4.969 ppm beobachtet man zwei teilweise überlagerte Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 7.2 Hz, die von dem anomeren Proton der jeweiligen  $\beta$ -verknüpften Glucuronsäure herrühren (Abb. 44).

Für die Methoxygruppen findet man 2 Singulets bei 3.731 und 3.738 ppm mit der anteiligen Intensität von 2 x 6 Protonen (Abb. 45) und bei 3.805 und 3.815 ppm mit der anteiligen Intensität von drei Protonen.

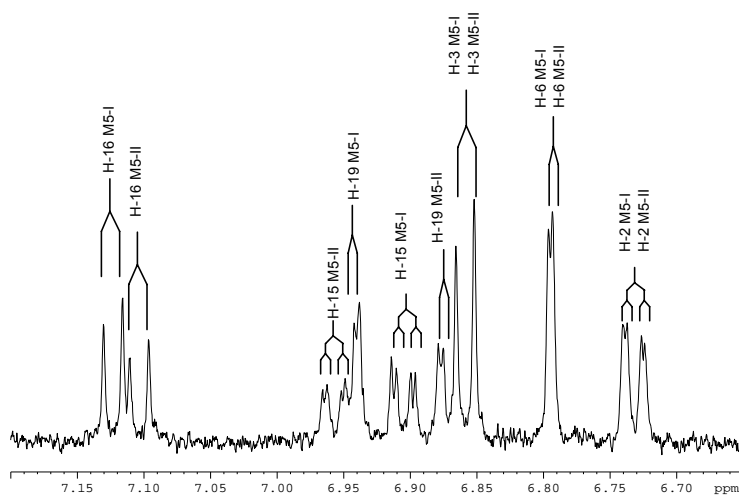
Für beide Isomeren tritt kein Signal der N-Methylgruppe auf, was den massenspektrometrischen Befund unterstützt, daß eine Demethylierung am Stickstoff stattgefunden hat (Abb. 46).

Im 2D NOESY-Spektrum lassen sich die Methoxygruppen eindeutig zuordnen (Abb. 47). So findet man bei beiden Isomeren am Ring A Cross-Peaks von den Methoxyprotonen bei 3.731 ppm zu H-3 sowie von den Methoxyprotonen bei 3.738 ppm zu H-6 einen Cross-Peak. Hier überlagern sich die Methoxyprotonen H<sub>3</sub>-21 und H<sub>3</sub>-23 der beiden koeluisierenden Isomeren.

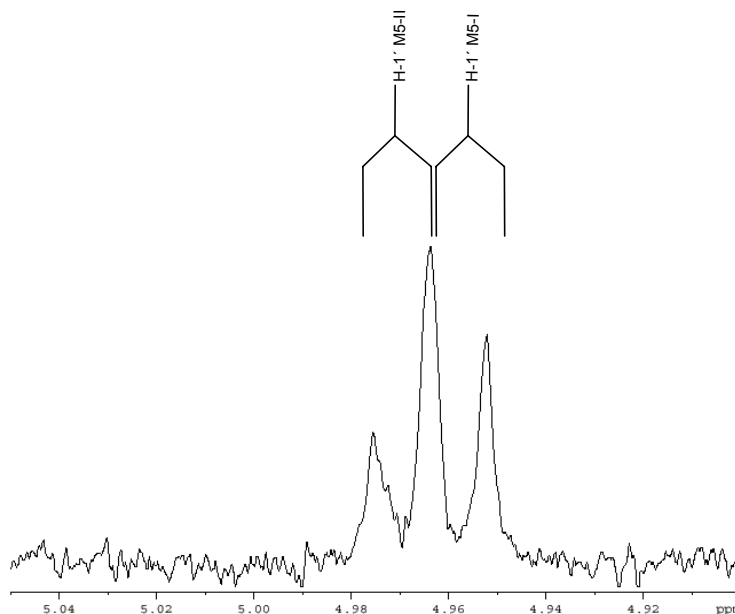
Von einer Methoxygruppe zu dem aromatischen Proton H-16 ist kein Cross-Peak zu sehen, allerdings von dem anomeren Proton H-1' zu H-16 und von den Methoxygruppen bei 3.805 und 3.815 ppm zu H-19. Dies sind die Methoxygruppenprotonen H<sub>3</sub>-33 der Isomeren M5-I und M5-II.

Faßt man alle Daten zusammen, kommt man zu dem Schluß, daß bei beiden Isomeren die Methoxygruppe an C-17 demethyliert und anschließend die freie Hydroxygruppe mit Glucuronsäure konjugiert wurde. Weiter hat bei beiden Isomeren zusätzlich eine Demethylierung am Stickstoff stattgefunden.

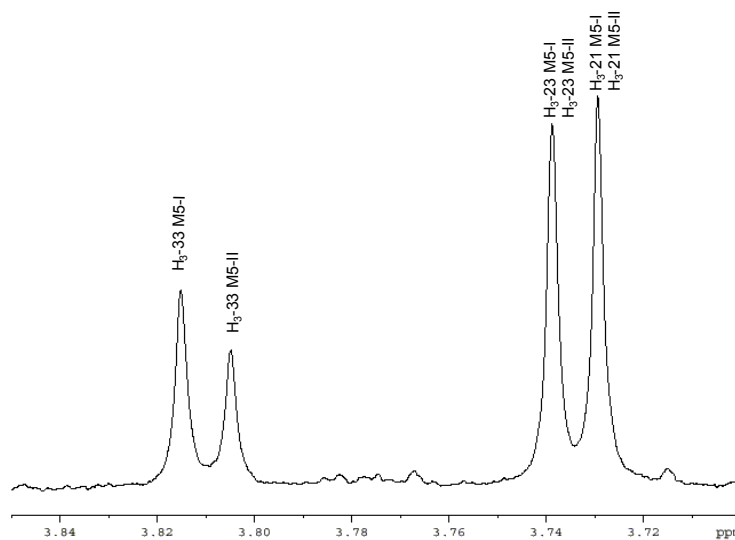
**Abb. 43:** 600 MHz <sup>1</sup>H NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)



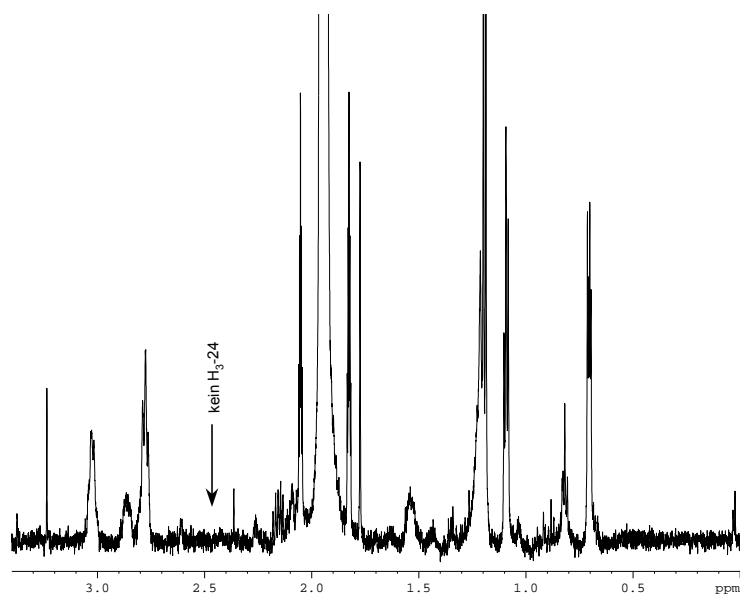
**Abb. 44:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)



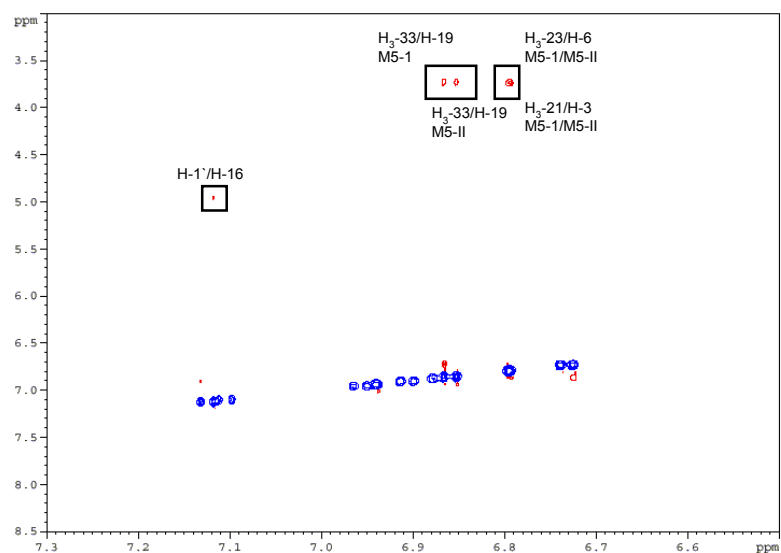
**Abb. 45:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)



**Abb. 46:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M5-I und M5-II (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)



**Abb. 47:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus 2D NOESY der Metaboliten M5-I und M5-II



detektierte Cross-Peaks im 2D NOESY-Spektrum zwischen den Protonen der Methoxygruppen und den aromatischen Protonen sowie zwischen dem anomeren Proton H-1' und dem aromatischen Proton H-16



#### 4.1.3.1.3. Diskussion der $^1\text{H}$ NMR-Daten von Metabolit M9

Die Strukturinformationen aus den MS-Daten für den Metaboliten M9 werden durch die  $^1\text{H}$  NMR-Daten unterstützt und ergänzt.

Im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum beobachtet man im Bereich aromatischer Protonen das gleiche Kopplungsmuster wie beim Verapamil, allerdings sind die Signale der Protonen des A-Ringes im Vergleich zum Verapamil z. T. leicht tieffeldverschoben (Tab. 15 und Abb. 48). Bei 4.946 ppm beobachtet man ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 7.2 Hz, was typisch für das anomere Proton einer  $\beta$ -verknüpften Glucuronsäure ist (Abb. 49). Eine eindeutige Zuordnung der Zuckerprotonen der Glucuronsäure mittels 1D TOCSY war wegen sehr ähnlicher Verschiebungen der Zuckerprotonen nicht möglich (Abb. 51).

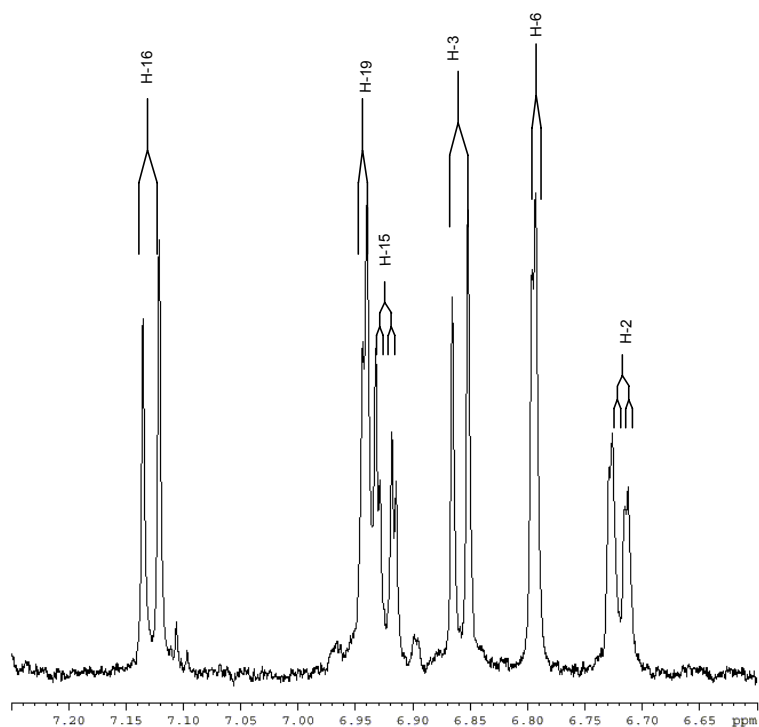
Das Singulett der N-Methylgruppe tritt bei 2.582 ppm auf und unterstützt den massenspektrometrischen Befund, daß keine Demethylierung am Stickstoff stattgefunden hat (Abb. 50). Das Signal der N-Methylgruppe und die Signale der benachbarten Protonen wiesen eine starke Verbreiterung auf, die durch die Pseudorotation des Stickstoffs und der damit verbundenen Austauschverbreiterung zu erklären ist.

Für die Methoxygruppen findet man drei sich teilweise überlappende Singuletts bei 3.731, 3.738 und 3.810 ppm mit der anteiligen Intensität von jeweils drei Protonen (Abb. 49).

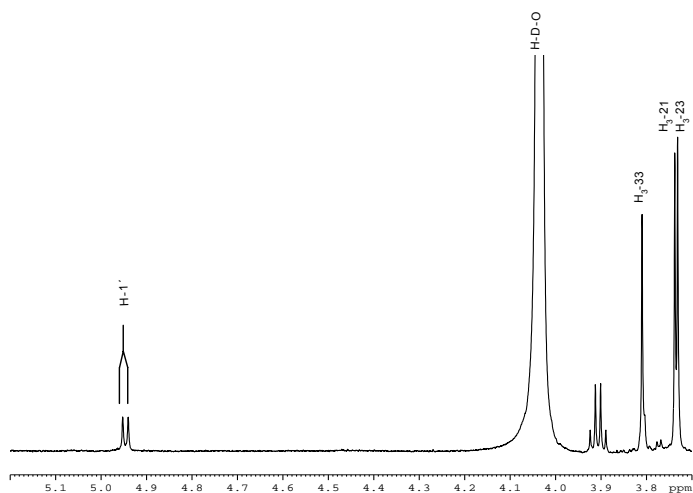
Im 2D NOESY-Spektrum lassen sich die Methoxygruppen eindeutig zuordnen (Abb. 52). So findet man am Ring A von den Methoxyprotonen bei 3.731 ppm zu H-3 sowie von den Methoxyprotonen bei 3.738 ppm zu H-6 einen Cross-Peak.

Von einer Methoxygruppe zu dem aromatischen Proton H-16 wird kein Cross-Peak beobachtet, allerdings von dem anomeren Proton H-1' zu H-16 sowie von der Methoxygruppe bei 3.810 ppm (H<sub>3</sub>-33) zu H-19. Faßt man alle Daten zusammen, kommt man zu dem Schluß, daß bei dem Metaboliten M9 die Methoxygruppe an C-17 demethyliert und anschließend die freie Hydroxylgruppe mit Glucuronsäure konjugiert wurde.

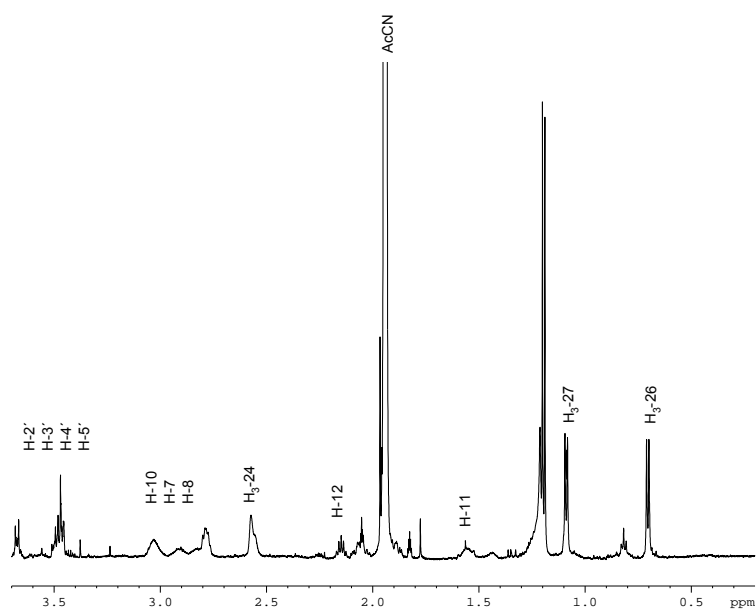
**Abb. 48:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)



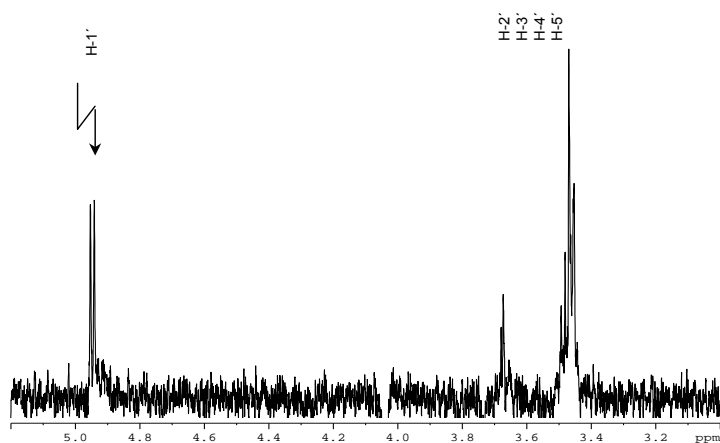
**Abb. 49:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure und der Methoxygruppenprotonen)



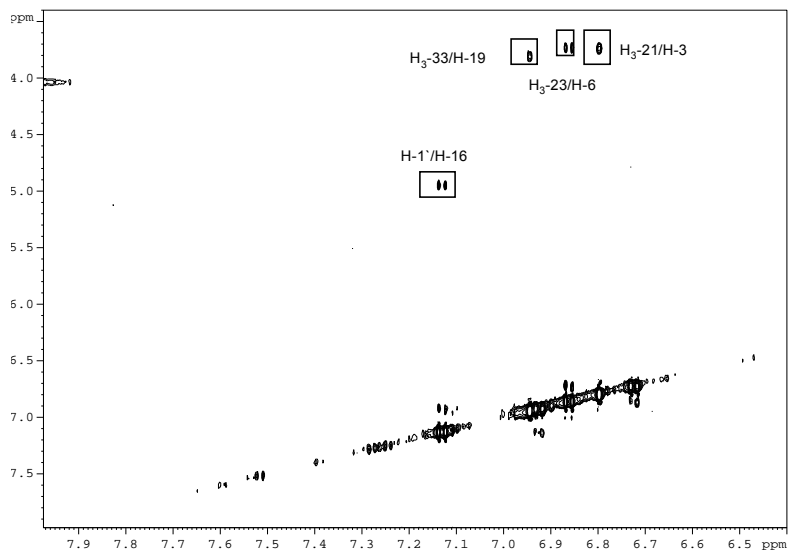
**Abb. 50:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum des Metaboliten M9 (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)



**Abb. 51:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus dem 1D TOCSY Spektrum des Metaboliten M9



**Abb. 52:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum: Ausschnitt aus dem 2D NOESY-Spektrum des Metaboliten M9



detektierte Cross-Peaks im 2D NOESY-Spektrum zwischen den Protonen der Methoxygruppen und den aromatischen Protonen sowie zwischen dem anomeren Proton H-1' und dem aromatischen Proton H-16

#### 4.1.3.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den offline $^1\text{H}$ NMR-Messungen

Es konnten die Metaboliten M2-I, M5-I und M9 identifiziert werden, deren Strukturen in dargestellt sind. Bei allen Metaboliten wurde die Methoxygruppe an C-17 oxidativ dealkyliert und die Hydroxygruppe in der Folge mit Glucuronsäure konjugiert.

Von den Metaboliten M2 und M5 trat jeweils noch ein weiteres Isomer auf (M2-II und M5-II). Wahrscheinlich handelt es sich um Diastereomeren.

#### 4.1.3.2. Ergebnisse aus den MS- und HPLC-NMR-Messungen

Die konventionelle Probenvorbereitung durch Aufreinigen und Schneiden der Metaboliten und anschließendem Vermessen im offline  $^1\text{H}$ -Mikroprobenkopf ist relativ zeitaufwendig. Die online HPLC  $^1\text{H}$  NMR (HPLC-NMR) hat den Vorteil, daß viele Verunreinigungen schon durch die Chromatographie abgetrennt werden können, so daß die zu untersuchenden Substanzen ohne aufwendige Probenvorbereitung vermessen werden können. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden, welche Resultate die HPLC-NMR lieferte. Hierzu wurden die Fraktionen 1A-1 und 1A-2 nach Aufreinigung auf der semipräparativen Säule direkt mit der HPLC-NMR vermessen. Durch Einsatz der HPLC-NMR konnten fast die gleichen Metaboliten identifiziert werden wie nach den offline  $^1\text{H}$  NMR-Messungen. Da die  $^1\text{H}$  NMR-Spektren bei der HPLC-NMR in einem anderen Lösemittelgemisch [Acetonitril/ $\text{D}_2\text{O}$  25/75 (v/v)] aufgenommen wurden als bei der offline  $^1\text{H}$  NMR [Acetonitril- $\text{D}_3$ / $\text{D}_2\text{O}$  60/40 (v/v)], unterschieden sich die chemischen Verschiebungen der Hauptmetaboliten. Nach Aufnahme der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren wurden die MS-Spektren der Metaboliten sowohl im deuterierten Eluenten als auch nach D/H-Rücktausch im nicht deuterierten Eluenten aufgenommen. Die MS- und  $^1\text{H}$  NMR-Daten der Metaboliten sind in Tab. 17 und 18 aufgelistet. Die beobachteten Cross-Peaks in den 2D WET NOESY-Spektren werden in Tab. 19 aufgeführt. Die Strukturen der identifizierten Metaboliten werden in Abb. 63 gezeigt.

**Tab. 17:** MS-Daten der identifizierten Metaboliten

	M2-I			M2-II			M5			M9		
	m/z in $\text{H}_2\text{O}$	m/z in $\text{D}_2\text{O}$	$Z_{\text{D/H}}$	m/z in $\text{H}_2\text{O}$	m/z in $\text{D}_2\text{O}$	$Z_{\text{D/H}}$	m/z in $\text{H}_2\text{O}$	m/z in $\text{D}_2\text{O}$	$Z_{\text{D/H}}$	m/z in $\text{H}_2\text{O}$	m/z in $\text{D}_2\text{O}$	$Z_{\text{D/H}}$
$[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{D}]^+$	453	459	5	453	459	5	603	609	5	617	622	4
$\text{MS}^2$	277	280	-	277	280	-	427	430	-	441	443	-
$\text{MS}^3$	234, 246	237, 247	-	234, 246	237, 247	-	165, 275, 384	166, 277, 387	-	165, 289	166, 290	-
$\text{MS}^4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	246	247	-

$Z_{\text{D/H}}$ : Zahl der austauschbaren Protonen

**Tab. 18:** <sup>1</sup>H NMR-Daten der identifizierten Metaboliten

Proton					Kopplungskonstanten [Hz]		
	M2-I <sup>3)</sup>	M2-II <sup>3)</sup>	M9	M5-I			
	δ <sup>4)</sup>	δ	δ	δ	<sup>3</sup> J <sub>vicinal</sub>	<sup>3</sup> J <sub>ortho</sub>	<sup>3</sup> J <sub>meta</sub>
H-16 (d) <sup>1)</sup>	7.136	7.150	7.141	7.129	-	8.4	-
H-19 (d)	6.944	6.995	6.968	6.968	-	-	2.1
H-15 (dd)	7.002	6.962	6.922	6.922	-	8.4	2.1
H-3 (d)	-	-	6.958	6.958	-	8.4	-
H-6 (d)	-	-	6.837	6.847	-	-	2.1
H-2 (dd)	-	-	6.758	6.778	-	8.4	2.1
H-7, H-8, H10 (m)	-	-	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	-	-	-
H-11 (m)	-	-	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	-	-	-
H-12 (m)	-	-	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	-	-	-
H <sub>3</sub> -21 (s), H <sub>3</sub> -23 (s)	-	-	3.769	3.769	-	-	-
H <sub>3</sub> -33 (s)	3.837	3.848	3.826	3.832	-	-	-
H <sub>3</sub> -31 (s)	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>3</sub> -24 (S <sub>breit</sub> )	2.524	2.524	2.657	-	-	-	-
H-25 (m)	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	<sup>-2)</sup>	-	-	-
H <sub>3</sub> -27 (d)	1.118	1.118	1.102	1.102	6.6	-	-
H <sub>3</sub> -26 (d)	0.724	0.724	0.712	0.712	6.6	-	-
H-1' (d)	5.040	5.030	4.992	5.015	7.2	-	-

<sup>1)</sup> Signalmultiplizität: d Dublett, dd Doppeldublett, m Multiplett, s Singulett

<sup>2)</sup> Signale konnten aufgrund von Matrixinterferenzen nicht eindeutig zugeordnet werden

<sup>3)</sup> Nummerierung des Verapamils wurde zum besseren Vergleich beibehalten

<sup>4)</sup> Lösemittelzusammensetzung Acetonitril/D<sub>2</sub>O 25/75 (v/v); chemische Verschiebungen wurden auf Acetonitril (2.000 ppm) referenziert

**Tab. 19:** Beobachtete Cross-Peaks im 2D WET NOESY-Spektrum

Metabolit	Cross-Peaks						
	H <sub>3</sub> -33/H-19	H <sub>3</sub> -31/H-16	H <sub>3</sub> -23/H-6	H <sub>3</sub> -21/H-3	H-1'/H-16	H-1'/H-3'	H-1'/H-5'
M9	x	-	x	x	x	x	x
M5	x	-	x	x	x	x	x
M2	x	-	-	-	x	x	x

#### 4.1.3.2.1. Diskussion der MS- und <sup>1</sup>H NMR-Daten der Fraktion 1A-1

Zunächst wurde Fraktion 1A-1 (siehe Kapitel 3) chromatographiert. Der Hauptpeak bei 11.4 min (M2) wurde im MS- und NMR-Spektrometer vermessen. Bei den MS-Spektren (Tab. 17) wurden zur Strukturaufklärung die Spektren nach D/H-Rücktausch herangezogen. Die MS-Spektren, die in AcCN/D<sub>2</sub>O aufgenommen wurden, wurden nur herangezogen, sofern sie weitere Strukturinformationen lieferten.

Im Full-Scan-MS-Spektrum tritt das Quasimolekülion mit [M+H]<sup>+</sup> = 453 (459 vor D/H-Rücktausch) sehr intensiv auf. Die Abspaltung von 176 amu (Glucuronsäure-H<sub>2</sub>O) von [M+H]<sup>+</sup> = 453 führt zu m/z = 277 im MS<sup>2</sup>-Modus und weist auf das Vorliegen eines Glucuronids hin. Die Massendifferenz zum Verapamil von 178 amu deutet auf eine Ab-

spaltung der Phenylalkylseitenkette mit zusätzlicher Demethylierung hin. Durch weitere Fragmentierung des Fragmentationenpeaks mit  $m/z = 277$  im  $MS^3$ -Modus werden die Fragmentationen mit  $m/z = 246$  und  $m/z = 234$  gebildet. Das Fragmentation mit  $m/z = 246$  kann entweder durch Abspaltung von Methylamin oder einer Methoxygruppe aus dem unkonjugierten Metaboliten erzeugt werden. Da in  $AcCN/D_2O$  das Fragmentation mit  $m/z = 247$  (entstanden durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer) gebildet wird, beweist dies die Abspaltung von Methylamin aus dem unkonjugierten Aglykon, da bei einer Abspaltung einer Methoxygruppe das Fragmentation mit  $m/z = 249$  hätte gebildet werden müssen. Die weitere Abspaltung der Isopropylgruppe vom Ion mit  $m/z = 277$  führt zum Fragmentation mit  $m/z = 234$ .

Die Abspaltung von Methylamin beweist, daß die Demethylierung nicht am Stickstoff, sondern an einer der beiden Methoxygruppen am Ring B stattgefunden haben muß. Die Anzahl der austauschbaren Protonen im Molekül wurde durch D/H Rücktausch bestimmt. M2-I und M2-II konnten jeweils 5 austauschbare Protonen zugeordnet werden, was darauf hinweist, daß neben den aciden Glucuronsäureprotonen (4 austauschbare Protonen) noch ein weiteres austauschbares Proton im Molekül vorhanden sein muß (Tab. 18). Diese Befunde werden durch die  $^1H$  NMR-Daten unterstützt.

Im  $^1H$  NMR-Spektrum beobachtet man einen doppelten Signalsatz mit einem Intensitätsverhältnis von ca. 2:1 (M2-I: M2-II), was auf zwei sehr ähnliche Substanzen hindeutet, die im MS-Spektrum aufgrund ihres identischen Fragmentierungsmusters nicht unterscheidbar sind (Abb. 53).

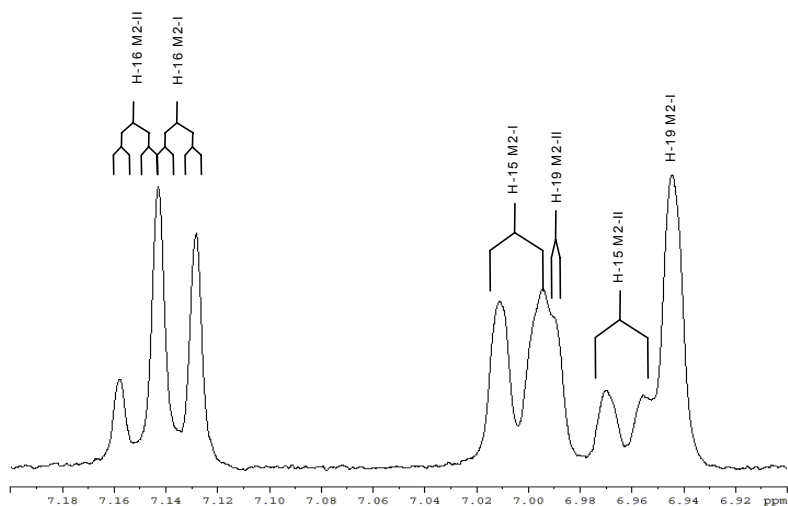
Die chemischen Verschiebungen der Signale der Metaboliten M2-I und M2-II unterscheiden sich nur gering von denen, die bei der offline  $^1H$  NMR aufgenommen wurden (4.1.3.1.1). Im aromatischen Bereich beobachtet man eine starke Überlappung der Signale (Abb. 53). Das Fehlen der Protonensignale von H-2, H-3 und H-6 weist auf die Abspaltung der Phenylalkylseitenkette hin. Bei 5.040 ppm (M2-I) und 5.030 ppm (M2-II) beobachtet man zwei teilweise überlagerte Dubletts, die von dem anomeren Proton des Glucuronsäurerestes in beiden Isomeren stammen (Abb. 54).

Die N-Methylgruppensignale überlagern sich für beide Isomeren bei 2.524 ppm (Abb. 56) und unterstützen den massenspektrometrischen Befund, daß keine N-Demethylierung stattgefunden hat. Bei 3.837 und 3.848 ppm beobachtet man das Singulett einer Methoxygruppe für beide Isomeren (Abb. 55).

Im 2D WET NOESY-Spektrum beobachtet man bei beiden Isomeren keine Cross-Peaks

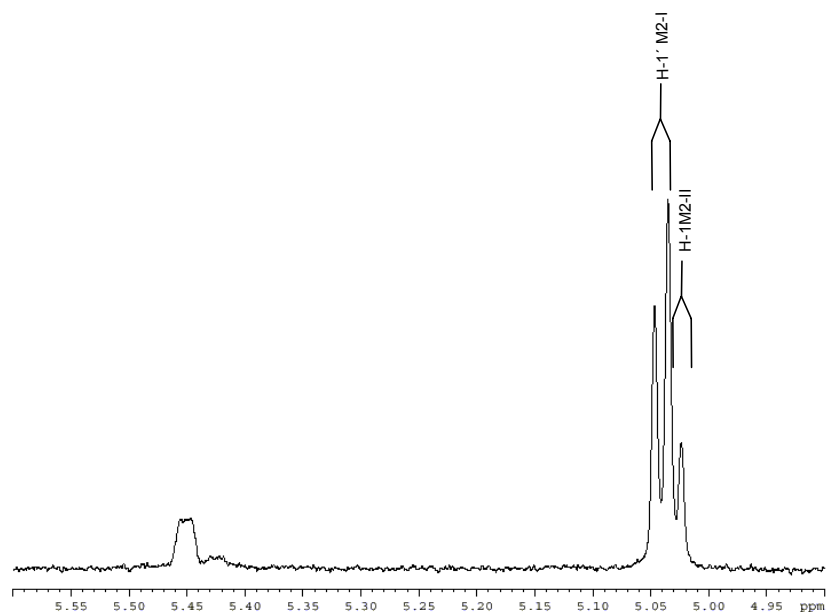
von einer Methoxygruppe zum aromatischen Proton H-16, dafür aber einen vom anomeren Proton H-1' zum Proton H-16 (Abb. 57). Für die Strukturen bedeutet dies, daß die Methoxygruppe von beiden Isomeren an Position C-17 demethyliert und die Hydroxylgruppe in der Folge glucuronidiert wurde.

**Abb. 53:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen, die Metakopplungen sind teilweise nicht aufgelöst)

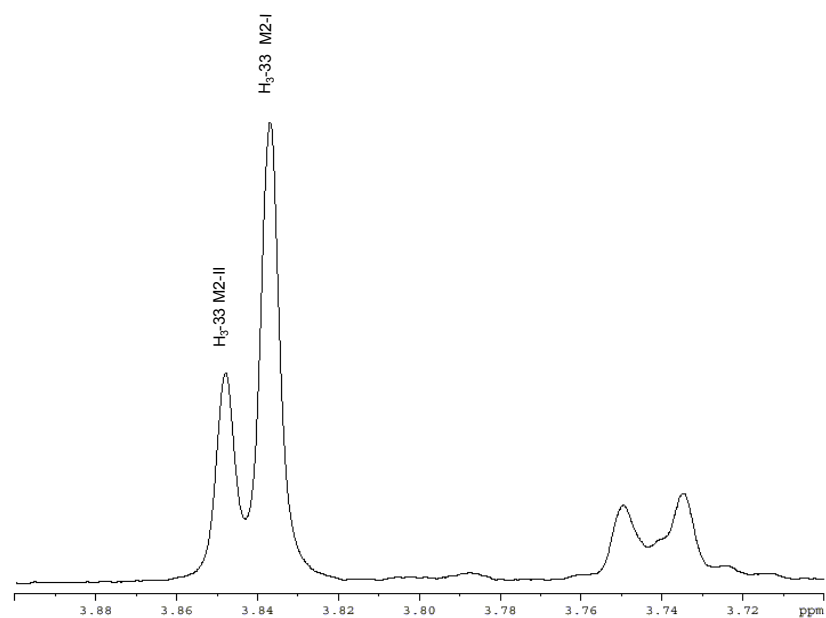




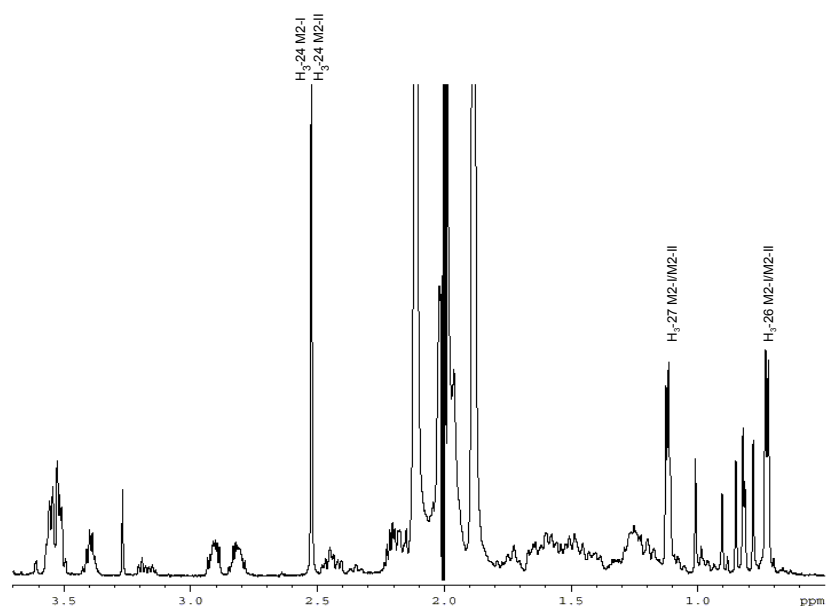
**Abb. 54:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)



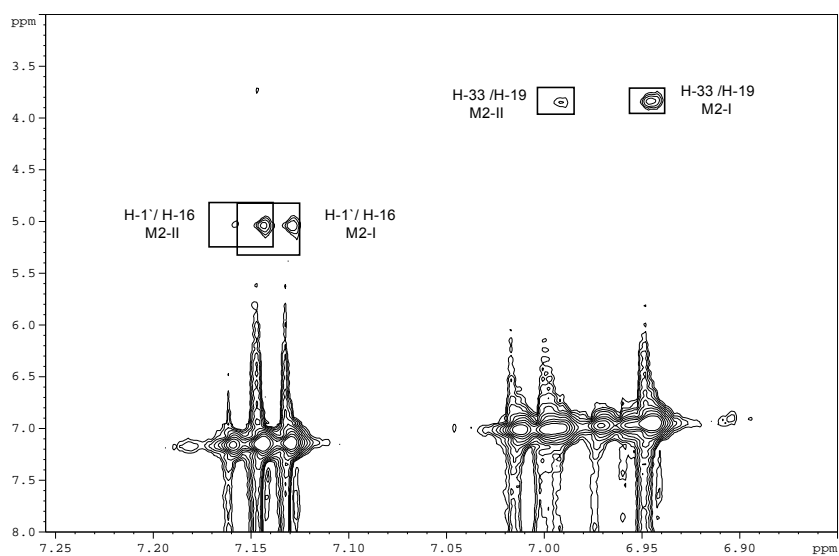
**Abb. 55:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)



**Abb. 56:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M2-I und M2-II (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)



**Abb. 57:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR 2D WET NOESY-Teilspektrum



detektierte Cross-Peaks im 2D WET NOESY-Spektrum zwischen den Protonen der Methoxygruppen und den aromatischen Protonen sowie zwischen dem anomeren Proton H-1' und dem aromatischen Proton H-16

#### 4.1.3.2.2. Diskussion der MS- und <sup>1</sup>H NMR-Daten der Fraktion 1A-2

Die Fraktion 1A-2 wurde chromatographiert und der Peak bei 32.8 min im MS- und <sup>1</sup>H NMR vermessen. Er enthielt die Metaboliten M5-I und M9.

Im Full-Scan-MS-Spektrum treten zwei Signale sehr intensiv auf, zum einen das Quasimolekülion mit  $[M+H]^+ = 617$  (bzw.  $[M+D]^+ = 622$  vor D/H-Rücktausch) beim Metaboliten M9 und  $[M+H]^+ = 603$  (bzw.  $[M+D]^+ = 609$  vor D/H-Rücktausch) bei dem Metaboliten M5. Der Verlust von 176 amu (bzw. 179 amu) im MS<sup>2</sup>-Spektrum führt zu  $m/z = 441$  (M9) bzw.  $m/z = 427$  (M5) und weist auf das Vorliegen eines Glucuronidkonjugats hin. Die Differenz von 14 amu ( $m/z = 441$ ) bzw. 28 amu ( $m/z = 427$ ) zum Quasimolekülion des Verapamils mit  $[M+H]^+ = 455$  deutet bei M9 auf eine oxidative Abspaltung einer Methylgruppe und bei M5 auf eine zweite zusätzliche Demethylierung im Molekül. Die Fragmentierung von  $m/z = 441$  im MS<sup>3</sup>-Modus führt beim Metaboliten M9 zu den Ionen mit  $m/z = 289$  und 165. Das Ion mit  $m/z = 165$  wird durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte des Stickstoffs gebildet und schließt eine Demethylierung des Rings A aus. Das Ion mit  $m/z = 289$  wurde durch  $\alpha$ -Spaltung (mit Protonentransfer) auf der niedersubstituierten Hälfte gebildet und indiziert eine Demethylierung am Ring B oder am Stickstoff. Durch Abspaltung der Isopropylgruppe vom Ion mit  $m/z = 289$  im MS<sup>4</sup>-Modus wird das Ion mit  $m/z = 246$  gebildet. Fragmentierung des Metaboliten M5 im MS<sup>3</sup>-Modus führt zu den Fragmentationen mit  $m/z = 165$ ,  $m/z = 275$  und  $m/z = 384$ . Das Ion mit  $m/z = 165$  wurde durch N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte des Stickstoffs gebildet und schließt eine Demethylierung des Rings A aus. Eine  $\alpha$ -Spaltung (mit Protonentransfer) auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 275$ , was auf eine doppelte Demethylierung hinweist. Die Abspaltung der Isopropylgruppe führt zum Ion mit  $m/z = 384$ .

Die Anzahl der austauschbaren Protonen wurde durch D/H-Rücktausch bestimmt. M5-I konnten 5 und M9 4 austauschbare Protonen zugeordnet werden, was darauf hinweist, daß bei M5-I neben den aciden Glucuronsäureprotonen (4 austauschbare Protonen) noch ein weiteres austauschbares Proton im Molekül vorhanden sein muß (Tab. 17). Eine Demethylierung des Stickstoffs und Bildung eines sekundären Amins ist somit wahrscheinlich. Diese Befunde werden durch die <sup>1</sup>H NMR-Daten unterstützt.

Das <sup>1</sup>H NMR-Spektrum weist einen doppelten Signalsatz (Abb. 58) im Verhältnis 70:30 (M9 zu M5-I) auf, was auf das Vorhandensein von zwei sehr ähnlichen Substanzen deutet. Im Bereich aromatischer Protonen beobachtet man eine starke Überlappung der

Signale (Abb. 58). Bei 4.992 ppm (M9) und 5.015 ppm (M5-I) beobachtet man zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 7.2 Hz, was typisch für das anomere Proton einer  $\beta$ -verknüpften Glucuronsäure ist (Abb. 59).

Für die Methoxygruppen findet man zwei sich überlappende Singulettts bei 3.769 ppm mit der anteiligen Intensität von 2 x 6 Protonen (Abb. 60) und bei 3.826 und 3.832 ppm zwei sich überlappende Singulettts mit der anteiligen Intensität von drei Protonen.

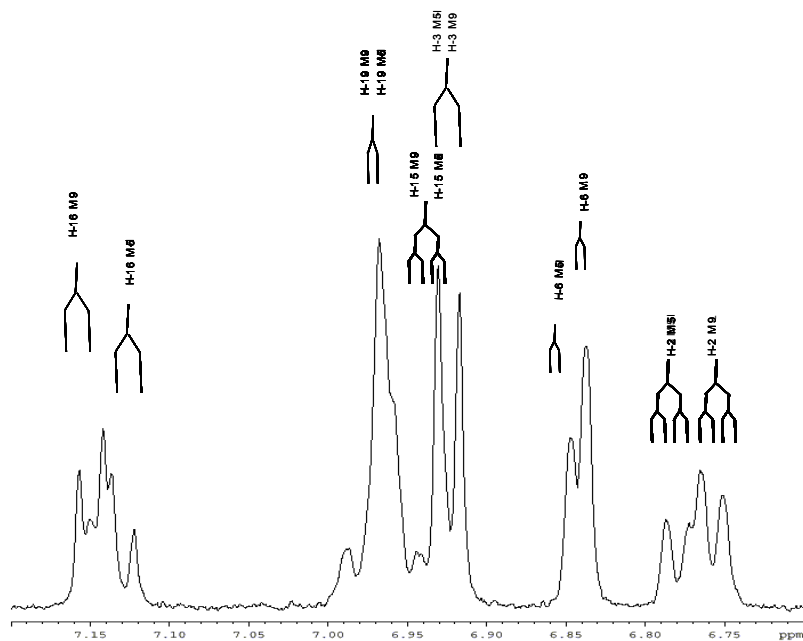
Bei 2.657 ppm findet man ein Singulett mit der Intensität von drei Protonen relativ zu den anderen Signalen des Hauptisomers (Abb. 61). Dieses Signal wurde daher der N-Methylgruppe von M9 zugeordnet. M5 muß daher am Stickstoff demethyliert worden sein.

Im 2D WET NOESY-Spektrum lassen sich die Methoxygruppen eindeutig zuordnen (Abb. 62). So findet man am Ring A Cross-Peaks von den Methoxyprotonen bei 3.769 ppm zu H-6 und zu H-3. Hier überlagern sich offenbar die Methoxyprotonen H<sub>3</sub>-21 und H<sub>3</sub>-23 der beiden koeluisierenden Metaboliten.

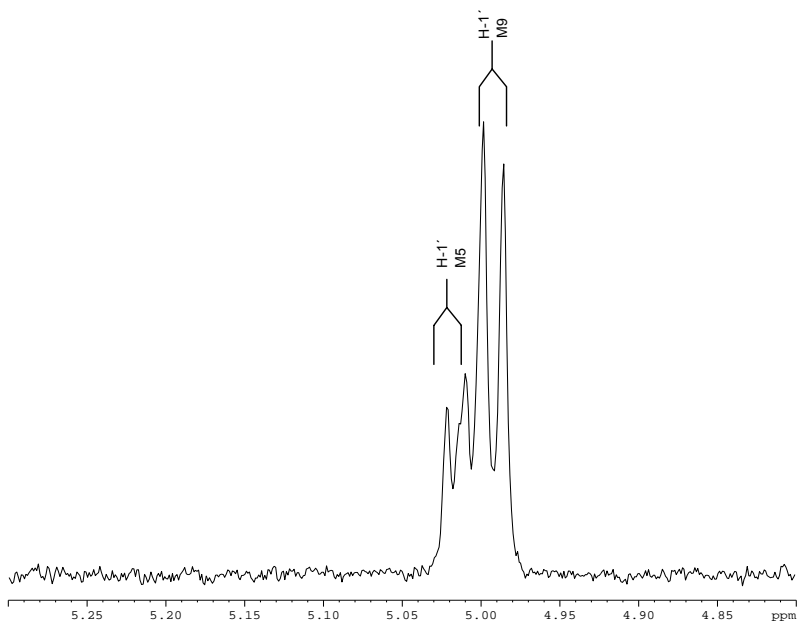
Von einer Methoxygruppe zu dem aromatischen Proton H-16 ist kein Cross-Peak zu sehen, allerdings zwischen dem anomeren Proton H-1' und H-16 und von der Methoxygruppe bei 3.830 ppm zu H-19 (Singulettts sind im 2D WET NOESY-Spektrum nicht mehr aufgelöst, vergleiche Abb. 62). Dies sind die Methoxyprotonen H<sub>3</sub>-33 der Metaboliten M9 und M5-I.

Faßt man alle Daten zusammen, kommt man zu dem Schluß, daß bei beiden Metaboliten (M9 und M5-I) die Methoxygruppe an C-17 demethyliert und anschließend die freie Hydroxylgruppe mit Glucuronsäure konjugiert wurde. Bei dem Metaboliten M5-I hat zusätzlich eine Demethylierung am Stickstoff stattgefunden. In den <sup>1</sup>H NMR-Spektren treten auch Signale auf, die nicht eindeutig zugeordnet werden können (siehe Abb. 58). Wahrscheinlich stammen sie von Diastereomeren der Metaboliten (M5-II). Die Ergebnisse der HPLC-NMR-Untersuchungen stimmen mit den offline <sup>1</sup>H NMR Untersuchungen überein.

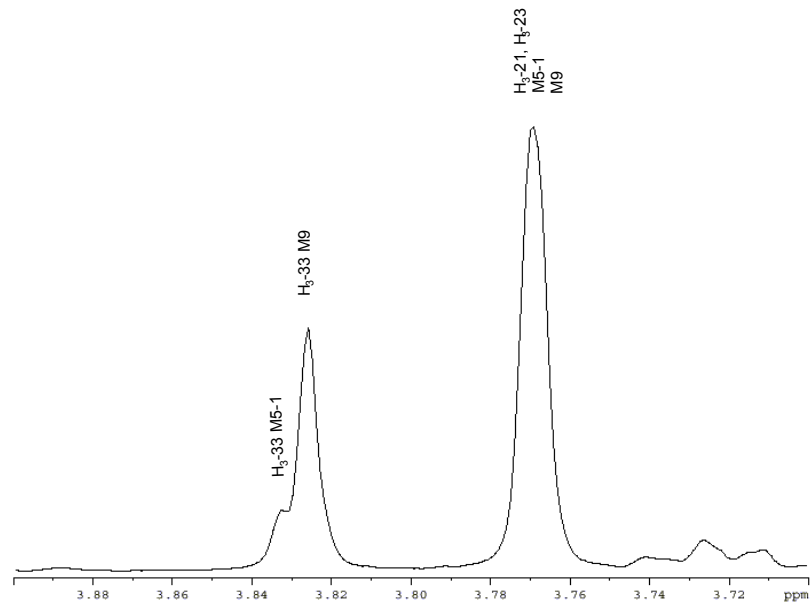
**Abb. 58:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen)



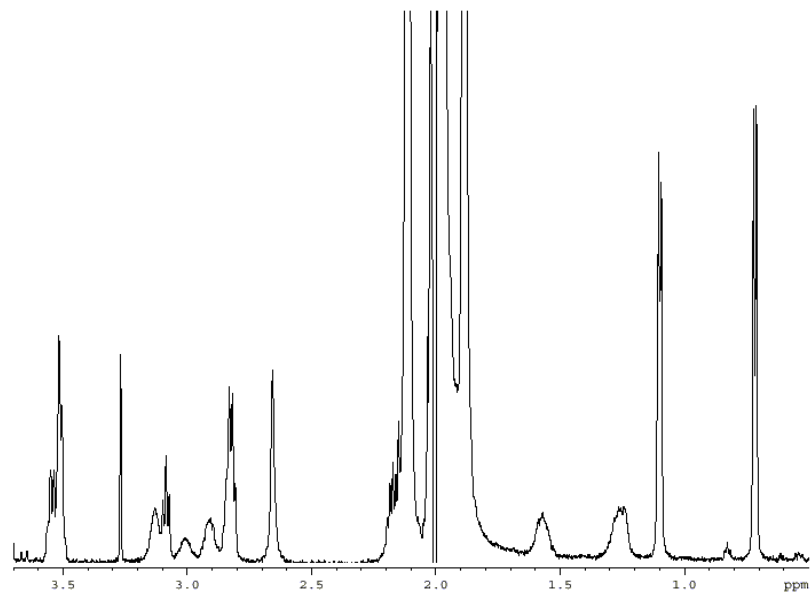
**Abb. 59:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich des anomeren Protons der Glucuronsäure)



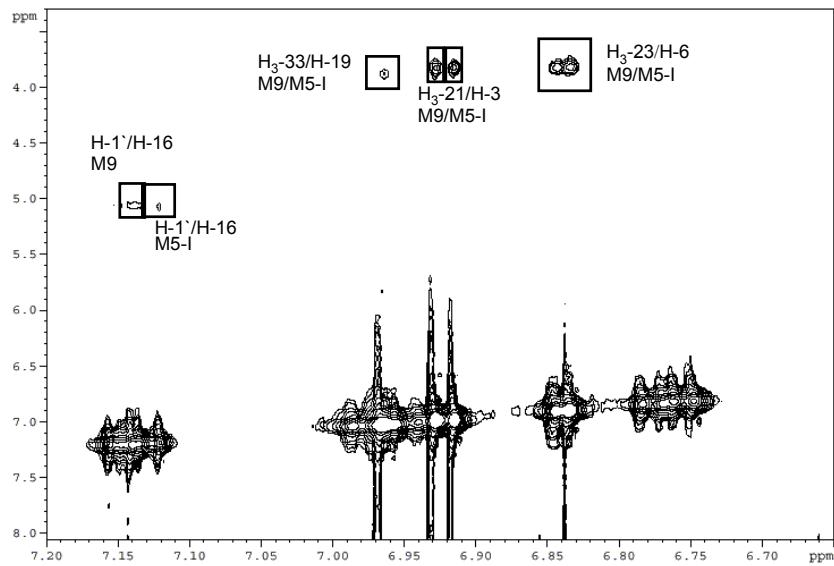
**Abb. 60:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der Methoxygruppenprotonen)



**Abb. 61:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Teilspektrum der Metaboliten M9 und M5-I (Verschiebungsbereich der aliphatischen Protonen)



**Abb. 62:** 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR 2D WET NOESY-Teilspektrum



detektierte Cross-Peaks im 2D WET NOESY-Teilspektrum zwischen den Protonen der Methoxygruppen und den aromatischen Protonen sowie zwischen dem anomeren Proton H-1' und dem aromatischen Proton.

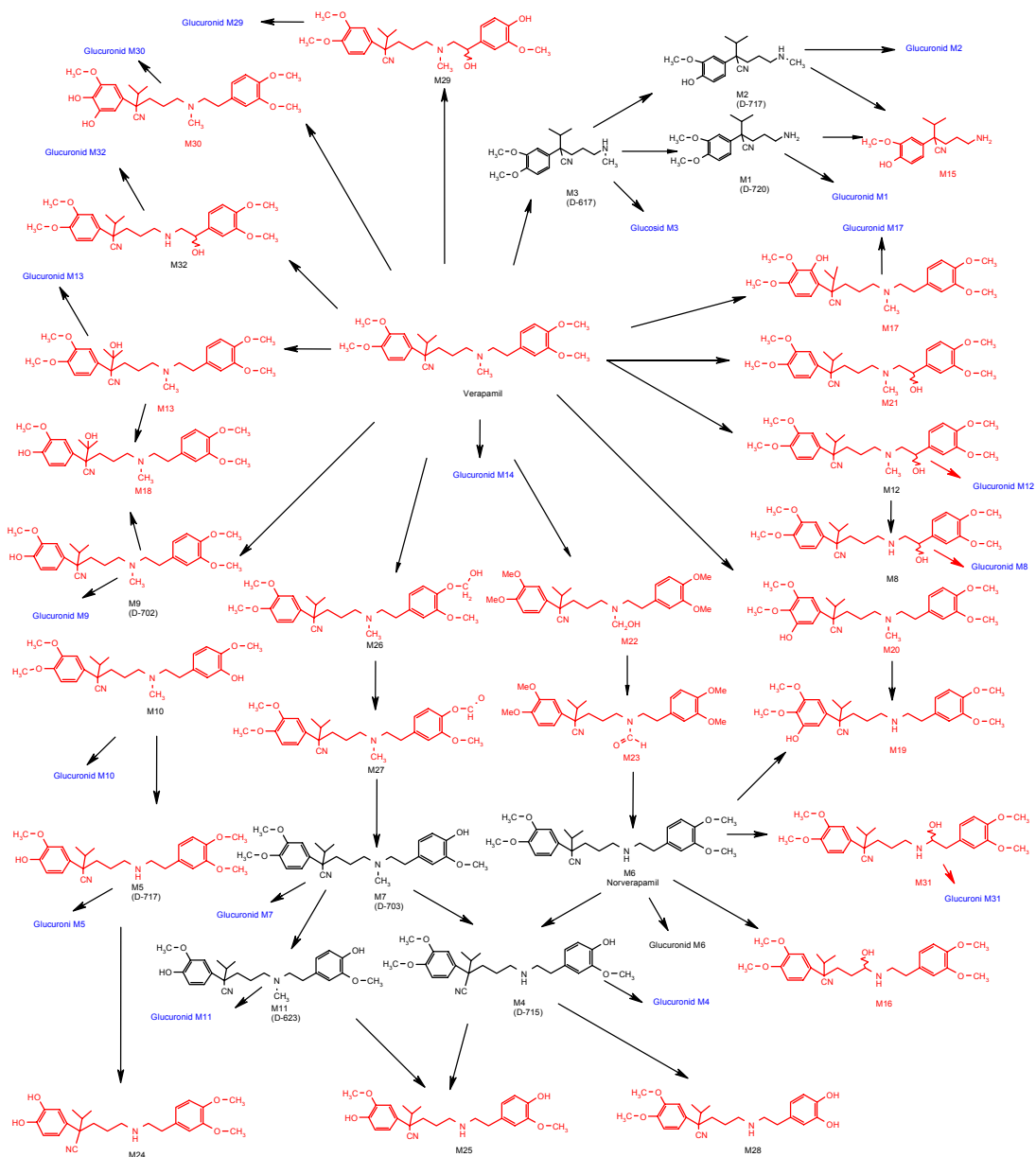
#### 4.1.3.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den HPLC-NMR-Messungen

Die  $^1\text{H}$  NMR- und MS-Daten sind im Einklang mit den in Abb. 37 dargestellten Strukturen. Insgesamt konnten so die Strukturen der Phase-II-Metaboliten M2-I, M2-II, M5-I und M9 bestimmt werden. Bei allen Metaboliten wird die Methoxygruppe an C-17 demethyliert und die freistehende Hydroxygruppe in der Folge mit Glucuronsäure konjugiert. Eine O-Glucuronidierung scheint somit gegenüber der N-Glucuronidierung im Falle von zwei konkurrierenden Bindungsstellen zumindest bei Konjugationsreaktionen im menschlichen Organismus bevorzugt zu sein. Desweiteren scheint die O-Demethylierung mit anschließender Glucuronidierung im menschlichen Organismus bevorzugt an Ring B stattzufinden.

### 4.1.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Strukturaufklärung

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie zur eindeutigen Identifizierung von Strukturisomeren unbedingt notwendig ist und daß die HPLC-NMR-Kopplung mit der Massenspektroskopie zusammen eine effektive Methode zur schnellen Charakterisierung von Arzneistoffmetaboliten, die in höheren Konzentrationen gebildet werden, geeignet ist. Insgesamt konnten so die Strukturen von 32 Metaboliten bestimmt werden, die in Abb. 63 dargestellt sind.

**Abb. 63:** Vorgeschlagendes Metabolismusschema für Verapamil



schwarzmarkierte Verbindungen: schon identifizierte Metaboliten (Knoll-Nomenklatur in Klammern), rotmarkierte Verbindungen: neu identifizierte Phase-I-Metaboliten, blaumarkierte Verbindungen: neu identifizierte Phase-II-Konjugate



Von den 31 Phase-I-Metaboliten wurden die Phase-I-Metaboliten M1-M7, M9-M11, M13 und M14 schon vorher identifiziert, die Metaboliten M8, M12, M15-M32 wurden zum ersten Mal beschrieben. Neben den Phase-I-Metaboliten wurden 18 Phase-II-Metaboliten (M1-M14, M29-M32) identifiziert, von denen keiner zuvor direkt beschrieben wurde, das Glucuronid des Metaboliten M6 wurde allerdings zuvor schon gefunden (siehe Kapitel 1).

#### **4.2. Gewebespezifischer Metabolismus des Verapamils<sup>5</sup>**

Da der Metabolismus eines Arzneistoffes für unterschiedliche Spezies variieren kann und die Metaboliten je nach Eliminationsweg in unterschiedlichen Matrices auftreten können, wurde er für die Spezies Ratte, Mensch, Schwein und Affe untersucht. Aus der Ratte wurde der Metabolismus in primären Hepatozytenkulturen und Lebermikrosomen, in alveolarepithelialen Typ II-Zellen, mikrosomalen Membranen und Gewebe der Lunge, sowie im Plasma nach intravenöser und inhalativer Applikation bestimmt. Außerdem wurde der Metabolismus in Zellkulturüberständen calcium-toleranter adulter Kardiomyozyten und Herzmikrosomen untersucht.

Zur Untersuchung des Metabolismus im Menschen wurde die Zellkulturüberstände von primären humanen Hepatozytenkulturen, humane Herzmikrosomen, die aus OP-Resektaten gewonnen wurden, und humaner Urin nach oraler Einnahme eines verapamilhaltigen Arzneimittels auf gebildete Metaboliten hin analysiert. Zur Untersuchung des Metabolismus im Endothelgewebe wurden die Zellkulturüberstände aus HCAECs (**H**uman **c**oronary **a**rterial **e**ndothelial **c**ells) nach Inkubation mit Verapamil analysiert. Beim Schwein wurden Zellkulturüberstände alveolarepithelialer Typ II-Zellen und mikrosomale Membranen der Lunge, sowie Plasma nach intravenöser und inhalativer Applikation, für die Metabolismusstudien eingesetzt. Beim Affen wurde das Plasma nach intravenöser und inhalativer Applikation des Verapamils auf Metaboliten hin analysiert. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in Tab. 16 dargestellt.

---

<sup>5</sup> Für die experimentellen Angaben zu den Kultur- und Isolationsbedingungen siehe [13, 142, 144, 145, 152]





#### 4.2.1. Metabolismus in der Ratte

##### 4.2.1.1. Metabolismus in primären Rattenhepatozytenkulturen

Der Metabolismus des Verapamils wurde zuerst in Zellkulturüberständen von Rattenhepatozyten untersucht. Aus einem Pool (30 ml) aus den Zellkulturüberständen konnten 25 Phase-I-Metaboliten und 11 Phase-II Metaboliten identifiziert werden.

Von den Phase-I-Metaboliten wurden die O-Demethylverapamil-Metaboliten M7 (230 %<sup>6</sup>), M9 und M10 (230 %) gefolgt von den N,O-demethylierten Metaboliten M4 (200 %) und M5 (200 %), dem Norverapamil M6 (180 %), sowie dem Dealkylverapamil M3 (122 %), gebildet. Das O,O-Demethylverapamil M11 (12 %) und der hydroxylierte- und demethylierte Metabolit M12 (3 %) wurden in deutlich geringeren Konzentrationen gebildet. Die Metaboliten M12 und M13-M25 wurden erstmals identifiziert und traten in nur geringen Konzentrationen (ca. 1 %) auf. 14 der Phase-I-Metaboliten traten auch als Phase-II-Konjugat auf (10 O-gebundene und 4 N-gebundene Konjugate). Zu den N-gebundenen Konjugaten zählt das sekundäre Aminoglucuronid M1, das tertiäre Aminoglucuronid des Norverapamils M6, das quartäre Ammoniumglucuronid des Verapamils M14 und ein N-Glucosid des Dealkylverapamils M3. Das Norverapamil-Glucuronid wurde aus einem separaten Pool aus Zellkulturüberständen von primären Rattenhepatozyten nachgewiesen.

Bei den anderen Glucuroniden handelte es sich um O-Glucuronide. Nicht alle Phase-I-Metaboliten wurden auch als Phase-II-Konjugate detektiert. Da die Ionisierungsausbeute bei der Ionisierung der Glucuronsäurekonjugate im Positiv-ESI wesentlich geringer ist als die der Phase-I-Konjugate sind die Nachweisgrenzen der Phase-II-Konjugate im Vergleich zu den Phase-I-Metaboliten wesentlich höher.

Der enantioselektive Phase-I-Metabolismus des Verapamils ist bereits gut erforscht (siehe Kapitel 1). Über die Selektivität der Konjugationsreaktionen mit Glucuronsäure ist allerdings noch nichts bekannt. Deshalb wurden Inkubationen mit den reinen Enantiomeren des Verapamils vorgenommen. Mit Ausnahme von M9 und M19 wurde bevorzugt das S-Enantiomer in der Phase-I-Reaktion metabolisiert und auch in der Folge mit Glucuronsäure konjugiert. In den Lebermikrosomenlösungen der Ratte wurden deutlich weniger Metaboliten detektiert als in der Zellkultur. Als Hauptmetabolit trat das Norverapamil M6 (90 %), gefolgt von dem dealkylierten Metaboliten M2 (10 %) auf. Die Konzentration der anderen Metaboliten war zu gering

---

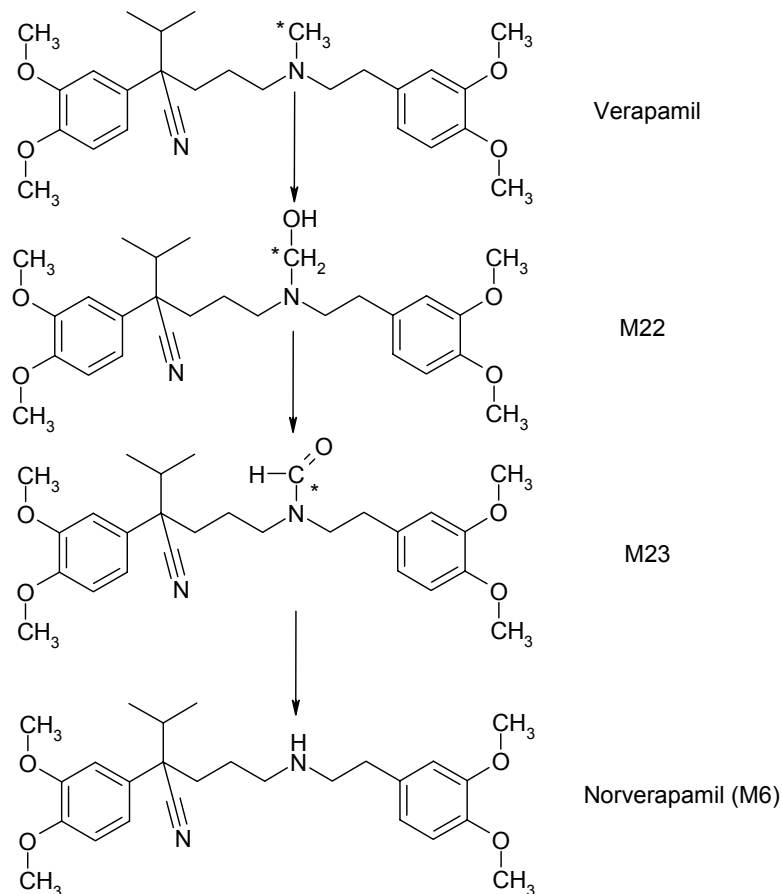
<sup>6</sup> Peakflächenverhältnis vom Metaboliten zu Verapamil

für eine Quantifizierung.

#### **4.2.1.2. Herz**

Thum und Borlak haben gezeigt, daß im Rattenherzen CYP-Isoformen exprimiert werden und daß das Herz prinzipiell zum Metabolismus von Arzneistoffen befähigt ist [142, 143]. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden, inwieweit primäre adulte Kardiomyozyten zum Metabolismus eines Calciumantagonisten, wie Verapamil, befähigt sind. Zur Untersuchung des Metabolismus im Herzen wurden Zellkulturen aus primären adulten calciumtoleranten Kardiomyozyten der Ratte mit dem Wirkstoff inkubiert. Verapamil wurde im Vergleich zu den Rattenhepatozytenkulturen deutlich vermindert metabolisiert. Die Konzentrationen der gebildeten Metaboliten (die mit den Peakflächen korrelieren) lagen im Vergleich zu den Zellkulturüberständen aus den Rattenhepatozytenkulturen zwischen 1 und 10 % relativ zu Verapamil. Insgesamt konnten acht Metaboliten identifiziert werden: als Hauptmetaboliten wurden das Norverapamil (5 %), die O-Demethylverapamilisomeren M7 (3 %) und M9 (3 %) und das Dealkylverapamil M3 gebildet. Der neu identifizierte Metabolit M12 (0.8 %) konnte ebenfalls detektiert werden. Daneben wurden das Halbacetal M26 (0.12 %) und das Formiat M27 (1.2 %) sowie das Carbinolamin M22 (0.08 %) und N-Formylamin M23 (0.08 %) nachgewiesen. Das Formiat und das Halbacetal wurden in keiner anderen Matrix (bis auf die Herzmikrosomenlösungen) detektiert. Da die Formylamin-Strukturen in vorhergegangenen Publikationen als Artefakte identifiziert wurden [68, 69], sind zur Absicherung Inkubationen mit einer markierten Substanz (<sup>13</sup>C-Markierung in N-Methylgruppe) durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, daß das Formylamin aus dem Verapamil gebildet wurde und nicht durch Reaktion von CO oder CO<sub>2</sub> mit Norverapamil entstanden ist. Aufgrund dieser Markierungsexperimente konnte ein allgemeines Schema für den Mechanismus der N-Demethylierung des Verapamils erstellt werden (Abb. 64).

**Abb. 64:** Mechanismus der N-Demethylierung von Verapamil



Aus den Herzmikrosomenlösungen der Ratte (30 ml Pool von überwiegend rechtsventrikulären Mikrosomen) konnten die gleichen Metaboliten, jedoch in zehnfach geringerer Konzentration als in den Zellkulturüberständen der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Es wurde auch der Metabolismus in den unterschiedlichen Herzkompartmenten (rechter Ventrikel, rechtes Atrium, linker Ventrikel, linkes Atrium und Septum) untersucht. Primär konnten in den einzelnen Kompartimenten nur das Norverapamil M6 und vereinzelt der Metabolit M22 und das Dealkylverapamil M3 detektiert werden. In Einzelfällen wurden im rechten Ventrikel deutlich höhere Metabolitenkonzentrationen detektiert als im linken, was mit den CYP-Expressionsstudien von Thum und Borlak korreliert [143].

Aus dem Herzgewebe von Ratten konnten nur das Norverapamil M6 (123 %) und die Metabolite M7 und M9 (zusammen 13 %) detektiert werden.

#### **4.2.1.3. Lunge**

In den Zellkulturüberständen alveolarepithelialer Typ II-Zellen wurden der dealkylierte Metabolit M2 (2 %) und das Norverapamil M6 (2 %) sowie dessen Oxidationsvorläufer M22 (1 %) identifiziert.

Aus dem Lungengewebe konnten nach intravenöser Applikation das Norverapamil M6 (3 %), das Dealkylverapamil M3 (1 %) und die O-Demethylverapamillsomeren M7 und M9 (< 1 %) detektiert werden.

Nach inhalativer Applikation konnte aus dem Lungengewebe nur das Dealkylverapamil M3 (1 %) nachgewiesen werden.

Im Plasma konnte nach intravenöser Applikation das Norverapamil M6 (10 %) und die beiden O-Demethylverapamillsomeren (M7 und M9, < 1 %) identifiziert werden, während nach inhalativer Applikation kein Metabolit in nachweisbaren Konzentrationen detektiert wurde.

Verapamil wurde in der Lunge im Vergleich zu den Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten nur vermindert metabolisiert. Da auch für die Metabolismusstudien im Zellmaterial der Lunge deutlich weniger Volumen an Zellkulturüberstand gepoolt werden konnte, war auch die Gesamtkonzentration der Metaboliten teilweise geringer. Es ist nicht auszuschließen, daß einige Metaboliten aufgrund der Nachweisempfindlichkeit nicht detektiert werden konnten.

#### **4.2.2. Metabolismus im Mensch**

##### **4.2.2.1. Primäre Hepatozytenkulturen**

In den Zellkulturüberständen von humanen Hepatozyten traten das Norverapamil M6 (30 %) und das Dealkylverapamil M3 (29 %) als Hauptmetaboliten auf. Die Metaboliten M1, M2, M4, M7 und M9 wurden als Glucuronidkonjugate detektiert. Die Konzentrationen der Phase-I-Analoga (1 %) waren im Vergleich zum Verapamil relativ gering. Der Phase-I-Metabolit M22 konnte in geringen Konzentrationen detektiert werden.

Aus den Mikrosomenlösungen konnten die Phase-I-Metaboliten M6 (18 %), M3 (3 %), M7 und M9 (jeweils 3 %) nachgewiesen werden.

#### **4.2.2.2. Urin**

Aus dem humanen Urin konnten 24 Phase-I-Metaboliten identifiziert werden. Als Hauptmetabolit wurde im humanen Urin das Dealkylverapamil M3 (322 %), die O-Demethylverapamile M7 (234 %) M9 und M10 (zusammen 234 %) und das Norverapamil M6 (200 %) gebildet. Danach folgten die Metaboliten M4 und M5 (zusammen 196 %) Mit sehr viel geringerer Intensität wurden die Metaboliten M1 (8 %), M2 (9.5 %), M11 (12 %) und M12 (1.4 %) gefunden. Die Metaboliten M13, M21, M22, M23, M25, M28-M32 wurden in geringer Intensität (ca. 1 %) detektiert. Von diesen 23 Metaboliten traten M1, M2, M4, M5, M7-M13 und M29-M32 auch als Phase-II-Konjugate auf. Die Metaboliten M28-M32 und ihre Glucuronidkonjugate wurden erstmals im humanen Urin identifiziert, während die anderen Metaboliten und ihre Konjugate schon in Zellkulturüberständen von Rattenhepatozyten identifiziert worden waren.

#### **4.2.2.3. Herzmikrosomen**

Aus den humanen Herzmikrosomen konnten die gleichen Metaboliten wie aus Rattenmikrosomen (siehe Kapitel 4.2.1.2) nachgewiesen werden, allerdings in eine um eine Größenordnung<sup>7</sup> geringeren Konzentration.

#### **4.2.2.4. Endothelzellen**

In den Zellkulturüberständen aus HCAECs (Human coronary arterial endothelial cells) konnten 4 Metaboliten identifiziert werden: das Dealkylverapamil M3 (3 %) und das Norverapamil M6 (1 %) traten als Hauptmetaboliten auf, daneben wurden der dealkylierte Metabolit M2 und die O-demethylierten Metaboliten M7 und M9 in Spuren (< 0.2 %) gebildet.

#### **4.2.3. Metabolismus im Schwein**

Aus den Zellkulturüberständen alveolarepithelialer Typ II-Zellen der Lunge konnten der Metabolit M1 (5 %) und M6 (8 %) in geringer Menge nachgewiesen werden. Aus den Lösungen der mikrosomalen Membranen konnten M1 (0.1 %), M3 (7 %), M6 (2 %), M7 und M9 (zusammen 0.4 %) nachgewiesen werden.

Aus dem Plasma konnten nach intravenöser Applikation die Metaboliten M3 (3 %)

---

<sup>7</sup> Zehnerpotenzen



und M6 (5 %) detektiert werden, während die Metaboliten M22 ( $\ll 1$  %) und M23 ( $\ll 1$  %) nur in Spuren nachgewiesen werden konnten.

#### **4.2.4. Metabolismus im Affen**

Aus dem Affenplasma konnten nach intravenöser Applikation nur die Metaboliten M3, M22, und M23 in geringen Intensitäten ( $< 1$  %) nachgewiesen werden, während nach inhalativer Applikation die gefundenen Mengen des Metabolit M6 (9 %) und des Metaboliten M22 (5 %) um eine Größenordnung höher sind. Der Metabolit M3 ( $< 2$  %) wurde ebenfalls nach inhalativer Applikation detektiert.

#### **4.2.5. Zusammenfassung des gewebe- und speziesspezifischen Metabolismus**

Im humanen Urin und in den Zellkulturüberständen der Rattenhepatozyten konnten zusammen 32 Metaboliten identifiziert werden, darunter 22 neue, bislang unbekannte Metaboliten. Als Hauptmetaboliten wurden sowohl in den Rattenhepatozyten als auch im humanen Urin sowohl die N- und O-demethylierten als auch die N-dealkylierten Metaboliten gebildet. Die anderen neu identifizierten hydroxylierten Metaboliten traten in vergleichsweise geringen Konzentrationen auf.

In den Zellkulturüberständen und Mikrosomenlösungen der Herzzellen konnten sowohl die Hauptmetaboliten M3, M6, M7 und M10 als auch die neu identifizierten Metaboliten M22, M23, M26, M27 (Oxidationsvorläufer) und M12 identifiziert werden. Die Oxidationsvorläufer erlauben Rückschlüsse auf den Mechanismus der N- und O-Demethylierung.

In den Endothelzellen konnten ebenfalls die dealkylierten Hauptmetaboliten des Verapamils nachgewiesen werden, was beweist, daß das Herz- und Gefäßsystem fähig ist, Arzneistoffe zu metabolisieren.

Aus dem Zellmaterial des Lungensystems der Ratte konnten ebenfalls vereinzelt Hauptmetaboliten des Verapamils identifiziert werden, die aber im Vergleich zum Lebermetabolismus in deutlich vermindeter Intensität (2-3 Größenordnungen) auftraten. Das Metabolitenspektrum im Plasma unterscheidet sich sowohl zwischen den Spezies (Ratte, Schwein, Affe) als auch zwischen den angewandten Applikationsformen (intravenös und inhalativ).

Die Speziesunterschiede werden in Kapitel 5 ausführlicher diskutiert.

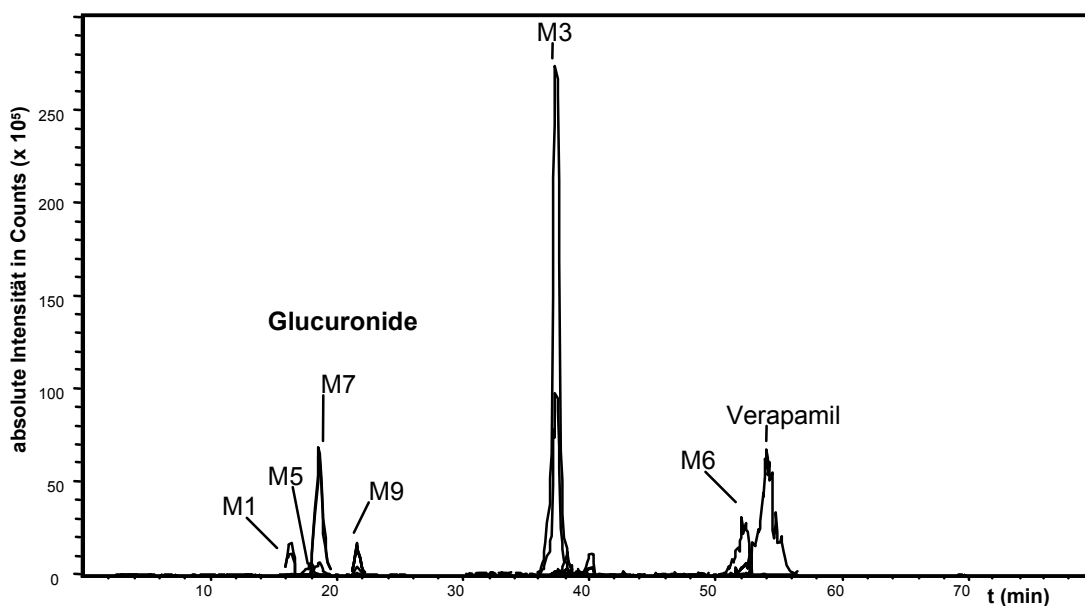
### 4.3. Pharmakokinetische Messungen

#### 4.3.1. Säulenschaltung mit der ADS-Vorsäule

Für die Aufnahme der Pharmakokinetiken und für die Untersuchung des Metabolismus in der Lunge wurde ein automatisiertes Verfahren entwickelt, das auf einer HPLC-integrierten Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einer RAM-Vorsäule beruht.

Mit dieser Methode sollten primär der Metabolismus des Verapamils in alveolarepithelialen Typ II-Zellen und mikrosomalen Membranen der Lunge sowie die Pharmakokinetik im Plasma bestimmt werden. Es sollte aber auch getestet werden, inwieweit die Methode zur Bestimmung von anderen Matrices wie Zellkulturüberständen von Rattenhepatozyten geeignet ist, weil hierfür bislang keine Applikation mit der ADS-Vorsäule entwickelt wurde. Hierzu wurden die Metaboliten aus dem Zellkulturüberstand auf der ADS-Vorsäule angereichert (4 x 500 µl). Mit der ADS-Vorsäule konnten aus den Zellkulturüberständen der Rattenhepatozyten sowohl die Hauptmetaboliten (Phase-I) als auch die Phase-II-Konjugate isoliert und chromatographiert werden. Das Ionenchromatogramm nach Extraktion von 2 ml Zellkulturüberstand von Rattenhepatozyten ist in Abb. 65 dargestellt. Aus den alveolarepithelialen Typ II-Zellen der Lunge konnten ebenfalls die Hauptmetaboliten isoliert und in ausreichender Intensität detektiert werden.

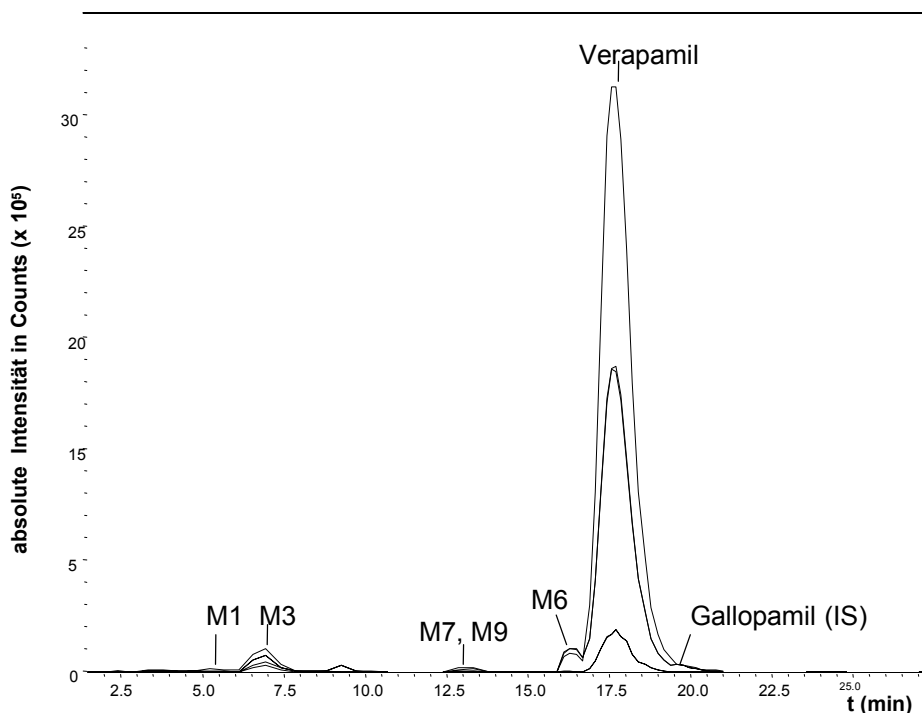
**Abb. 65:** Ionenchromatogramm nach Extraktion von 2 ml Zellkulturüberstand von Rattenhepatozyten mit Hilfe der ADS-Vorsäule



### 4.3.2. MSPD

In Kapitel 3 wurde die Entwicklung einer MSPD-Methode zur Untersuchung des Metabolismus im Lungengewebe beschrieben. Mit Hilfe der MSPD konnten neben Verapamil die wichtigsten Hauptmetaboliten M1, M3, M7, M10 und Norverapamil aus dem Lungengewebe der Ratte isoliert und mit ausreichender Intensität detektiert werden. In Abb. 66 ist ein Ionenchromatogramm (MS/MS) einer Gewebeprobe nach Extraktion mit der MSPD dargestellt.

**Abb. 66:** MS/MS-Ionenchromatogramm einer Lungengewebeprobe (Ratte) nach Extraktion mit der MSPD



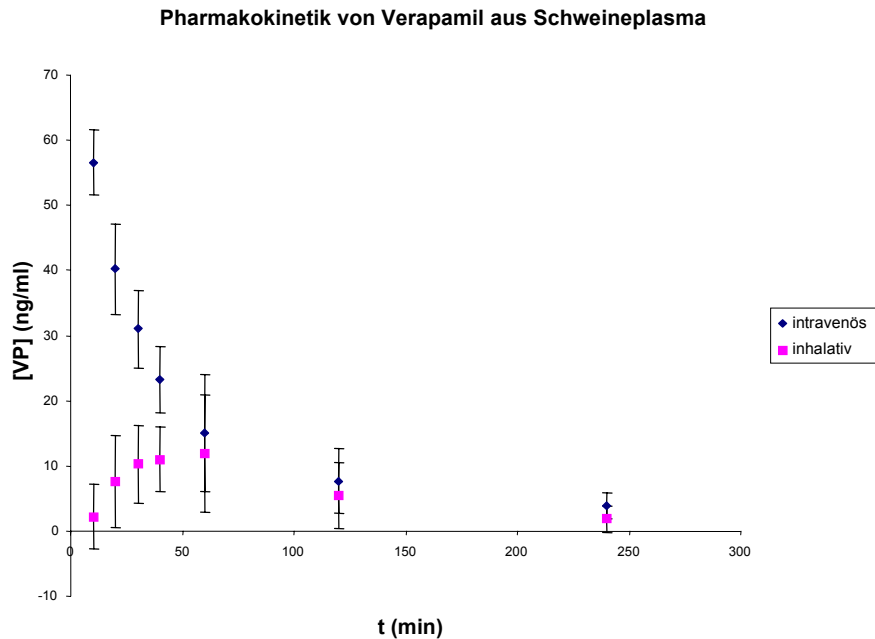
### 4.3.3. Präzision der Methoden

Die Standardabweichungen (< 10 %) der Verapamilkonzentrationen für die Pharmakokinetiken aus Rattenplasma (integrierte Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit ADS-Vorsäule) waren im Vergleich zu denen aus dem Schweineplasma (20-30 %), die mit SPE aufgearbeitet wurden, deutlich geringer. Die Präzision der ADS-Methode war im allgemeinen besser. Nach vielen Injektionen (>1000) nimmt die Präzision (30 %) der Methode mit der ADS-Vorsäule aber erheblich ab. Die Standardabweichungen nach Aufarbeitung mit der MSPD bleiben konstant bei 20 %.

#### 4.3.4. Pharmakokinetiken

Die Ergebnisse aus den Pharmakokinetikmessungen im Schweineplasma sind in Abb. 67 dargestellt.

**Abb. 67:** Pharmakokinetik von Verapamil in Schweineplasma nach inhalativer- und intravenöser Applikation



Die Kinetik nach intravenöser Applikation von Verapamil zeigen eine biexponentielle Clearance mit zwei charakteristischen Halbwertszeiten. Das Verhalten kann mathematisch durch ein zwei Kompartiment-Modell mit Clearance erster Ordnung beschrieben werden:

**Gleichung 13:** 
$$C_{Plasma} = \frac{D_{iv}}{V} (c_1 e^{-k_1 t} + c_2 e^{-k_2 t})$$

$D_{iv}$  beschreibt die intravenös applizierte Dosis (Ausgangsdosis: 5 mg, entspricht 0.5 mg/kg Körpergewicht des Minipig (10 kg)),  $V$  das Verteilungsvolumen,  $c_1$  und  $c_2$  sind die Verteilungskoeffizienten des Verapamils in den Kompartimenten 1 und 2 und  $k_1$  und  $k_2$  die Eliminationskonstanten aus den Kompartimenten 1 und 2. Nach Anpassen des Modells wurden für die einzelnen Parameter folgende Werte ermittelt:  $k_1 = 0.04 \text{ min}^{-1}$  und  $k_2 = 0.0083 \text{ min}^{-1}$ ,  $V = 1.42 \text{ l/kg}$ , und für  $c_1 = 0.74$  und  $c_2 = 0.26$ . Die Daten für den Affen und die Ratte waren vergleichbar.

Diese Daten lassen sich gut mit denjenigen nach intravenöser Applikation beim Menschen vergleichen [153]. Hamann und Mitarbeiter erzielten für  $k_1 = 0.022 \text{ min}^{-1}$

und  $k_2 = 0.001 \text{ min}^{-1}$ ,  $V = 1.7 \text{ l/kg}$  und  $c_1 = 0.76$  und  $c_2 = 0.24$ .

Während der Expositionsphase bei der inhalativen Applikation (die Schweine inhalierten eine 1 % ige wäßrige Verapamil-Lösung: Aerosolkonzentration  $50 \text{ mg/m}^3$ , aerodynamischer Tröpfchendurchmesser  $1.5 \mu\text{m}$ , Expositionszeit  $60 \text{ min}$  [152]) liefen die Invasion und die Clearance gleichzeitig ab, während nach Beendigung der Exposition (nach  $60 \text{ min}$ ) die Kinetik des Wirkstoffs nur noch durch die Plasmaclearance bestimmt wurde.

Durch Modellieren des Zwei-Kompartiment-Modells gelangt man zu Gleichung 14:

**Gleichung 14**

$$C_{Plasma} = \alpha \frac{w_{dep}}{V} \frac{\partial D_{inh}}{\partial t} \left[ \frac{c_1'}{k_1} (1 - e^{-k_1 t}) + \frac{c_2'}{k} (1 - e^{-k_2 t}) \right],$$

wobei  $w_{dep} \frac{\partial D_{inh}}{\partial t}$  [ $D_{inh} = 0.013 \text{ mg}/(\text{min kg})$ ] die Aufnahme­rate der applizierten Dosis bezeichnet. Nach 1 h Exposition wurde die totale inhalierte Dosis mit  $0.79 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht des Minipig berechnet.  $\alpha$  beschreibt die Transfereffizienz des aufgenommenen Wirkstoffs vom Epithel in das Blut.  $c_1'$  und  $c_2'$  sind die Verteilungskoeffizienten für die beiden unterschiedlichen Kompartimente nach inhalativer Applikation.

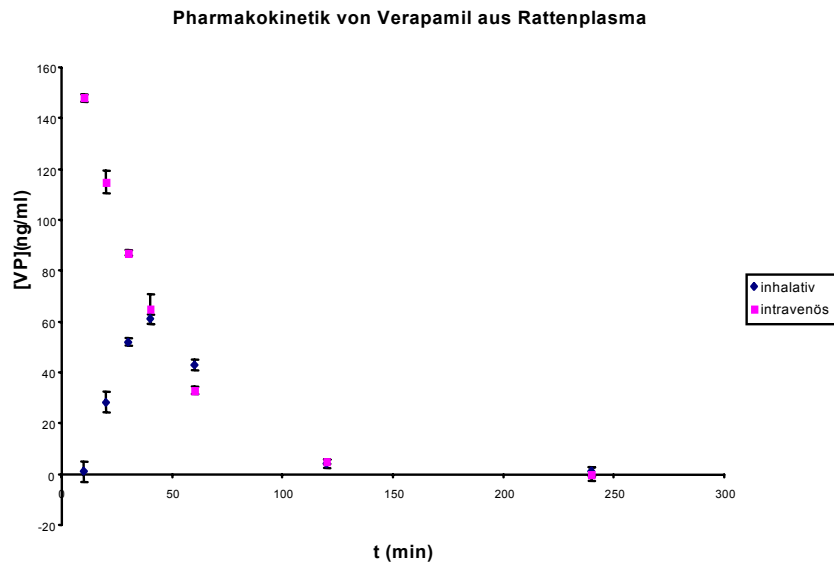
Für  $V$ ,  $k_1$  und  $k_2$  wurden die Daten aus den Messungen nach intravenöser Applikation verwendet. Die beste Übereinstimmung mit dem theoretischen Modell wurde für einen Verteilungskoeffizienten mit  $c_1 = 0.6$  und  $c_2 = 0.4$  sowie für einen  $\alpha w_{dep}$ -Wert von  $0.3$  erzielt. Für die Inhalationsexperimente mit dem Schwein wurde das Produkt aus Transfereffizienz und Abscheidungswahrscheinlichkeit ( $\alpha w_{dep}$ ) in der Lunge bestimmt. Für das Schwein gab es keine Vergleichsdaten für die Abscheidung von inhalierten Partikeln in den verschiedenen Regionen des Atmungstraktes. Grobe Abschätzungen können aber durch den Vergleich mit den existierenden Daten vom Affen und vom Hund getroffen werden. Der Wert für die totale (einschließlich der Teile des Atmungssystems außerhalb des Brustkorbs wie Luftröhre, Rachen und Nase) bzw. alveolare Abscheidungseffizienz von inhalierten Partikeln (einer Größe von  $1\text{-}2 \mu\text{m}$ ) lag im Hund bei Werten von  $0.5$  bzw.  $0.3$  und beim Affen bei Werten von  $0.6$  bzw.  $0.3$ . Diese Werte wurden benutzt, um den Wahrscheinlichkeitskoeffizienten  $w_{dep}$  für das Schwein vorherzusagen. Die Daten zeigen, daß das inhalierte Material

gleichmäßig über die verschiedenen Regionen des Atmungstraktes verteilt wird. Von dem insgesamt abgeschiedenen Material werden ca. 50 % im Alveolar-Lungensystem abgelagert und ca. 50 % im Bronchialsystem und den Atmungsorganen außerhalb des Brustkorbs. Für Verapamil kann aufgrund seiner Polarität zusätzlich ein Transfer durch die Schichten des Nasalepithels erwartet werden. Weil aus der Datenanalyse für  $\alpha_{W_{dep}} = 0.35$  ermittelt wurde, muß die Transfereffizienz  $\alpha$  minimal einen Wert von 0.5 erreichen (0.3/0.6). Das weist darauf hin, daß Verapamil vor Transfer in das Blut einem geringen metabolischen Abbau unterliegt. Dies wird durch die experimentellen Messungen bestätigt. So wurden, wie im Kapitel 4.2.5 erläutert, aus dem Plasma der Ratte, des Schweines und des Affen Metaboliten in geringen Konzentrationen detektiert.

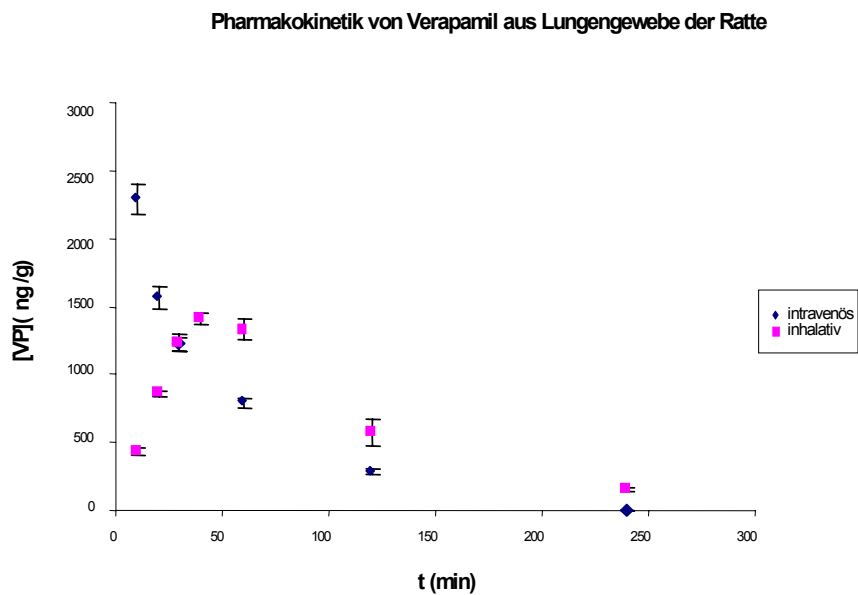
Durch inhalative Applikation eines Arzneistoffs werden fast die gleichen pharmakokinetischen Parameter für die Clearance, Verteilungsvolumen und die Verteilungskoeffizienten erzielt wie nach intravenöser. Die Verteilungskoeffizienten und Eliminationskonstanten aus den Messungen des Rattenplasmas nach intravenöser und inhalativer Applikation stimmen weitestgehend mit dem des Schweines überein (siehe Abb. 68). Der Verlauf der Pharmakokinetik des Verapamils in der Rattenlunge ist dem Verlauf in Rattenplasma proportional (siehe Abb. 68). Auch hier findet erst ein Anfluten der Verapamilkonzentration während der Expositionsphase statt. Nach beendeter Exposition beobachtet man ein Abklingen der Verapamilkonzentration durch Verteilung und Metabolismus im Organismus.

Die erfolgreiche Anwendung eines Arzneistoffs ist bei vielen Erkrankungen nur möglich, wenn seine Konzentration über die Zeit gleichbleibend hoch ist. Diese Bedingung wird mit der regelmäßigen Einnahme angestrebt, wobei die Bedingungen so zu wählen sind, daß ein zeitweises Absinken unter die therapeutisch wirksame Konzentration genauso vermieden wird wie das Überschreiten der oberen Grenzkonzentration, was Vergiftungssymptome hervorrufen würde. Ein gleichförmiger Plasmaspiegel über die Zeit ist hingegen dann unerwünscht, wenn mit ihm ein Nachlassen der Wirksamkeit verbunden ist (Toleranzentwicklung), oder wenn die Anwesenheit des Wirkstoffes nur zu bestimmten Tageszeiten erforderlich ist. Calciumantagonisten wie das Verapamil werden für Langzeittherapien eingesetzt und insofern ist ein gleichförmiger Plasmaspiegel über die Zeit erwünscht.

**Abb. 68:** Pharmakokinetik von Verapamil in Rattenplasma nach intravenöser und inhalativer Applikation<sup>8,9</sup>



**Abb. 69:** Pharmakokinetik von Verapamil aus Lungengewebe der Ratte nach intravenöser und inhalativer Applikation<sup>8,9</sup>



<sup>8</sup> Für die intravenöse Applikation wurden 21 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht 240-300g) Verapamil in einer Konzentration von 0.5 mg/kg in die Schwanzvene injiziert [145].

<sup>9</sup> Für die inhalative Applikation wurden 21 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht 240-300g) einer Aerosolkonzentration von 50 mg/m<sup>3</sup> ausgesetzt, die durch Verneblung einer 0.8 %igen Verapamillösung mit einem Volumenstrom von 10 ml/h erzeugt wurde. Der Gesamtvolumenstrom der Zuluft für die Inhalationseinheit betrug 25.9 l/min, 20.7 l/min wurden durch Abluftfilter abgesaugt. Die Expositionszeit betrug 40 min [145].

Die ersten Daten aus den Kinetikmessungen haben gezeigt, daß die inhalative Applikation eine Dosierung der therapeutisch wirksamen Arzneistoffkonzentration über einen längeren Zeitraum (ca. 100 min) erlaubt als die intravenöse Applikation, wo der Plasmaspiegel relativ schnell sinkt (siehe Abb. 68 und 69). Ein über die Zeit konstanter Plasmaspiegel läßt sich mit einer Dauerinfusion erreichen, wobei die Infusionsgeschwindigkeit die Höhe des Plasmaspiegels bestimmt. Dieses Verfahren wird im intensivmedizinischen Bereich häufig angewandt, kommt aber sonst für die Dosierung kaum in Betracht.

Ein inhalative Applikation hätte den Vorteil, daß der Wirkstoff z. B. bei hypertonen Krisen relativ einfach in Form eines Dosier-Aerosols appliziert werden könnte. Diese Applikationsform wäre auch in den nicht-intensivmedizinischen Bereichen durchführbar.

#### **4.3.4.1. Zusammenfassung**

**Probenvorbereitungsmethoden:** Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einer ADS-Vorsäule und die MSPD sinnvolle Alternativen zur SPE sind. Auf der ADS-Vorsäule können sowohl sehr polare Glucuronide und auch vergleichsweise unpolare Substanzen, wie das Verapamil, isoliert werden. Die Säulenschaltung erlaubt eine schnelle und reproduzierbare Aufarbeitung von biologischen Proben. Auf der Vorsäule können auch durch wiederholte Injektion höhere Analytkonzentrationen angereichert werden. Die Methode ist vollständig automatisierbar bei minimaler Probenvorbereitung (Zentrifugation).

Die MSPD ist im Vergleich zur Säulenschaltung relativ zeitaufwendig, ist aber für die Extraktion von Gewebematerial sehr gut geeignet. Es konnten neben Verapamil mehrere Metaboliten identifiziert werden. Die Reproduzierbarkeit und Präzision der Methode ist für Routinemessungen im Rahmen von Metabolismusstudien ausreichend.

**Pharmakokinetiken:** Mit Hilfe dieser beiden Methoden wurde die Pharmakokinetik des Verapamils aus dem Plasma und Lungengewebe unterschiedlicher Spezies (Schwein, Affe, Ratte) nach intravenöser und inhalativer Applikation bestimmt. Desweiteren konnten die Hauptmetaboliten des Verapamils aus Zellkulturen, Plasma



und Gewebe bestimmt werden. Bei den pharmakokinetischen Messungen wurde nach der inhalativen Applikation ein Anfluten der Verapamilkonzentration bis zum Expositionsende festgestellt. Nach Beendigung der Exposition wurde ein Abklingen der Konzentration beobachtet, was mit dem Verlauf nach intravenöser Applikation weitestgehend übereinstimmte, was nach Berechnung der pharmakokinetischen Parameter bestätigt wurde. Der Verlauf der Pharmakokinetiken war sowohl für alle drei untersuchten Spezies als auch im Plasma und Gewebe vergleichbar.

#### 4.4. In-tube SPME

In Kapitel 3 wurde die Entwicklung einer in-tube SPME Methode zur Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus unterschiedlichen biologischen Matrices beschrieben. Die Methode wurde zur Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Zellkulturüberständen kultivierter Rattenhepatozyten sowie humanem Urin und Rattenplasma eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

**Tab. 21:** Verapamil und seine detektierten Metaboliten in den unterschiedlichen Matrices, die mit Hilfe der in-tube SPME extrahiert wurden

Nr.	Retent. (min)	Konzentration		
		Urin (human)	Plasma (Ratte)	Hepatozyten (Ratte)
M1 <sup>2)</sup>	4,8	25 %	n.n.	n.n.
M2 <sup>2)</sup>	6,6	n.n.	0,4 %	n.n.
M3 <sup>2)</sup>	8,2	408 %	10 %	28%
M5	1,2	<sup>1)</sup>	n.n.	n.n.
M6 <sup>2)</sup>	14,2	14%	18 %	33 %
M7 <sup>2)</sup>	11,2-13,5	<sup>1)</sup>	12 %	20 %
M9 <sup>2)</sup>	11,2-13,5	<sup>1)</sup>	12 %	20 %
Verapamil <sup>3)</sup> (ng/ml)	15,9	1030	470	79
Gallopamil (IS)	17,1	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. : nicht nachweisbar

<sup>1)</sup> Metabolit wurde als Phase-II-Konjugat detektiert, aber nicht quantifiziert

<sup>2)</sup> Quantifizierung erfolgte über das Peakflächenverhältnis des Metabolitenpeaks zum Verapamilpeak

<sup>3)</sup> Quantifizierung erfolgte über internen Standard

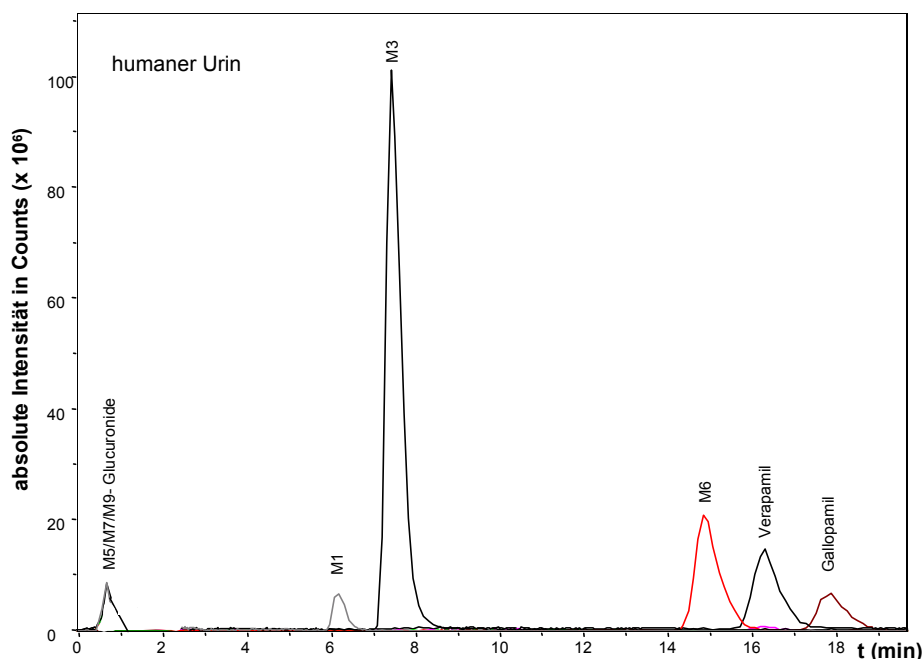
Im humanen Urin wurde das Dealkylverapamil M3 (408 %) als Hauptmetabolit identifiziert. Daneben wurden die Metaboliten M1 (25 %) und M6 (14 %) in erhöhter Konzentration gebildet. Die Metaboliten M5, M7 und M8 wurden als Glucuronid-konjugate detektiert.

Im Rattenplasma war die Konzentration der Metaboliten viel geringer. Norverapamil

(18 %) wurde hier als Hauptmetabolit gebildet. Daneben wurden die O-Demethylverapamillsomeren M7 und M9 (12 %) sowie der dealkylierte Metabolit M2 (0.4 %) gebildet.

Die Ergebnisse aus den Plasmamessungen stimmen weitestgehend mit denen aus den Zellkulturüberständen von Rattenhepatozyten überein. In den Zellkulturüberständen wurde Norverapamil als Hauptmetabolit (33 %) gebildet; daneben wurden die O-Demethylverapamillsomeren M7 und M9 (20 %) sowie die Metaboliten M3 (28 %) detektiert.

**Abb. 70:** Verapamil und seine Metaboliten nach Extraktion aus humanem Urin mittels in-tube SPME (Ionenchromatogramm)



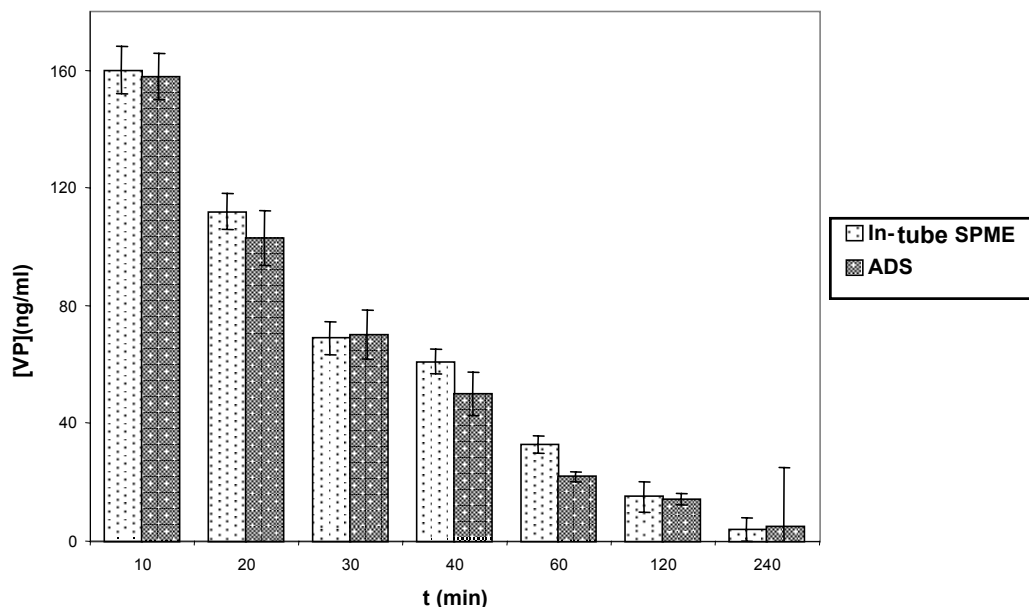
Im Rahmen dieser Dissertation sollte getestet werden, inwieweit die in-tube SPME für Routineapplikationen, wie der Aufnahme von Pharmakokinetiken, einsetzbar ist. Hierzu wurde die Pharmakokinetik von Verapamil aus Rattenplasma nach intravenöser Applikation sowohl mit der in-tube SPME als auch durch Säulenschaltung mit einer RAM-Vorsäule vermessen. Die Ergebnisse aus diesem Vergleich sind in Abb. 71 dargestellt.

Beide eingesetzten Methoden ergaben annähernd die gleichen Resultate. Auch die Standardabweichungen (die sowohl von der Standardabweichung des Verapamils als auch des Gallopamils nach zweifacher Injektion ( $n = 2$ ) berechnet wurde,

gleichens sich für beide Methoden und liegen zwischen 1 und 12 Prozent. Ein Anstieg bei niedrigeren Konzentrationen ist normal, da das Signal-Rausch-Verhältnis sehr niedrig ist. Die Werte, die aus den in-tube Messungen ermittelt wurden, sind in der Regel ein wenig höher als bei der Säulenschaltung. Carry-Over in der Kapillaren könnte für diesen Effekt verantwortlich sein.

Während dieser Messungen wurde eine einzige mit PPY beschichtete Kapillare verwendet. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Extraktionseigenschaften während der Messungen beobachtet, obwohl unterschiedliche Matrices wie Urin, Plasma und Zellkulturüberstände verwendet wurden, was die Robustheit der Methode bestätigt.

**Abb. 71:** Vergleich der in-tube SPME mit der ADS-Säulenschaltung bezüglich der Pharmakokinetikmessungen



#### 4.4.1. Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit der in-tube SPME-Methode war ausreichend, um die Hauptmetaboliten des Verapamils aus verschiedenen biologischen Matrices wie Urin, Plasma und Zellkulturüberständen nachzuweisen. Die entwickelte Methode war automatisierbar und reproduzierbar und lieferte bei den Pharmakokinetikmessungen ähnliche Resultate wie sie durch Säulenschaltung mit einer ADS-Vorsäule erzielt wurden.

Sie ist nicht für die Spurenanalyse und Strukturaufklärung neuer unbekannter

Metaboliten geeignet, kann aber für die Routineanalytik zur Bestimmung der Hauptmetaboliten und von Pharmakokinetiken eingesetzt werden.

#### 4.5. MIP

Der Einsatz der MIP-Technologie in der Metabolismusforschung sollte am Beispiel der Extraktion von Verapamil und seinen Metaboliten getestet werden. Hierfür wurden die offline Probenvorbereitung mit der MISPE und die integrierte Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit einer RAM- und einer MIP-Vorsäule eingesetzt.

##### 4.5.1. MISPE

Die MISPE (Methodenentwicklung siehe Kapitel 3) wurde mit Urin und Zellkulturüberständen von primären Rattenhepatozyten durchgeführt. Für Urin konnten sehr gute Ergebnisse bei der Extraktion erzielt werden. Die Hauptmetaboliten des Verapamils, das Dealkylverapamil M3 sowie das Norverapamil M6 und die O-Demethylverapamil-Isomeren M7 und M9, konnten aus dem Urin isoliert werden. Die Wiederfindungen für die einzelnen Metaboliten lagen zwischen 87 und 100 % (siehe Tab. 22).

Durch die Extraktion mit den MIP konnte ein Großteil der Matrixbestandteile abgetrennt werden, so daß ein höheres Signal/Rauschverhältnis erzielt werden konnte (siehe Abb. 72).

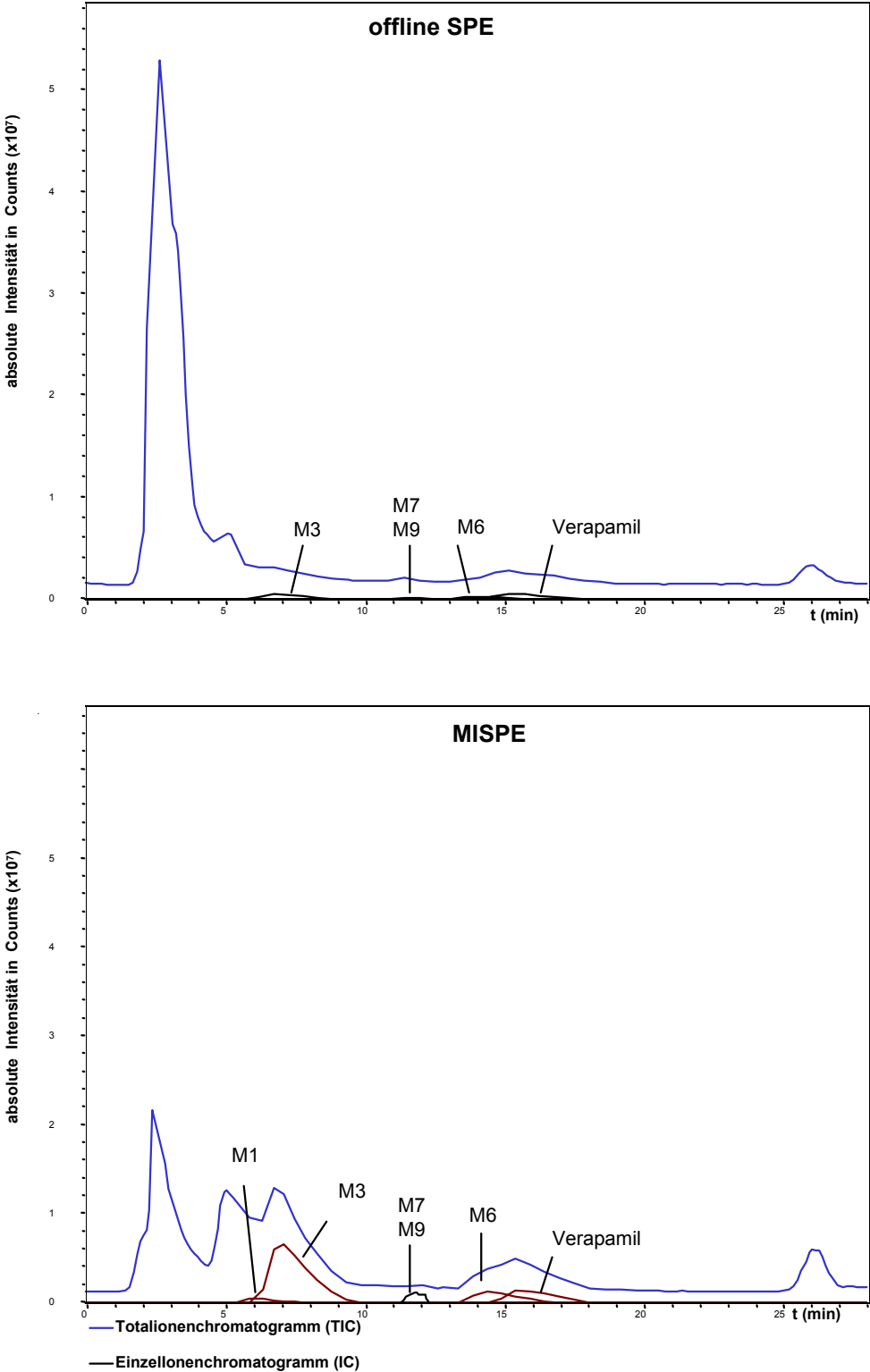
**Tab. 22:** Ergebnisse aus der MISPE von humanem Urin (Erläuterung in Kapitel 3)

Wiederfindungen der einzelnen Substanzen aus humanem Urin in %				
Substanz	Durchbruch	Spülfraction	Eluat	Σ %
M1	0	0	100	100
M3	0	13	87	100
M7	2	1	97	100
M9	2	1	97	100
M6	3	16	81	100
Verapamil	9	25	65	99

Da nur kleine Probenvolumina (5 ml) auf der Säule angereichert werden können, ist die Methode nicht für die Extraktion und Strukturaufklärung von neuen unbekanntem Metaboliten geeignet, die in der Matrix nur in Spuren auftreten. Die MISPE ist aber für die Abtrennung der wichtigsten Hauptmetaboliten des Verapamils geeignet, und

bei der Aufreinigung von Urin konnte eine höhere Selektivität bei der Extraktion der Metaboliten erzielt werden.

**Abb. 72:** Vergleich der Selektivität der Extraktion zwischen der konventionellen SPE und der MISPE



#### **4.5.2. RAM-MIP-Säulenschaltung**

Durch Säulenschaltung einer RAM- mit einer MIP-Vorsäule konnte die gesamte Probenvorbereitung automatisiert werden. Es kann zwar nur ein geringes Probenvolumen aufgearbeitet werden (< 1 ml). Dennoch ist die Empfindlichkeit ausreichend, um Verapamil und seine wichtigsten Hauptmetaboliten aus verschiedenen Matrices wie Urin, Plasma, und Zellkulturmedium zu isolieren. Insgesamt konnten die Metaboliten M1, M3, M6, M7 und M9 isoliert werden. Durch den Transfer der Analyten von der MIP-Vorsäule auf die analytische Säule wurden die Peaks, wie in Kapitel 3 beschrieben, stark verbreitert, wodurch die chromatographische Auflösung verloren ging (siehe Abb. 73).

Für Verapamil traten Blindwerte (bis zu 25 %) im System auf (siehe Kapitel 2), die eine Quantifizierung des Verapamils erschwerten. Nach Inkubation von Rattenhepatozytenkulturen mit einer markierten Substanz wie dem D<sub>6</sub>-Verapamil, konnten diese Blindwerte aber auf ein Minimum reduziert werden, so daß prinzipiell eine Quantifizierung des Verapamils möglich war. Die Ergebnisse der Validerung in Kapitel 3 zeigen, daß für die Matrix Urin die besten Linearitäten erzielt wurden, so daß das Säulenschaltungssystem aus einer MIP- und einer RAM-Vorsäule routinemäßig auch zur quantitativen Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten aus Urin eingesetzt werden kann.

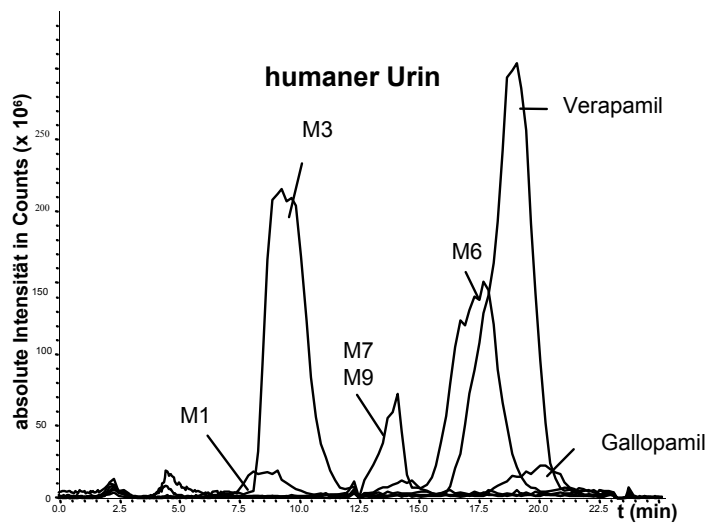
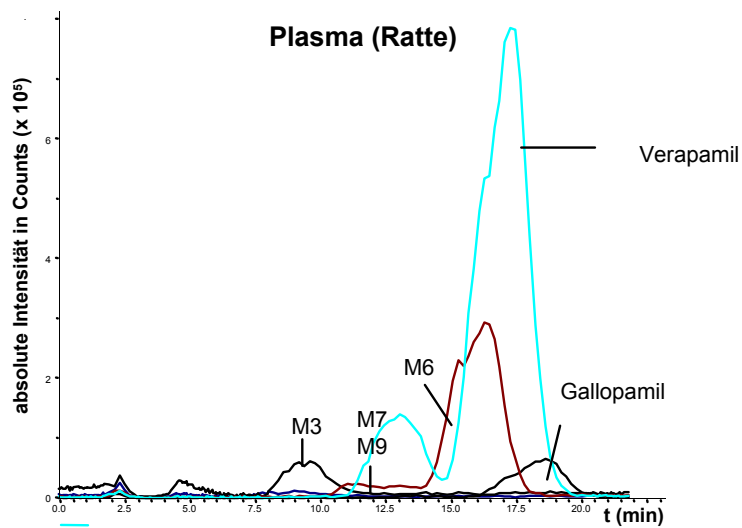
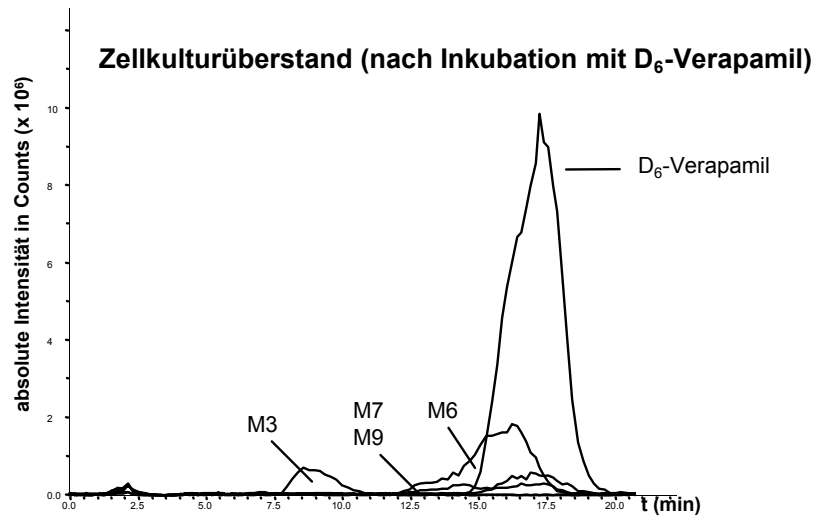
Für Medium und Plasma können aufgrund von Matrixeffekten die Metaboliten nur qualitativ bestimmt werden. Eine Verbesserung der Methode für eine Quantifizierung in diesen Matrices wäre daher notwendig.

#### **4.5.3. Zusammenfassung der MIP-Ergebnisse**

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die Probenvorbereitung durch Einsatz von molekular geprägten Adsorbentien für Metabolismusstudien durchaus geeignet ist. Durch ihre Verwendung konnte im Urin zumindest ein Großteil der Matrixbestandteile abgetrennt werden, so daß eine bessere Empfindlichkeit erzielt wurde. Die Methode war nicht zur Strukturaufklärung von neuen, in geringen Konzentrationen gebildeten Metaboliten geeignet. Die routinemäßige qualitative Bestimmung von Verapamil und den Hauptmetaboliten aus verschiedenen biologischen Matrices sowie eine Quantifizierung aus dem Urin war möglich. Blindwerte des Verapamils während der Analytik konnten durch Verwendung von

markierten Substanzen bei den Inkubationen vermieden werden.

**Abb. 73:** Ionenchromatogramme nach RAM-MIP-Extraktion der unterschiedlichen Matrices



Daß für die einzelnen Untersuchungen nur eine einzige MISPE-Kartusche (ca. 50 Proben) und eine MIP-Mikrosäule (ca. 200 Injektionen) eingesetzt wurden, zeigt, daß die Methode in Bezug auf Verwendung von unterschiedlichen biologischen Matrices robust ist.

Der größte Vorteil der Säulenschaltung mit einer MIP-Vorsäule und der RAM-Vorsäule mit dem analytischen HPLC-System lag in der Selektivität der Analytextraktion aus der Matrix bei gleichzeitiger Automatisierung mit der online HPLC-MS und der damit verbundenen Zeitersparnis bei der Probenvorbereitung.

## 5. Diskussion

### 5.1. Analytische Methoden

#### 5.1.1. Probenvorbereitungsmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Probenvorbereitungsmethoden für die Isolation von Verapamil und seinen Metaboliten entwickelt.

**SPE:** Für die Isolation neuer, unbekannter Metaboliten hat sich die Festphasenextraktion bewährt. Mit Hilfe der SPE war es möglich, sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Metaboliten zu isolieren und durch Aufgabe großer Probenvolumina aufzukonzentrieren. Ein Nachteil der SPE ist allerdings, daß sie mehrere Probenvorbereitungsschritte erfordert und dadurch relativ zeitaufwendig ist. Ein weiterer Nachteil der SPE war die geringe Selektivität. Bei der Extraktion wurden immer diverse Matrixbestandteile mitisoliert, die sich mit den Analyten überlagerten und dadurch die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigten.

**MSPD:** Bei der MSPD-Extraktion von Organen wurden zwar auch Matrixbestandteile mitisoliert, allerdings traten im Chromatogramm weniger Überlagerungen mit Analyten auf als bei der Extraktion von Zellkulturüberständen. Die Linearität und Reproduzierbarkeit der MSPD waren ausreichend, um zumindest Verapamil zu quantifizieren und die Metaboliten semiquantitativ bestimmen zu können. Phase-II-Konjugate konnten aus den Organen nicht nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte gewesen sein, daß sie während der Extraktion auf der RP18-Phase nicht reteniert wurden, sondern durchgebrochen sind. Es ist allerdings wahrscheinlicher, daß sie sich nicht in den Organen angereichert haben, da die



Glucuronidkonjugate bei physiologischem pH-Wert in dissoziierter Form vorliegen und aufgrund ihrer Polarität die Membranbarrieren nicht überwinden können. Eine Anreicherung im Gewebe wäre somit auszuschließen, sofern keine Proteine den Transport der Konjugate in die Zellen unterstützen. Der Nachteil der MSPD wie der der SPE ist, daß relative viele Probenvorbereitungsschritte durchgeführt werden müssen, was das ganze Verfahren relativ zeitaufwendig macht.

**RAM-Säulenschaltung:** Eine wesentliche Verkürzung der Probenvorbereitungszeit konnte durch Integration der HPLC in die Probenvorbereitung erzielt werden. Die Kopplung der analytischen HPLC mit einer RAM-Vorsäule durch Säulenschaltung ermöglichte eine schnelle, reproduzierbare Extraktion von verschiedenen biologischen Matrices. Die Methode konnte routinemäßig für Metabolismusstudien wie für Pharmakokinetikmessungen eingesetzt werden. Mit diesem Verfahren konnten sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Metaboliten isoliert und bestimmt werden. Ein Nachteil der Methode war allerdings, daß relativ geringe Probenmengen auf die RAM-Phase injiziert werden konnten. Die aufgegebene Menge richtete sich nach dem Proteingehalt der Probe. Für die Aufnahme der Pharmakokinetiken wurde Plasma von unterschiedlichen Spezies auf die RAM-Vorsäule injiziert. Der Proteingehalt des Plasma ist relativ hoch (Albumingehalt von humanem Plasma: 4.6 g/100 ml Plasma) so daß nur 50 µl Plasma auf einmal auf die Vorsäule aufgegeben werden konnten. Die Empfindlichkeit der Methode war ausreichend, um Verapamil und seine Hauptmetaboliten aus 50 µl Probe zu quantifizieren, da die gesamte Analytmenge im Anschluß auf die RAM-Vorsäule transferiert wurde. Für Metaboliten, die nur in geringen Konzentrationen gebildet wurden, reichte die Empfindlichkeit nicht aus, um sie eindeutig zu identifizieren. Deshalb wurden die Plasmaproben nach Vermessen mit der RAM-Vorsäule gepoolt, nochmals über eine SPE zur weiteren Anreicherung aufkonzentriert und mit der HPLC-MS vermessen. Ein Nachteil bei der Probenvorbereitung mit RAM bei proteinhaltigen Proben war, daß die Proteinmatrix nie vollständig beim Spülschritt aus dem System entfernt werden konnte, so daß es in der Folge zu Verstopfungen und einem Anstieg des Druckes im Chromatographiesystem kam. Verstopfungen im Injektionssystem ließen sich durch regelmäßiges Wechseln des Inlinefilters zwar vorbeugen, dennoch wurde ein Druckanstieg auf der RAM-Vorsäule beobachtet. Der Druckanstieg ist nicht

unbedingt auf Verstopfungen des Sorbentmaterials zurückzuführen. Langzeitstudien mit den ADS-Vorsäulen haben gezeigt, daß sich nach vielfacher Injektion von Plasma die Fritten der Säule langsam zusetzen und dadurch einen Druckanstieg verursachen [154]. Diese Proteinablagerungen können auch zu erhöhten Blindwerten im System führen, da auf der Oberfläche der ausgefallenen Proteine (ionische Matrix) polare Substanzen gut adsorbiert werden können. Im Verlauf der Pharmakokinetikmessungen haben diese Effekte zu einer Verschlechterung der Präzision geführt. Zu Beginn der Messungen lag die Präzision noch unter 10 %, nach Vermessen von einigen Hundert Proben verschlechterte sich die Präzision auf Werte von 30 %. Von den Zellkulturüberständen und den Urinproben konnte erheblich mehr Volumen aufgegeben werden, da der Proteingehalt dieser Proben deutlich geringer war. Das Aufgabevolumen wurde durch die Kapazität der Injektionsschleife beschränkt (200 µl). Durch Einsetzen einer Injektionsschleife mit größerem Volumen (500-1000 µl) ließ sich ein höherer Anreicherungsseffekt erzielen, was auch durch eine wiederholte Injektion einer Probe (z. B. 5 x 200 µl) erreicht werden konnte. Allerdings wurde dadurch die Analysenzeit verlängert, was in der Regel vermieden werden sollte.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß für die Messungen der zahlreichen unterschiedlichen Proben und Matrices nur eine einzige ADS-Vorsäule verwendet wurde, was zeigt, daß die Methode robust war. Da mit einer Kartusche mehr als 2000 Injektionen durchführbar waren, ließ sich der Anschaffungspreis (ca. 250 Euro) kompensieren.

Der größte Vorteil der Säulenschaltung der analytischen HPLC mit einer RAM-Vorsäule besteht in der Fraktionierung der Probe (Abtrennung der Analyten von der Proteinmatrix) und der Selektivität der Extraktion von polaren Analyten, wie Arzneistoffmetaboliten. Ein weiterer Vorteil der Methode stellt die Automation des Verfahrens, wie bei der online SPE-LC-Kopplung, und der damit verbundenen Zeitersparnis der Probenvorbereitung dar. Durch Verwendung einer geeigneten Steuerungssoftware lassen sich die Probenvorbereitung und die HPLC-Chromatographie parallel durchführen, wodurch die Analysenzeit noch weiter reduziert werden kann. Bei dem verwendeten Waters-System war dies allerdings nicht möglich. Desweiteren entfallen aufwendige Probenvorbereitungsschritte (mit Ausnahme der Zentrifugation). Durch die Automation der Probenvorbereitung ließen

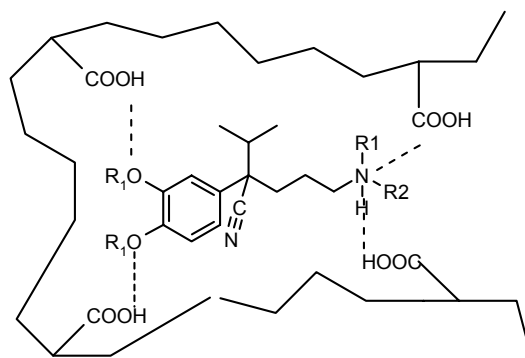
sich manuelle Fehler reduzieren, und Zersetzungen der Analyten durch Kontakt mit Licht oder Luftsauerstoff wurden unterdrückt.

**In-tube SPME:** Die in-tube SPME ist eine relativ neue Extraktionsmethode, die noch nicht für Metabolismusstudien eingesetzt worden ist. Es konnte gezeigt werden, daß sie für die Routinebestimmung der Hauptmetaboliten und für pharmakokinetische Messungen des Verapamils geeignet ist. Die SPME ist keine erschöpfende Extraktionsmethode und damit nicht für die Spurenanalytik und Strukturaufklärung neuer unbekannter Metaboliten, die in geringen Konzentrationen gebildet werden, einsetzbar. Da aber die gesamte Analytmenge im Anschluß an die Extraktion auf die analytische Säule transferiert wurde, konnte wiederum Empfindlichkeit gewonnen werden. Die Extraktionseffizienz hängt sehr stark vom Coatingmaterial und der Coatingdicke der Extraktionskapillare ab. Die Extraktionseffizienz der PPY-beschichteten Kapillaren war für die Extraktion der polarsten Metaboliten am höchsten. Bemerkenswert ist, daß selbst relativ polare Substanzen wie Glucuronide aus den biologischen Matrices extrahiert werden konnten, was zeigt, daß die Kapillarbeschichtung für den erfolgreichen Einsatz der in-tube SPME in der Metabolismusforschung entscheidend ist.

Ein Nachteil der konventionellen in-tube SPME war, daß die Proteine aus den biologischen Matrices vorher abgetrennt werden mußten. Der Vergleich der pharmakokinetischen Messungen, die sowohl mit der RAM-Säulenschaltung als auch mit der in-tube SPME durchgeführt wurden, hat zu fast identischen Resultaten geführt, mit der Ausnahme, daß bei der Säulenschaltung mit einer ADS-Vorsäule die Abtrennung der Proteine entfiel. Die Gesamtanalysenzeit der in-tube SPME war im Vergleich zur ADS-Säulenschaltung länger, da die Extraktion mit den Kapillaren zeitaufwendiger als die Abtrennung der Proteine auf der ADS-Vorsäule ist. Da für die in-tube SPME die Proteine vor der Analyse zusätzlich abgetrennt werden mußten, wurde dadurch die Gesamtanalysenzeit verlängert. Neuere Entwicklungen kombinieren die in-tube SPME mit dem ADS-Material [118]. Da dadurch die Oberfläche des Extraktionsmaterials stark vergrößert wird, kann die Extraktionszeit dementsprechend verkürzt werden. Zusätzlich entfällt auch die Abtrennung der Proteine.

**MIP:** Sowohl bei der in-tube SPME als auch bei der RAM-Säulenschaltung und der SPE wurden neben den Analyten auch viele Matrixbestandteile mitextrahiert. Durch Verwendung von molekular geprägten Adsorbentien (MIP) konnte die Selektivität der Extraktion der Analyten zumindest aus dem Urin verbessert werden. Mit Hilfe der MIP konnten die Hauptmetaboliten des Verapamils isoliert werden. Das deutet darauf hin, daß die höhersubstituierte Molekülhälfte und die Aminfunktion, die bei all diesen Metaboliten noch erhalten ist, wahrscheinlich entscheidend für die Retention auf dem MIP-Material ist (siehe Abb. 74). Eine Demethylierung am aromatischen Ring oder am Stickstoff, ebenso wie die Abspaltung der Phenylalkylseitenkette hatte keinen nachteiligen Einfluß auf die Retention. Glucuronidkonjugate konnten mit Hilfe der MIP nicht isoliert werden, sie brachen während des Spülschritts immer durch. Die Polarität des Moleküls konnte nicht entscheidend für den Bindungsverlust gewesen sein, da gerade die Hydroxygruppen des Glucuronidrestes zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen befähigt sind. Wahrscheinlich war die Größe des Glucuronidrestes der Grund dafür, daß die Glucuronide nicht in den Poren des MIP-Materials retiniert wurden.

**Abb. 74:** Vorgeschlagene Wechselwirkung des MIP mit Verapamil



R1= H oder CH<sub>3</sub>

R2= H oder Phenylalkylaminrest

Der bestimmte Imprinteffekt für Verapamil im Batch-Binding-Assay war wesentlich höher (50 %) als in den nachfolgenden Experimenten (< 10 %). Im Batch-Binding-Assay wurde Verapamil über Nacht mit dem Polymermaterial in einem Gefäß vermischt, so daß die Zeit für eine Diffusion der Analyten in die freien

Bindungsstellen des MIP-Materials relativ lang war. Nach Aufgabe der Realproben auf die MISPE-Kartusche oder die MIP-Mikrosäule betrug die Wechselwirkungszeit zwischen Analyt und Polymer nur wenige Sekunden, so daß die Analyten nicht in die Poren der Bindungsstellen diffundieren konnten. Die molekulare Erkennung wurde durch diesen Effekt wahrscheinlich vermindert. Einen weiteren Einfluß auf die molekulare Erkennung könnte die Polarität des Lösemittels haben. Bei der Herstellung des Polymers wurde Chloroform als Lösemittel verwendet. Im allgemeinen wird für die molekulare Erkennung der Analyten das gleiche Lösemittel verwendet. Im Batch Binding-Assay wurde aber ein sehr guter Imprint-Effekt bei Verwendung von Acetonitril als Lösemittel erzielt. Die Dielektrizitätskonstante von Acetonitril ( $\epsilon = 36.2$ ) ist wesentlich höher als die des Chloroforms ( $\epsilon = 4.8$ ) [91]. Nach dem Coulomb-Gesetz ist die Wechselwirkung zwischen Analyt und MIP bei Verwendung von Acetonitril schwächer als bei der Verwendung von Chloroform. Beim Batch-Binding-Assay trat dieser Effekt nicht auf, aber nach der Aufgabe von Probe auf das MIP-Material wirkte er sich durch die kurze Wechselwirkungszeit zwischen Analyt und Polymer so aus, daß die Wechselwirkung zwischen Analyt und MIP vermindert wurde. Matrixeffekte spielen bei der molekularen Erkennung eine wichtige Rolle. Die Wechselwirkung zwischen Analyt und Polymer waren im Urin besonders stark, in anderen Matrices wie Zellkulturmedium und Plasma relativ gering. Das Zellkulturmedium enthielt viele weitere niedermolekulare Substanzen wie Aminosäuren und Arzneistoffe, die aufgrund ihrer Struktur und Polarität einen Teil der Bindungsstellen belegen konnten, so daß die Analyten nicht mehr in ausreichendem Maße reteniert wurden. Eine Quantifizierung von Verapamil und seinen Metaboliten war daher nur im Urin möglich.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die MIP durchaus zur selektiven Anreicherung von Verapamil und seinen Metaboliten und damit zum Einsatz in der Metabolismusforschung geeignet ist. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die erste Applikation zum Einsatz der MIP bei Metabolismusstudien entwickelt.

### **5.1.2.                   Strukturaufklärung mit Hilfe der Massenspektroskopie und der $^1\text{H}$ NMR**

Mit Hilfe der Massenspektroskopie und der  $^1\text{H}$ -NMR konnten die Strukturen von 32 Metaboliten bestimmt werden.

### 5.1.2.1. Strukturaufklärung mit HPLC-MS<sup>n</sup>

Im Positiv-ESI konnten die Strukturen von 32 Phase-I- und 18 Phase-II-Metaboliten bestimmt werden. Gemeinsam ist diesen Metaboliten, daß die Aminofunktion noch erhalten ist, deshalb wurden für Verapamil und seinen Metaboliten (soweit nachprüfbar) gute Ionisierungsausbeuten im Positiv-ESI erzielt. Die Glucuronid-konjugate werden im Negativ-ESI auch sehr gut ionisiert, dennoch war die Ionisierungsausbeute im Vergleich zum Positiv-ESI um eine Zehnerpotenz geringer. Die Ionisierungsausbeute der Phase-II-Metaboliten im Positiv-ESI ist im Vergleich zu den Phase-I-Metaboliten um eine Zehnerpotenz geringer. Deshalb konnten wahrscheinlich nicht alle Phase-I-Konjugate auch als Phase-II-Konjugate identifiziert werden.

Von den in Kapitel 1 beschriebenen, in der Literatur bekannten Strukturen konnten die Metaboliten M33-M41 im Positiv-ESI nicht detektiert werden.

Die DMPA (M41) konnte im Positiv-ESI nicht mit ausreichender Intensität detektiert werden, eine Ionisierung im Negativ-ESI führte auch nur zu verminderten Ionisierungsausbeuten. Da sie im Vergleich zu den dealkylierten Metaboliten nur in Spuren gebildet wurde, ist auf die Entwicklung einer speziellen Methode für die DMPA verzichtet worden. Die Metaboliten M33-M40 konnten aus keiner Matrix identifiziert werden. M33 und M34 haben sich später als Artefakte herausgestellt, die bei der Derivatisierung für GC-MS gebildet wurden. Es ist nicht auszuschließen, daß es sich bei den anderen Metaboliten M35-M38 ebenfalls um Artefakte handelt, da sie auch mit keiner anderen Methode als GC-MS nachgewiesen wurden. M40 wiederum konnte wahrscheinlich nur in geringer Intensität im Positiv-ESI detektiert werden. Eine Detektion im Negativ-ESI wäre für eine Bestimmung dieses Metaboliten günstiger gewesen.

Durch die D/H-Rücktauschexperimente konnte die Zahl der austauschbaren Protonen bestimmt werden, die wiederum Rückschlüsse auf Strukturelemente wie z. B. sekundäre Amine (M2 und M5) im Molekül erlaubten. Außerdem konnte durch den D/H-Rücktausch die Art des abgespaltenen Fragmentes (z. B. Abspaltung von Methylamin oder einer Methoxygruppe) eindeutig identifiziert werden.

Die Zuordnung der Metaboliten erfolgte über deren Fragmentierungsreaktionen im MS<sup>n</sup>. Der MS<sup>n</sup>-Modus erlaubt die Isolierung und Fragmentierung von Ionen in

mehreren Schritten. Bei der Fragmentierung von Ionen entstehen Fragmentionen und Neutralteilchen (siehe unten). Die Fragmentionen können wiederum isoliert und fragmentiert werden. Aus diesen Fragmentionen kann man sehr wertvolle Strukturinformationen entnehmen. So weist die Abspaltung von 176 amu vom Molekülion im Positiv-ESI auf das Vorhandensein eines Glucuronids hin. Durch weitere Fragmentierung können weitere Informationen, wie die Positionen der Hydroxylierung, N- oder O-Demethylierung gewonnen werden. Die Unterscheidung zwischen Diastereomeren oder Konstitutionsisomeren ist mit Hilfe der Massenspektrometrie allein nicht möglich. Diese Informationen kann nur die NMR-Spektroskopie liefern.

Nach Ionisierung im Positiv-ESI werden  $[M+H]^+$  Ionen gebildet. Die Ladung wird bevorzugt an einem bestimmten Strukturelement, wie an Heteroatomen mit freien Elektronenpaaren,  $\pi$ -Bindungen oder  $\pi$ -Bindungssystemen lokalisiert. Im Falle des Verapamils erfolgt die Protonierung am Stickstoff, d. h. die Ladung der Molekülionen im Positiv-ESI ist am Stickstoff lokalisiert, wie  $^1\text{H}$  NMR-Messungen gezeigt haben. Hierfür wurden das Verapamilhydrochlorid und die extrahierte freie Base im  $^1\text{H}$  NMR vermessen und die chemischen Verschiebungen verglichen. Der Vergleich mit den Spektren des extrahierten und geschnittenen Verapamils (aus Zellkulturmedium und Urin) zeigte, daß aufgrund eines starken Tieffeldshifts der N-Methylgruppe (2.10 ppm nach basischer Extraktion im Vergleich zu 2.65 ppm Verapamil in wäßriger Lösung) protoniert vorliegen muß. Dies wird durch den  $pK_s$ -Wert des Verapamils ( $pK_s = 9.2$ ) unterstützt. In der wäßrigen mobilen Phase ( $\text{pH} = 6$ ) liegt der Aminostickstoff in protonierter Form vor, d. h. im ESI liegen bereits im Eluat gebildete Ionen vor (engl.: preformed ions). Ionen mit gerader Elektronenzahl besitzen nach Bildung von Quasimolekülionen ( $[M+H]^+$ ) im Positiv-ESI eine ungerade Molekülmasse. Ionen mit einer geraden Elektronenzahl, die ein Stickstoffatom enthalten, besitzen eine gerade Molekülmasse nach Bildung von Quasimolekülionen ( $[M+H]^+$ ) im Positiv-ESI, Ionen mit zwei Stickstoffatomen, wie das Verapamil dementsprechend eine ungerade Masse im Positiv-ESI (Stickstoffregel).

Beim Zerfall des Molekülions entstehen immer ein Ion und ein Neutralteilchen, wobei die Ladung des Molekülions in der Regel vom Bruchstück mit dem geringsten Ionisierungspotential übernommen wird. Als Neutralteilchen können entweder Radikale oder Neutalmoleküle abgespalten werden. Normalerweise werden nach

Ionisierung im MS und Fragmentierung immer Ionen mit gerader Elektronenzahl (even electron ions) gebildet, da bei ihnen im Gegensatz zu Ionen mit ungerader Elektronenzahl (odd electron ions) die Elektronenschalen voll besetzt sind, was einen günstigen energetischen Zustand darstellt. Eine Abspaltung von Neutralmolekülen von Ionen mit gerader Elektronenzahl (even electron ions) bei der Fragmentierung führt wiederum zu Ionen mit gerader Elektronenzahl, deren Bildung thermodynamisch bevorzugt ist (negative Standardbildungsenthalpien  $\Delta H_b^0$ , siehe Tab. 23). Die Abspaltung eines Radikals führt zu Ionen mit einer ungeraden Zahl an Elektronen (odd electron ions), deren Bildung thermodynamisch ungünstig ist und meist zusätzlich eine hohe Bildungsenthalpie erfordert. Bei der Strukturzuordnung der Verapamilmetaboliten nahm die Abspaltung von stabilen Neutralteilchen bei den Fragmentierungsreaktionen eine Schlüsselstellung ein. Die Abspaltung eines Ammoniakmoleküls während der Fragmentierung wies auf eine N-Demethylierung im Metaboliten hin. Das Auftreten von Methylamin während der Fragmentierung schloß wiederum eine N-Demethylierung aus. Der Verlust von stickstoffhaltigen Neutralteilchen wie Ammoniak oder Methylamin führte zu Fragmentionen mit geraden Massen, der Verlust von nichtstickstoffhaltigen Neutralteilchen wiederum zu ungeraden Massen. Der Verlust von CO wies auf die Bildung eines N-Formylamins hin. Bei der Zuordnung der hydroxylierten Metaboliten wurde die Wasserabspaltung besonders berücksichtigt. So führte eine Hydroxylierung in der Alkylseitenkette in der Regel zur Wasserabspaltung, eine Hydroxylierung am aromatischen Ring jedoch nicht, sondern höchstens zu einer Abspaltung eines Hydroxyradikals. Eine Ausnahme stellten zwei vicinal gebundene Hydroxygruppen am aromatischen Ring dar, die sehr leicht Wasser abgespalten haben (ortho-Effekt).

Die Isopropylgruppe wurde in der Regel auch abgespalten, obwohl dadurch ein energetisch ungünstigeres Ion mit ungerader Elektronenzahl gebildet wurde. In Einzelfällen wurde Propen anstelle des Isopropylradikals abgespalten, dessen Bildungsenthalpie zwar positiv, aber im Vergleich zum Isopropylradikal energetisch bevorzugt ist (siehe Tab. 23). Durch den Verlust der Isopropylgruppe konnte ein Strukturvorschlag nur bestätigt werden, im Falle der direkten Hydroxylierung der Isopropylgruppe konnte durch die Abspaltung von Aceton oder des Radikals  $\cdot\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$  die Position genau lokalisiert werden. Die Abspaltung von Aceton ist energetisch günstig, da dessen Bildungsenthalpie stark negativ ist (siehe Tab. 23)



und zusätzlich ein energetisch günstiges Ion mit gerader Elektronenzahl erzeugt wird. Die Fragmentierungen von Verbindungen nach Elektronenstoßionisierung (EI) sind relativ gut erforscht. Im Falle des Verapamils wird nach EI das Moleküllion ( $M^+-1$ ) nur in sehr geringer Intensität gebildet.  $\alpha$ -Spaltung auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum mit Abstand intensivsten Ion mit  $m/z = 303$  und zum Ion mit  $m/z = 151$  (wenn die positive Ladung vom Stickstoff auf den Benzylrest wandert), das in vergleichsweise geringerer Intensität gebildet wird. N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der niedersubstituierten Hälfte führt zum Ion mit  $m/z = 165$ , das nur in verminderter Intensität gebildet wird.

**Tab. 23:** Abspaltung der wichtigsten Neutralteilchen im  $MS^n$  und ihre Bedeutung für die Strukturaufklärung

Abgespaltenes Neutralteilchen	$\Delta H_b^0$ (kJ/mol) bei 298 K	Hinweis auf Strukturelement	Beispiel für das Auftreten in Metaboliten
$NH_3$	-46.1		M1, M4, M6, M25, M28
$H_3C-NH_2$	-23.0		M2, M3, M7, M10, M11, M12, M26, M27, M29
CO	-110.5		M23
$H_2O$	-241.8		M8, M12, M13, M21, M22, M26
			M24, M30
OH	+38.9		M15, M17, M19
$C_3H_6OH$	n.b.		M18
	-217.6		M13
	+20.4		M15
$C_3H_7$	+75.2		M1-M12, M18, M25, M26, M28, M31

$\Delta H_b^0$ : Standardbildungsenthalpien für die Abspaltung von Neutralteilchen im gasförmigen Zustand [155]

n.b.: nicht bekannt

Die anderen Ionen mit  $m/z = 260$  (N-C-Spaltung mit Ladungstransfer auf der

niedersubstituierten Hälfte),  $m/z = 208$  ( $\alpha$ -Spaltung auf der höhersubstituierten Hälfte) und  $m/z = 218$  (C-C-Spaltung zwischen C-2 und C-3) wurden auch nur in vermindeter Intensität gebildet. Bei den Metaboliten treten die entsprechenden Fragmentierungen auf [67].

Obwohl sich die Art der gebildeten Molekülionen nach Ionisierung im Positiv-ESI doch sehr stark von denen nach Elektronenstoßionisierung unterscheidet, wurden für Verapamil große Übereinstimmungen im Fragmentierungsmuster festgestellt. Allerdings wurden die Fragmente in unterschiedlichen Intensitäten gebildet. So führte N-C-Spaltung auf der niedersubstituierten Seite nach Ionisierung von Verapamil im Positiv-ESI zur intensivsten Fragmentierung mit  $m/z = 165$ , einem stabilen "even electron" Ion. C-C-Spaltung in  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf der niedersubstituierten Hälfte führte zu den Ionen mit  $m/z = 151$  (mit Ladungstransfer) und zur Fragmentierung mit  $m/z = 303$  (mit Protonentransfer), die nur in geringer Intensität gebildet wurden. Das Ion mit  $m/z = 260$  (N-C-Spaltung auf der höhersubstituierten Hälfte mit Ladungstransfer) wurde auch nur in vermindeter Intensität gebildet. Die Abspaltung der Isopropylgruppe wird sehr oft bei den Verapamilmetaboliten beobachtet, die Abspaltung von Propen hingegen sehr selten, obwohl es das energetisch günstigere Neutralteilchen darstellt. Bei den Metaboliten wurde die Bildung der Fragmentierungen oft durch Protonentransfer begleitet, wobei immer ein Proton von dem stickstoffhaltigen Rest auf das nicht stickstoffhaltige Fragment übertragen wurde. Durch den Protonentransfer sind Neutrale Moleküle gebildet worden, deren Abspaltung energetisch begünstigt ist. Bei den O-demethylierten und hydroxylierten Metaboliten bestimmte die Position der Hydroxygruppe maßgeblich die Fragmentierung im Molekül. War die Hydroxygruppe im höhersubstituierten Molekülteil gebunden, so trat die N-C-Spaltung  $B_2$  nicht auf. War die Hydroxygruppe im Phenylalkylaminrest gebunden, so trat die N-C-Spaltung  $B_2$  bevorzugt auf (vergleiche Tab. 14).

#### **5.1.2.1.1. Retentionszeiten**

Bei der RP-Chromatographie eluieren die polaren Substanzen zuerst von der Säule, die unpolaren Substanzen zuletzt. In Tab. 14 sind die Retentionszeiten der Phase-I-Metaboliten des Verapamils aufgeführt. Zuerst sind die polaren demethylierten und dealkylierten Metaboliten von der Säule eluiert (M15, M1, M2), gefolgt vom Dealkylverapamil (M3). Anschließend folgten dreifach demethylierten Metaboliten

M24 und M25, gefolgt von den O,O-demethyliertem Metabolit M11 und dem hydroxylierten und zusätzlich demethylierten Metaboliten (M18). Die einfach hydroxylierten Metaboliten (M12 und M21) eluierten im Anschluß teilweise zusammen mit den N,O- und O,O- demethylierten Metaboliten. Danach folgten die einfach O-demethylierten Metaboliten (M7, M9, M10). Kurz vor dem Verapamil eluierte das Norverapamil. Die Metaboliten lassen sich also aufgrund ihrer Polarität in eine Elutionsreihe einordnen.

Es wurden bei der Chromatographie teilweise sehr starke Überlappungen beobachtet, so daß sich nicht alle Metaboliten in eine eindeutige Elutionsreihe einfügen lassen. Es ist auch bei der großen Anzahl von Metaboliten schwierig, eine Prognose für die zu erwartende Retentionszeit jedes einzelnen Metaboliten zu stellen. Es zeigt sich aber, daß sich die Retentionszeiten der Metaboliten tendenziell mit ihrer Polarität korrelieren lassen, so daß die Retentionszeiten als weiteres Indiz für die Strukturaufklärung der Metaboliten herangezogen werden können.

#### **5.1.2.1.2. Quantifizierung**

Zur Quantifizierung der Metaboliten wurden die Peakflächeneinheiten der Phase-I-Metaboliten ins Verhältnis zu den Peakflächeneinheiten des Verapamils gesetzt. Da kleine Strukturvariationen im Molekül zu großen Polaritätsänderungen und somit zu Schwankungen in der Ionisierungsausbeute führen können, wurden die Glucuronidkonjugate, die eine deutlich geringere Response (eine Zehnerpotenz) als die Phase-I-Metaboliten aufwiesen, nicht direkt quantifiziert, sondern mit Hilfe der Differenzmethode nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt. Der geringe Response der Glucuronidkonjugate sollte ein Grund dafür gewesen sein, daß nicht alle Phase-I-Metaboliten als Glucuronidkonjugate detektiert worden sind, da die Nachweisempfindlichkeit zu gering war.

Bei den pharmakokinetischen Messungen wurde Verapamil durch Vergleich der Peakflächeneinheiten mit dem des internen Standards Gallopamil quantifiziert. Dabei wurden immer drei Wiederholmessungen durchgeführt. Die Gesamtstandardabweichung errechnete sich aus der Standardabweichung aus den Peakflächeneinheiten des Verapamils und der Standardabweichung aus den Peakflächeneinheiten des Gallopamil. Die höheren Werte für die Standardabweichungen sind daher nicht besonders verwunderlich, da sie sich aus zwei Größen errechnen und die Zahl der

Wiederholmessungen mit 3 relativ gering war. Außerdem sind die Standardabweichungen nach Vermessen einer Probe in einem Ionenfallenmassenspektrometer aufgrund der Meßtechnik (siehe Kapitel 2) im allgemeinen höher als bei Quadrupolmassenspektrometern, so daß generell für die Reproduzierbarkeit der Messungen bei der Gesamtstandardabweichung Schwankungen von 5-10 % erwartet werden müssen.

#### **5.1.2.2. Vergleich der offline- und HPLC-NMR-Messungen**

Die offline  $^1\text{H}$  NMR wird meistens zur Strukturaufklärung von unbekanntem Metaboliten eingesetzt. Die Aufreinigung der metabilitenhaltigen Extrakte und das Vermessen im offline  $^1\text{H}$  NMR nahm jedoch relativ viel Zeit in Anspruch (mehrere Tage). Durch das wiederholte Schneiden der Metaboliten mit der HPLC konnte ein Großteil der Matrixbestandteile abgetrennt werden, wodurch nur geringe Signalüberlagerungen von Verunreinigungen und Metaboliten im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum auftraten.

Zur Strukturaufklärung von mehreren Metaboliten in einem Extrakt bietet sich die HPLC-NMR-Kopplung an, da die Probenvorbereitung deutlich weniger zeitaufwendig ist. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation getestet werden, welche Resultate die HPLC-NMR im Vergleich zur offline  $^1\text{H}$  NMR liefert. Die Extrakte mußten für die HPLC-NMR nicht so aufwendig aufgereinigt werden, da ein Großteil der Matrixbestandteile durch die Chromatographie abgetrennt worden ist. Dennoch wurden manche Signale des aliphatischen Molekülgerüsts im  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum durch Matrixinterferenzen überlagert, so daß eine eindeutige Zuordnung dieser Signale nicht immer möglich war. Im LC-Probenkopf konnten im Stopped-Flow-Betrieb weniger Spektren als bei der offline  $^1\text{H}$  NMR akkumuliert werden, da sonst die chromatographische Auflösung der restlichen Substanzen durch Diffusionsverbreiterung auf der chromatographischen Säule verloren gegangen wäre. Die Nachweisgrenzen im Stopped-Flow-Betrieb der HPLC-NMR sind dadurch im Vergleich zu den offline  $^1\text{H}$  NMR-Messungen höher.

Im offline  $^1\text{H}$  NMR konnten neben den Hauptmetaboliten M2-I und M5-I noch zwei Nebenisomeren (M2-II und M5-II) identifiziert werden, während bei den HPLC-NMR-Messungen nur das Nebenisomer M2-II detektiert wurde. Die Konzentration der Nebenisomeren war für die HPLC-NMR so hoch, daß selbst die Methoxygruppen vom Nebenisomer M2-II und die Verknüpfungsposition mit der Glucuronsäure im 2D

WET NOESY Experiment eindeutig zugeordnet werden konnten, was im offline  $^1\text{H}$  NMR aufgrund zu geringer Substanzkonzentration der Nebenisomeren nicht möglich war.

Bei der HPLC-NMR wurde eine andere Lösemittelzusammensetzung gewählt, die unter Umständen zu identischen chemischen Verschiebungen der Isomeren M5-I und M5-II geführt haben könnte, so daß zwischen diesen Isomeren im HPLC-NMR nicht unterschieden werden konnte. Die Lösemittelzusammensetzung hatte auch große Auswirkungen auf die Signalbreite. Während in deuteriertem Acetonitril eine starke Signalverbreiterung für die aliphatischen Protonen in Nachbarschaft zum Stickstoff beobachtet wurde, konnte durch Zusatz von wenig  $\text{D}_2\text{O}$  (4 %) die Signalverbreiterung deutlich reduziert werden. Im Acetonitril/ $\text{D}_2\text{O}$ -Gemisch (25/75 (v/v)) wurde die Signalverbreiterung auch beobachtet. Wahrscheinlich ist die Signalverbreiterung auf eine Pseudorotation am Stickstoff, die zu einem mittelschnellen Austausch der Protonen in Lösung bei Raumtemperatur führt, zurückzuführen.

Die Lösemittelzusammensetzung kann also entscheidende Auswirkungen auf die chemischen Verschiebungen und Signalbreiten der untersuchten Substanzen im  $^1\text{H}$  NMR haben. Für die Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen ist deshalb eine Änderung der Lösemittelzusammensetzung im Verlauf der  $^1\text{H}$  NMR Messungen empfehlenswert.

### 5.1.3. Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der eingesetzten Analysemethoden

Abschließend sind in Tab. 24 die Vor und Nachteile der eingesetzten Analysemethoden zusammengestellt.

**Tab. 24:** Vor- und Nachteile der eingesetzten Analysemethoden

Methode	Vorteile	Nachteile
<b>SPE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hoher Anreicherungsfaktor erzielbar</li> <li>• prinzipiell automatisierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zeitaufwendige Probenvorbereitung</li> </ul>
<b>MSPD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hoher Anreicherungsfaktor erzielbar</li> <li>• hohe Wiederfindungen im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zeitaufwendige Probenvorbereitung</li> </ul>
<b>RAM-Säulenschaltung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• automatisierbar, daher minimaler Zeitaufwand für Probenvorbereitung</li> <li>• Matrix- und Proteinabtrennung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• geringere Empfindlichkeit: Analytanreicherung nur begrenzt möglich, da nur ein geringes Probenvolumen aufgearbeitet werden kann</li> </ul>
<b>MISPE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• teilweise hohe Selektivität gegenüber Analyt</li> <li>• Sorbens relativ einfach und kostengünstig herstellbar</li> <li>• prinzipiell automatisierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hoher Zeitaufwand für Probenvorbereitung</li> <li>• geringere Empfindlichkeit, da Analytanreicherung nur begrenzt möglich</li> <li>• Blindwerte des Imprintanalyten</li> </ul>
<b>RAM-MIP-Säulenschaltung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vollständig automatisierbar</li> <li>• Probenvorbereitung minimal</li> <li>• teilweise hohe Selektivität für Targetanalyt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• geringere chromatographische Auflösung</li> <li>• Blindwerte von Targetanalyt durch Imprintprozeß</li> </ul>
<b>in-tube SPME</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vollständig automatisierbar mit kommerziell vertriebenen Geräten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• geringere Empfindlichkeit</li> </ul>
<b>HPLC-MS<sup>n</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sehr viel Strukturinformation</li> <li>• hohe Empfindlichkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zwischen Strukturisomeren kann schlecht differenziert werden</li> <li>• für unpolare Substanzen nicht geeignet</li> </ul>
<b>HPLC-NMR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sehr viele Strukturinformationen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• geringe Empfindlichkeit</li> </ul>

## **5.2. Verapamilmetabolismus**

### **5.2.1. Chemische Stabilität und Speziesspezifität der gebildeten Metaboliten**

Insgesamt konnten 32 Phase-I-Metaboliten identifiziert werden, von denen die meisten in Lösung stabil sind. Carbinolamine und Hemiacetale, wie sie hier aus den Zellkulturüberständen der Kardiomyozyten und Hepatozyten der Ratte isoliert wurden (M22 und M23), sind hingegen in der Regel nur für Sekunden in der Lösung stabil. Eine Ausnahme stellt die Isolierung und Identifizierung des Carbinolamins von Meloxicam [25] und fluorinierten Propranololanaloga [26] dar. Das hier gefundene Carbinolamin ist demnach eine weitere Ausnahme. Das Formylamin und das Formiat sind hingegen stabile Verbindungen. Von den 32 identifizierten Phase-I-Metaboliten traten 18 auch als Phase-II-Konjugate auf. Theoretisch kann bei der Glucuronidierung die Verknüpfung am Stickstoff oder am Sauerstoff der Hydroxygruppe erfolgen. Die <sup>1</sup>H NMR-Messungen haben gezeigt, daß die Glucuronidierung bevorzugt am Sauerstoff der Hydroxygruppe an C-17 stattfindet. Im Falle der hydroxylierten Metaboliten M8, M12 und M13 und der hydroxylierten und zusätzlich demethylierten Metaboliten M29-M23 wäre zu prüfen, an welcher der beiden Hydroxylgruppen im Molekül sich die Verknüpfung mit der Glucuronsäure vollzieht. Wenn durch die Cytochrom P450-Enzyme eine zusätzliche Hydroxygruppe eingeführt wird, könnte diese gleichberechtigt von den Glucuronosyltransferasen konjugiert werden. Wenn sowohl eine O- als auch eine N-Glucuronidierung möglich ist, findet im Menschen, soweit untersucht (Metabolit M5), nur die O-Glucuronidierung statt.

Neben diesen O-Glucuroniden wurden auch am Stickstoff konjugierte Phase-II-Metaboliten identifiziert. Bei den beobachteten N-Glucuroniden ist eine alternative O-Glucuronidierung nicht möglich, da keine Hydroxygruppe vorhanden ist. Bei den N-Glucuroniden wird zwischen sekundären und tertiären Aminoglucuronide und quartären Ammoniumglucuroniden unterschieden. Bei den Metaboliten M1 und M6 handelt es sich um sekundäre Aminoglucuronide, beim Verapamilglucuronid um eine quartäre Ammoniumglucuronid. Bemerkenswert ist die Bildung des quartären N-Glucuronids und des N-Glucosids. Die Bildung der sekundären und tertiären Aminoglucuronide ist nur substanzabhängig, während die Bildung eines quartären

Ammoniumglucuronids wie dem des Verapamils auch speziesabhängig ist [33, 34, 44]. Die quartäre N-Glucuronidierung wurde primär beim Menschen und den Primaten beschrieben (für ca. 30 Substanzen), während sie in der Ratte eher selten ist. Das Thioconazolglucuronid zählt zu den wenigen quartären N-Glucuroniden, die aus dem Rattenurin nachgewiesen wurden.

Die Bildung von N-Glucosiden im Rattenorganismus ist sehr selten, und daher ist die Bildung des N-Glucosids des Metaboliten M3 bemerkenswert. Zu den wenigen Beispielen zählen das Phenobarbital N-Glucosid, das aus dem Mäuseurin nachgewiesen [156] und das Bromfenacglucosid, das aus Rattengallenflüssigkeit bestimmt wurde [39].

Fast alle dieser Konjugate traten auch als Phase-I-Metabolit auf. Ein Grund könnte die chemische Stabilität der Konjugate sein. Sekundäre und tertiäre N-Glucuronide sind schon unter physiologischen Bedingungen relativ instabil und zersetzen sich in leicht saurem Milieu. Es ist daher möglich, daß sich das N-Glucosid und das Norverapamilglucuronid unter den chromatographischen Bedingungen (pH = 6) zersetzt haben. Das quartäre Ammoniumglucuronid des Verapamils war unter den chromatographischen Bedingungen stabil. Die O-Glucuronide des Verapamils sind unter physiologischen Bedingungen recht stabil, zersetzen sich aber im sauren Milieu (pH < 5). Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen (pH = 6) sollten sie stabil sein. Die Stabilität der einzelnen Konjugate ist im Einzelfall zu prüfen. Da die Substanzen nicht als Referenzsubstanzen vorlagen, war dies leider nicht möglich. Ein weiterer Grund könnte eine Substratsättigung gewesen sein, wenn die Aktivität der UDP-Glucuronosyltransferasen zu gering war, um alle Phase-I-Metaboliten zu konjugieren. Da der Responsefaktor der Glucuronide wesentlich geringer ist als der der Phase-I-Metaboliten, könnte die verminderte Nachweisempfindlichkeit auch dafür verantwortlich gewesen sein, daß die Glucuronide der anderen Phase-I-Metaboliten nicht detektiert wurden.

### **5.2.2. Oxidationsmechanismen**

Die Oxidationsreaktionen von Cytochrom P450-Enzymen haben nur eine geringe Substratspezifität, d. h. daß die Funktionalisierungsreaktionen über verschiedene Mechanismen verlaufen können.

Bei Verapamil handelt es sich um ein tertiäres Amin. Durch den in der Literatur



beschriebenen Metabolismus werden primär demethylierte und dealkylierte Metaboliten gebildet [63, 66].

Obwohl die N-Demethylierung für tertiäre Amine relativ gut erforscht ist, konnte nicht geklärt werden, ob z. B. der Mechanismus der Verapamildemethylierung über eine  $\alpha$ -C-Oxidation oder über eine N-Oxidation mit folgender N-Oxid-Dealkylierung verläuft (siehe Kapitel 1)[18-22]. Allen Mechanismen ist gemeinsam, daß im Verlauf ein Carbinolamin gebildet wird (siehe Kapitel 1). Bislang konnte aber nur in wenigen Fällen das Carbinolamin als reaktive Zwischenstufe isoliert werden [25, 26].

Die Geschwindigkeit der N-Dealkylierung von tertiären Aminen nimmt im allgemeinen mit steigender Masse des Alkylrestes ab. So vollzieht sich eine N-Demethylierung im allgemeinen schneller als eine Abspaltung einer Ethyl-, Propyl- oder Butylgruppe vom Stickstoff [157]. Die N- und O-Demethylierung des Verapamils wurde von Nelson et al. und Nelson und Olsen [68, 69] sowie von Eichelbaum et al. untersucht [67]. Eichelbaum et al. bewiesen, daß sich die N-Dealkylierung des Verapamils genau umgekehrt verhielt. Im humanen Urin wurde als Hauptmetabolit der dealkylierte Metabolit M3 und nicht der N-demethylierte Metabolit M6 detektiert. Die Autoren postulierten, daß der N-gebundene Alkylrest schneller abgespalten wird als die N-gebundene Methylgruppe. Im Plasma wiederum wurde der demethylierte Metabolit M6 als Hauptmetabolit identifiziert, was den theoretischen Mechanismus wiederum bestätigt [64]. Offenbar gibt es für Verapamil unterschiedliche Metabolismuswege und damit verbundene Unterschiede zwischen den Oxidationsmechanismen. Eichelbaum et al. postulierten aufgrund ihrer identifizierten Metaboliten M34 und M35 eine Oxidation via Carbinolamin zum N-Formylamin, das in der Folge dann zum sekundären Amin zerfällt. Die isolierten N-Formylamin-Zwischenstufen stellten sich aber später als Artefakte heraus, die bei der Derivatisierung für die GC-MS-Untersuchungen entstanden waren. Das reaktive Carbinolamin konnte nicht isoliert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten die Intermediate M22 und M23 identifiziert werden, die erstmals die N-Demethylierung via Carbinolamin und N-Formylamin bewiesen.

In der Literatur wird beschrieben, daß die Bildung des Carbinolamins über einen aktivierten, dreiwertigen Cytochrom P450-Eisenkomplex verläuft, der ein Proton vom Substrat abstrahiert und in der Folge ein Hydroxyradikal auf das Substrat überträgt

[18]. Dieser Zwischenschritt wird nicht nur für die N-Demethylierung angenommen, sondern die O-Demethylierung [158] und die Hydroxylierung [159] sollen ebenfalls über diesen aktivierten Eisenkomplex verlaufen. Da bei den Metabolismusstudien in den Rattenkardiomyozyten das Halbacetal M26 und das Formiat M27 als Oxidationsvorläufer des O-Demethylverapamils M10 identifiziert wurden, scheint sich dieser Oxidationsmechanismus sowohl für die N- als auch für die O-Demethylierung zu bestätigen.

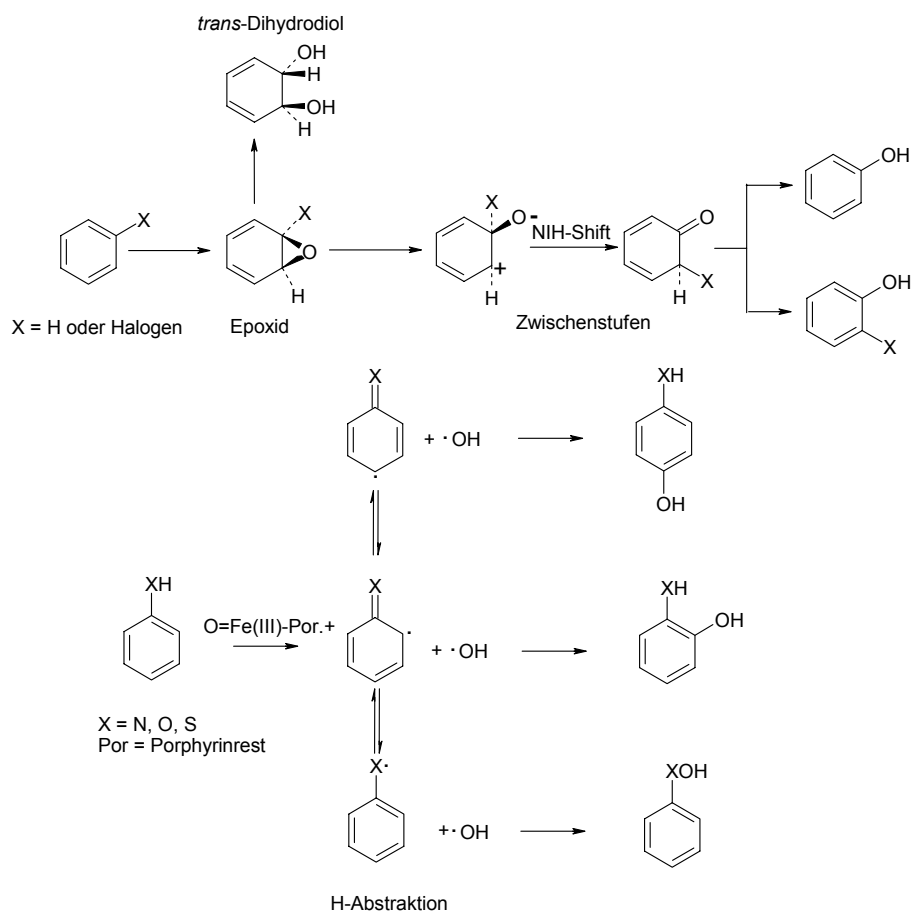
Die O-Demethylierung des Verapamils soll, wie von Nelson et al., in Lebermikrosomenlösungen der Ratte und des Menschen untersucht, primär am Kohlenstoff C-4 stattfinden [69].

Die  $^1\text{H}$  NMR Messungen im humanem Urin haben aber gezeigt, daß die O-Demethylierung mit anschließender Glucuronidierung sich primär am C-17 vollzieht. Das bedeutet entweder, daß die Glucuronidierung an C-17 gegenüber C-4 von den UDP-Glucuronosyltransferasen bevorzugt wird, oder das bei der O-Demethylierung von tertiären Aminen, wie Verapamil, noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Bei den neu identifizierten Metaboliten M12, M17 und M20 handelt es sich um hydroxylierte Metaboliten des Verapamils, während bei den Metaboliten M8, M16, M18, M19 und M29-M32 neben der Hydroxylierung zusätzlich eine Demethylierung stattgefunden hat. Die Metaboliten unterscheiden sich in der Position der Hydroxylierung oder Demethylierung und zeigen einen völlig neuen Metabolismusweg des Verapamils auf. Ob die Hydroxylierungen in Konkurrenz zur Demethylierung, vor oder nach der Demethylierung verlaufen, läßt sich aufgrund der Daten nicht eindeutig entscheiden, da alle dieser hydroxylierten Metaboliten in vergleichsweise geringen Konzentrationen gebildet wurden. Im Falle des Verapamils sind an der N- und an der O-Demethylierung primär die CYP-Isoformen 3A4, 3A5 und 2C8 beteiligt [70, 71]. Allerdings beschränkten sich die bislang durchgeführten Untersuchungen mit gereinigten Isoenzymen auf den Nachweis der Hauptmetaboliten. Es gibt noch keine Untersuchungen, welche Isoformen an den Hydroxylierungen beteiligt sind. Eine Studium der Hydroxylierung mit gereinigten CYP-Enzymen ist allerdings schwer möglich, da die Metaboliten nur in sehr geringen Konzentrationen im Vergleich zu den Hauptmetaboliten gebildet werden. Prinzipiell sind für die Hydroxylierung mehrere Mechanismen möglich. Die Hydroxylierung von

Aliphaten führt zu Alkoholen. Diese Reaktion verläuft wahrscheinlich auch über den dreiwertigen aktivierten Eisenkomplex, der schon bei der N- und O-Demethylierung postuliert wurde. Hydroxylierungen an aromatischen Systemen führen zu Phenolen und können über den gleichen Mechanismus verlaufen, wenn eine funktionelle Gruppe mit acidem Proton (z. B. NH, OH oder SH) am aromatischen Ring gebunden ist [160]. Alternativ kann die Reaktion über ein Epoxid (Arenoxid) verlaufen, das sich danach nicht-enzymatisch zum Phenol umlagert. Als Konkurrenzreaktion zur Umlagerung ist die enzymatische Hydrolyse zum trans-Dihydrodiol wichtig. Die Umlagerung zum Phenol verläuft über eine Carbonyl-Zwischenform (sogenannter NIH-Shift, da am National Institute of Health der USA erforscht). Allerdings verläuft diese Umlagerung meist nur, wenn ein elektronenziehender Substituent (wie z. B. ein Halogenatom) am Aromaten gebunden ist [161]. In Abb. 75 sind die möglichen Mechanismen der aromatischen Hydroxylierung dargestellt.

**Abb. 75:** Mögliche Mechanismen für die Hydroxylierung von Aromaten



Da beim Verapamilmetabolismus sowohl Hydroxylierungen an den aliphatischen

Strukturelementen als auch an den aromatischen Ringen stattfinden, können theoretisch mehrere Mechanismen auftreten. Bei den Metaboliten M8, M12, M13, M16, M18, M21, M22, M31 und M32 hat eine Hydroxylierung im aliphatischen Teil des Moleküls stattgefunden. Eine Hydroxylierung über H-Abstraktion und Hydroxyradikaltransfer vom aktivierten dreiwertigen Eisenkomplex ist daher wahrscheinlich. Bei den Metaboliten M19, M20 und M30 wurde wahrscheinlich der Aromatenring B hydroxyliert. Bei den Metaboliten M19 und M30 hat zusätzlich eine Demethylierung einer Methoxygruppe am Aromatenring stattgefunden. Für M30 wäre eine H-Abstraktion von der freistehenden Hydroxygruppe an C-17 vom dreiwertigen aktivierten Eisenkomplex mit anschließendem Hydroxyradikaltransfer in ortho-Position an C-16 denkbar. Demnach würde die O-Demethylierung vor der Hydroxylierung stattfinden. Für M20 und M30 kann die Hydroxylierung auch über einen anderen Mechanismus verlaufen, da am Aromaten keine Hydroxygruppe gebunden ist. Da sowohl die N- und die O-Demethylierung als auch die aliphatische und teilweise auch die aromatische Hydroxylierung über den dreiwertigen aktivierten Eisenkomplex verlaufen können, nimmt dieser Zwischenschritt eine Schlüsselstellung beim Metabolismus des Verapamils ein.

### **5.2.3. Gewebespezifischer Metabolismus**

#### **5.2.3.1. Metabolismus in der Leber**

Die meisten Metaboliten wurden in den Zellkulturüberständen der Rattenhepatozyten und im humanen Urin nachgewiesen. In den anderen untersuchten Matrices wie Lebermikrosomen oder Zellkulturüberständen aus humanen Hepatozyten wurden deutlich weniger Metaboliten detektiert.

Daß in den Lebermikrosomenlösungen qualitativ und quantitativ deutlich weniger Metaboliten gebildet werden als in der Zellkultur, ist verwunderlich, da die Cytochrom P450-Enzyme in Mikrosomenlösungen meist in höheren Konzentrationen vorliegen.

Der Grund liegt wahrscheinlich in der Menge an Probenvolumen, die aufgearbeitet wurde. Die Zellkulturüberstände wurden gepoolt und anschließend aufgearbeitet, so daß die Metaboliten aus mehreren 100 ml Kulturüberstand auf ein kleines Volumen aufkonzentriert werden konnten, wodurch eine hohe Nachweisempfindlichkeit erzielt wurde. Bei der Untersuchungen der Rattenlebermikrosomen, der humanen Lebermikrosomen und den Zellkulturüberständen der humanen Hepatozyten stand weniger

Probenmaterial (8-30 ml) zur Verfügung, so daß nur die Hauptmetaboliten nachgewiesen werden konnten.

Eine Anreicherung von Verapamil und seinen Metaboliten in den Zellen ist theoretisch möglich, was zu einer Verminderung der detektierten Konzentration in den Zellkulturüberständen führen würde. Auch eine Ad- oder Absorption des Verapamils und seinen Metaboliten auf der Kollagenschicht in der Zellkultur ist theoretisch möglich und würde auch zu verminderten Analytkonzentrationen in den Zellkulturüberständen führen.

Für die meisten Phase-I- und alle Phase-II-Metaboliten ist aber eine Anreicherung in den Zellen aufgrund ihrer Polarität vernachlässigbar, da sie aufgrund ihrer Polarität die Membranbarrieren nicht überwinden können (sofern keine Proteine am Transport beteiligt sind).

Bei der Aufarbeitung des humanen Urins wurde ein großes Probenvolumen Urin gepoolt, aufgearbeitet und die Extrakte auf ein Volumen von wenigen µl eingeeengt. So konnte ein großer Anreicherungseffekt und eine hohe Nachweisempfindlichkeit erzielt werden.

Die Metaboliten M1-M15 wurden sowohl aus dem humanen Urin als auch aus den Zellkulturüberständen von Rattenhepatozyten nachgewiesen, während die Metaboliten M16-M25 in den Hepatozyten der Ratte und die Metaboliten M28-M32 nur im humanen Urin detektiert wurden. Insgesamt wurden im humanen Urin mehr Phase-II-Konjugate identifiziert als in den Zellkulturüberständen der Rattenhepatozyten. Da vor der Ausscheidung Verapamil in einer hohen Dosis (80 mg) aufgenommen wurde, ist es nicht weiter verwunderlich, daß ein Großteil der Metaboliten als Phase-II-Konjugate im Urin ausgeschieden wurden, da es sich um den natürlichen Ausscheidungsweg handelt. Prinzipiell ist auch die biliäre Ausscheidung der Glucuronide möglich, und das einzige bislang nachgewiesenen Norverapamilglucuronid wurde auch aus der Galle nachgewiesen [73]. Ein Teil der gebildeten Glucuronide könnte so nicht erfaßt worden sein, da auf einer Untersuchung der Galle oder des Faeces verzichtet wurde.

Daß die Metaboliten M28-32 aber exklusiv im humanem Urin identifiziert wurden, ist ein Hinweis darauf, daß an der Bildung dieser Metaboliten Enzyme beteiligt sind, die ausschließlich im Menschen, nicht aber in der Ratte exprimiert werden. Neben

diesem Speziesunterschied könnte auch die Organspezifität für den unterschiedlichen Metabolismus verantwortlich sein. Nach oraler Applikation und Passage durch Magen und Darm gelangt der Wirkstoff sofort in die Leber, wo er metabolisiert und in der Folge wiederum über den Blutkreislauf zu den anderen Organen, wie Niere, Darm oder Lunge gelangt, die auch metabolisch aktiv sind. In den Zellkulturüberständen der Rattenhepatozyten kann ausgeschlossen werden, daß Enzyme anderer Organe am Stoffwechsel mitwirken, für die detektierten Metaboliten im Urin jedoch nicht.

Der stereoselektive Metabolismus wurde in Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten untersucht. Es war zwar schon bekannt, daß das S-Enantiomer stärker verstoffwechselt wurde als das R-Enantiomer. Es konnte aber gezeigt werden, daß in den Zellkulturen der Rattenhepatozyten auch primär das S-Enantiomer konjugiert wurde. Das S/R-Verhältnis in den Zellkulturen der Glucuronide M2 (1.3) und M5 (1.1), war geringer als das S/R-Verhältnis der Glucuronide M2 (3) und M5 (1.5), das mit der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie (siehe Kapitel 0) bestimmt wurde. Durch Speziesunterschiede im Metabolismus (unterschiedliche Enzymaktivitäten) zwischen Ratte und Mensch könnten diese Differenzen erklärt werden.

#### **5.2.3.2. Metabolismus im Herzen und den Endothelzellen**

Thum und Borlak haben gezeigt, daß in den verschiedenen Herzregionen Cytochrom-P450-Enzyme exprimiert werden [13, 143]. Da über den Metabolismus von Arzneistoffen im Herzen noch wenig bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Dissertation der Metabolismus von Verapamil in Zellkulturüberständen von primären adulten calciumtoleranten Rattenkardiomyozyten und humanen Herzmikrosomenlösungen untersucht werden, die aus OP-Resektaten gewonnen wurden.

Herzmedikamente wie das Verapamil, die für eine orale Langzeitherapie eingesetzt werden, sollten besonders sicher und gut verträglich sein, da sie über einen langen Zeitraum, vielleicht sogar zusätzlich zu anderen Medikamenten einzunehmen sind. Für Verapamil wurden in Kapitel 1 eine ganze Reihe von Nebenwirkungen beschrieben, darunter relativ harmlose wie Übelkeit und Probleme im Magen-Darm Trakt. Gerade Langzeitstudien lassen aber einen Zusammenhang mit bösartigen Erkrankungen, wie Darm und Brustkrebs vermuten (siehe Kapitel 1). Es ist nicht auszuschließen, daß ein gewisser Anteil dieser Nebenreaktionen auf biologisch

aktive Stoffwechselprodukte des Verapamils zurückzuführen sind.

Aus den Zellkulturüberständen der Rattenkardiomyozyten und den humanen Herzmikrosomenlösungen konnten 8 Metaboliten identifiziert werden, was beweist, daß das Herz befähigt ist, Arzneistoffe zu metabolisieren. Unter den 8 Metaboliten waren 5 Metaboliten, die noch nie vorher identifiziert wurden, darunter die Oxidationsvorläufer M22, M23, M26, M27 und das Hydroxyverapamil M12. Inwieweit die neu identifizierten Metaboliten eine erhöhte biologische Aktivität besitzen, und damit einen Beitrag zu den unter Kapitel 1 beschriebenen Nebenreaktionen leisten können, ist noch zu prüfen. Im Herzgewebe der Ratte hat sich sogar nach 2 h mehr Norverapamil als Verapamil angereichert, daneben konnten noch die O-demethylierten Metaboliten M7 und M9 in vergleichsweise hohen Konzentrationen detektiert werden. Von den polareren Metaboliten wurde keiner im Herzgewebe der Ratte gefunden. Offenbar ist die Polarität der Metaboliten M1-M3 und der Glucuronide zu hoch, um die Membranbarriere zu überwinden. Die Polarität der hydroxylierten Metaboliten ist mit denen der O-demethylierten und O,O- und N,O-demethylierten Metaboliten vergleichbar. Da sich die O-demethylierten Metaboliten in ausreichenden Konzentrationen im Gewebe anreichern, ist eine Anreicherung der hydroxylierten Metaboliten im Gewebe nicht auszuschließen. Die geringe Konzentration im Rattenherzen könnte dafür verantwortlich sein, daß diese Metaboliten nicht detektiert wurden. Obwohl die gebildeten Metabolitenkonzentrationen in den Zellkulturen der Rattenkardiomyozyten und den humanen Herzmikrosomen auch vergleichsweise gering waren, ist nicht zu vernachlässigen, daß nur ein kleiner Teil des gesamten Herzmaterials verwendet wurde und daß die Menge an gebildeten Metaboliten im gesamten intakten humanen Organ um einige Größenordnungen höher sein könnte.

Es ist auch zu berücksichtigen, daß die humanen Herzmikrosomen aus transplantiertem Zellmaterial erkrankter Herzen gewonnen wurden, so daß die Aktivität der metabolisierenden Enzyme durchaus vermindert hätte sein können.

Aus den humanen Endothelzellen konnten 5 Metaboliten identifiziert werden. Wie bei den humanen Herzmikrosomen und den Rattenkardiomyozyten wurden die Metaboliten nur in geringen Konzentrationen gebildet.

Das Endothel kleidet als einzellige Schicht die Blutgefäße von innen aus. Mit einer Fläche von 1000 m<sup>2</sup> gehört es zu den größten Organen des menschlichen

Organismus. Es bildet nicht nur eine Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand, sondern setzt u. a. eine Reihe von Substanzen frei, welche die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen, die Durchlässigkeit des Gewebes, die Fließeigenschaften des Blutes, das Gefäßwachstum, die Blutgerinnung und die intrazellulären Wechselwirkungen im vaskulären System beeinflussen.

Eine Schädigung des Endothels kann u. a. zu Arteriosklerose und Thrombosen bis zu Herzversagen führen (endotheliale Dysfunktion) [1]. Bei einer Langzeittherapie des Bluthochdrucks mit Calciumantagonisten ist deshalb darauf zu achten, daß das Endothel nicht nachhaltig geschädigt wird. Metaboliten der Calciumantagonisten, die im Endothel gebildet werden, könnten zu schädlichen Nebenwirkungen beitragen.

Von den gebildeten Metaboliten besitzt nur der Metabolit M6 eine signifikante physiologische Aktivität. Es ist aber nicht zu vernachlässigen, daß im Organismus durch die große Oberfläche des Endothels weit mehr Metaboliten dieses Calciumantagonistens gebildet werden, deren Konzentration in der Zellkultur zu gering ist, um detektiert zu werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß Verapamil sowohl in Herzzellen von Ratte und Mensch als auch in Kulturen humaner Endothelzellen metabolisiert wird. Die gebildeten Metaboliten könnten zum Verständnis der therapeutischen Ineffizienz und des Auftretens zahlreicher Nebenwirkungen beitragen.

### **5.2.3.3. Pharmakokinetikmessungen und Metabolismus in der Lunge**

Der Metabolismus des Verapamils wurde in alveolarepithelialen Typ II-Zellen und mikrosomalen Membranen der Schweine- und Rattenlunge untersucht. Ferner wurden die Pharmakokinetiken von Verapamil aus dem Plasma und dem Lungengewebe für verschiedene Spezies nach intravenöser und inhalativer Applikation und die Metaboliten aus dem Plasma und Lungengewebe bestimmt. Es konnten Speziesunterschiede beim Verapamilmetabolismus in der Lunge festgestellt werden.

Im Plasma von allen Spezies wurden nur geringe Konzentrationen von ausschließlich Phase-I-Metaboliten detektiert. Theoretisch können im Lungengewebe auch Phase-II-Konjugate gebildet und an das Blut abgegeben werden. Eine Rückresorption über die Epithelschichten ist aber wegen zu hoher Polarität der Konjugate nicht möglich. Eine verminderte Nachweisempfindlichkeit kann dafür verantwortlich sein, daß keine



Phase-II-Konjugate detektiert wurden. Die Daten aus den in-vivo-Messungen werden durch die Daten aus den in vitro-Experimenten unterstützt. In den mikrosomalen Lungenmembranen des Schweines wurden nach Inkubation mit Verapamil verschiedene Metaboliten detektiert, darunter auch Phase-II-Konjugate, was beweist, daß die Bildung von Phase-II-Metaboliten in der Lunge möglich ist. Daß sich bei den unterschiedlichen untersuchten Spezies das Metabolitenspektrum teilweise unterscheidet, könnte auf unterschiedliche Cytochrom P450-Isoformen in den Spezies zurückzuführen sein. Zum Metabolismus des Verapamils im Menschen und in der Ratte liegen zahlreiche Daten vor. Die Untersuchungen zeigen, daß am Metabolismus des Verapamils die CYP-Isoformen CYP 3A4, CYP 3A5 und CYP 2C8 und ferner die Isoformen CYP 1A2, CYP 2D6 und CYP 2E1 beteiligt sind [70, 71]. Der Abbau des Verapamils im Minipig wurde vorher noch nicht untersucht. Studien haben aber gezeigt, daß es bei den CYP-Familien 2A, 3A und 2C starke Ähnlichkeiten zwischen Schwein und Mensch gibt [162-164]. Die Übereinstimmungen im Metabolitenspektrum könnten somit durch die Ähnlichkeiten der CYP-Isoformen in beiden Spezies erklärt werden. Die Unterschiede im Metabolitenspektrum zwischen Ratte und Affe nach inhalativer Inhalation lassen sich durch unterschiedliche CYP-Expressionen in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge erklären. Während bei der Ratte die CYP-Isoformen 1A1 und 2B am stärksten im Parenchym exprimiert werden, wird die Isoform 2E1 am stärksten in den Luftwegen exprimiert. Beim Cynomolgus-Affen werden hingegen keine Unterschiede in der CYP-Expression für die Isoformen 1A1 und 2B in den unterschiedlichen Lungenkompartimenten beobachtet. Die Aktivität der Isoform 2E1 ist in den distalen Bronchiolen höher als in den proximalen Atemwegen [165].

Bei beiden Applikationsformen (intravenös und inhalativ) wird die erste Passage durch den Magen-Darm-Trakt und die Leber umgangen, was der Grund dafür ist, daß nur wenige Metaboliten in geringen Konzentrationen gebildet werden. Nach inhalativer Applikation können aber die Cytochrom P450-Enzyme in der Lunge das Verapamil metabolisieren. Da aber nur ein kleiner Teil der applizierten Dosis die Alveolen erreicht, könnten die detektierten Metaboliten nach inhalativer Applikation durch Verschlucken des im Rachenraum abgeschieden Verapamils mit anschließender Metabolisierung nach Passage durch den Magen-Darm-Trakt gebildet worden sein. Da die Metaboliten nur in sehr geringen Konzentrationen

gebildet wurden, kann auch die Nachweisempfindlichkeit dafür verantwortlich sein, daß einige Metaboliten nicht in ausreichendem Maße detektiert wurden.

Nach Aufnahme der Pharmakokinetiken konnten die pharmakokinetischen Parameter berechnet werden. Nach inhalativer Applikation zeigten die Plasma- und Lungenspiegel einen zu erwartenden Verlauf: Anfluten der Konzentration während der Expositionsphase und anschließend ein Abklingen der Konzentration durch Metabolisierung und Verteilung. Die Eliminationskonstanten nach inhalativer und intravenöser Applikation waren vergleichbar. Die Bioverfügbarkeiten waren für alle untersuchten Spezies sehr gut.

Der Anstieg der Verapamilplasmaspiegel nach inhalativer Applikation lassen auf einen schnellen Transfer des Wirkstoffs vom Epithelgewebe ins Blut vermuten. Gerade bei hypertonen Krisen ist ein schneller Wirkstofftransport zum Zielorgan erforderlich. Da eine systemische Applikation meist nur intensivisch durchführbar ist, stellt die inhalative Applikation in Form eines Spray-Aerosols möglicherweise eine sinnvolle Alternative zur systemischen Applikation dar.

#### **5.2.3.4. Diskussion der verwendeten Modellsysteme**

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sowohl bei den untersuchten Matrices der Ratte als auch des Menschen weitestgehend das gleiche Metabolitenspektrum gebildet wird. Es werden die gleichen Hauptmetaboliten gebildet, bei den neu identifizierten Metaboliten gibt es teilweise Unterschiede. Das Metabolitenspektrum, das in den Zellkulturüberständen der Rattenkardiomyozyten gebildet wurde, ist mit dem aus humanen Herzmikrosomen identisch.

Die Metaboliten, die in den Zellkulturen kultivierter humaner Hepatozyten detektiert wurden, sind auch im humanen Urin nachgewiesen worden. Das nicht alle im humanem Urin detektierten Metaboliten in den in vitro Zellkulturen der humanen Hepatozyten nachgewiesen wurden, ist wahrscheinlich auf eine verminderte Nachweisempfindlichkeit aufgrund geringerer Analytanreicherung zurückzuführen.

Das in vitro-Modell aus Zellkulturen von humanen Hepatozyten liefert eine gute Übereinstimmung mit den in vivo-Daten aus dem humanen Urin, was für die Bewertung und klinische Entwicklung von Arzneistoffen erforderlich ist.

Zu einem besseren Vergleich des in vivo- und in vitro gebildeten Metabolitenspektrums in der Ratte mit dem in vivo gebildeten Metabolitenspektrum im Menschen

wäre die Untersuchung der Metaboliten in Rattenurin noch geeigneter. Ein Vorteil wäre, daß die Tiere vergleichsweise viel höher dosiert werden können als der Mensch und die ausgeschiedenen Metaboliten im Urin in viel höheren Konzentrationen vorlägen, was zusätzlich die Strukturaufklärung mit Hilfe der  $^1\text{H}$  NMR erheblich erleichtern würde.

Neben Affen, die wegen ihrer hohem genetischen Ähnlichkeit mit dem Menschen für Metabolismusstudien bereits seit langem eingesetzt werden, fand hier auch das Minipig für Pharmakokinetikmessungen als weiteres Modellsystem Anwendung.

Als Modellsystem für Metabolismusstudien ist es noch nicht so etabliert wie die Ratte. Studien haben aber gezeigt, daß die exprimierten metabolisierenden Enzyme im Schwein eine Übereinstimmung mit denen der Menschen zeigen [162-164]. Aufgrund dieser Daten scheint das Schweinmodell für Metabolismusuntersuchungen durchaus geeignet. Es konnte kein direkter Speziesvergleich zwischen Schwein und Mensch hinsichtlich des Metabolismus gezogen werden, da unterschiedliche Matrices untersucht wurden, dafür aber zwischen Schwein und Ratte. Bei beiden Spezies unterschied sich das identifizierte Metabolitenspektrum aus den Zellkulturüberständen der Typ II-Zellen und den mikrosomalen Membranen der Lunge sowie dem Plasma. Ob diese Unterschiede auf Speziesunterschiede oder auf eine verminderten Nachweisempfindlichkeit zurückzuführen sind, kann nicht eindeutig entschieden werden, da die Metaboliten in nur sehr geringen Konzentrationen gebildet wurden.

Vergleicht man das in vitro und in vivo gebildete Metabolitenspektrum in allen untersuchten Spezies, so fällt auf, daß im Plasma aller untersuchten Spezies die N- und O-dealkylierten Metaboliten mit Norverapamil als Hauptmetabolit auftreten.

Diese Unterschiede im Metabolitenspektrum machen deutlich, daß für die Bewertung des Metabolismus von Arzneistoffen das Testen von unterschiedlichen Spezies unbedingt erforderlich ist, wenn gleich die Speziesunterschiede beim Verapamil-metabolismus im Vergleich zum Metabolismus anderer Arzneistoffe, wie dem Diltiazem, vergleichsweise gering sind [169].

## 6. Zusammenfassung

Verapamil ist ein Calciumantagonist, der schon seit vielen Jahren auf dem Arzneimittelmarkt ist. Der Arzneistoff wird nach oraler Applikation stark metabolisiert, was zu einer pharmakologischen Inaktivierung führt. Gleichzeitig werden aber auch starke Nebenwirkungen beschrieben, die auf biologische aktive Metaboliten des Arzneistoffs zurückzuführen sein können. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation der Metabolismus des Verapamils in unterschiedlichen biologischen Matrices verschiedener Spezies untersucht werden. Der Metabolismus wurde in Zellkulturüberständen aus Hepatozyten von Ratte und Mensch, aus Lebermikrosomen von Ratte und Mensch sowie aus humanem Urin bestimmt. Ein Schwerpunkt lag vor allem auch auf der Untersuchung des Metabolismus im Herz- und Gefäßsystem, über den noch wenig bekannt ist. Hierzu wurden Zellkulturen aus Rattenkardiomyozyten und Mikrosomen von Ratte und Mensch mit dem Wirkstoff inkubiert. Desweiteren wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht, inwieweit eine inhalative Applikation als Alternative zur oralen Applikation denkbar ist. Hierzu wurde der Plasmaspiegel des Verapamils und seinen Metaboliten nach intravenöser und inhalativer Applikation beim Schwein, dem Affen und der Ratte und zusätzlich die Lungengewebespiegel nach inhalativer und intravenöser Applikation bei der Ratte bestimmt.

Für das Studium des Metabolismus in den unterschiedlichen Matrices wurden für die Probenvorbereitung etablierte Methoden wie die SPE eingesetzt. Ein Schwerpunkt dieser Dissertation lag jedoch auf der Entwicklung von neuen Analysemethoden für Metabolismusstudien mit biologischem Material. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, daß die Säulenschaltung mit einer mit einem "Restricted Access Material" (RAM) gepackten Vorsäule wie Alkyl-Diol-Silica (ADS) als alternative Probenvorbereitungsverfahren für biologische Proben für Metabolismusuntersuchungen geeignet sind. Es konnten mit diesem Verfahren sowohl Phase-I-Metaboliten als auch sehr polare Phase-II-Metaboliten isoliert werden. Der größte Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Festphasenextraktion SPE ist die höhere Selektivität der Analytabtrennung bei gleichzeitiger Automatisierbarkeit, durch die die Gesamtanalysenzeit erheblich verkürzt werden konnte. Die Präzision der Methode war so gut, daß sie für die Routinemessung von Pharmakokinetiken eingesetzt werden konnte.

Auch die "in-tube SPME" (Solid Phase Microextraction) wurde für Metabolismusstudien weiterentwickelt. Die Extraktionseffizienz und Nachweisempfindlichkeit der polaren Polypyrrol-Kapillarbeschichtung waren ausreichend, um die polaren Phase-I-Metaboliten und selbst Phase-II-Konjugate aus verschiedenen biologischen Matrices zu isolieren. Die Empfindlichkeit und Präzision der Methode in Kopplung mit der HPLC-MS waren ausreichend, um Verapamil und seine Hauptmetaboliten aus verschiedenen biologischen Matrices zu quantifizieren und um für Pharmakokinetikmessungen eingesetzt werden zu können. Der Vorteil der in-tube SPME ist, daß sie mit den meisten kommerziell vertriebenen HPLC-Geräten automatisierbar ist und wie bei der RAM-Säulenschaltung die Analysenzeit erheblich verkürzt werden kann. Der Einsatz der in-tube SPME für Metabolismusstudien des Verapamils stellt die erste Applikation in der Metabolismusforschung dar.

Die "Matrix Solid Phase Dispersion" (MSPD) wurde für die Routineanalytik von Organproben für Metabolismusuntersuchungen entwickelt. Mit Hilfe der MSPD konnten die wichtigsten Hauptmetaboliten aus dem Gewebe isoliert werden. Die Präzision der Methode war so gut, daß sie ebenfalls für Pharmakokinetikmessungen eingesetzt werden konnte.

Außerdem konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, daß sich der Einsatz der molekular geprägten Polymere (Molecular Imprinted Polymers: MIP) in Form der "Molecular Imprinted Solid Phase Extraction" (MISPE) und der online-Säulenschaltung durch Kopplung mit der HPLC mit einer RAM-Vorsäule und einer MIP-Mikrosäule sich auch für die selektive Extraktion von Arzneistoffen und ihrer Metaboliten eignet.

Die Strukturaufklärung der Metaboliten erfolgte mit der HPLC-MS<sup>n</sup> Technik und ergänzend mit der <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie.

Die HPLC-MS<sup>n</sup> mit Ionisierung im Positiv-ESI war eine empfindliche Methode zur Bestimmung der Phase-I- und vor allem der Phase-II-Metaboliten des Verapamils. Die stufenweise Fragmentierung im MS<sup>n</sup>-Modus des Ionenfallenmassenspektrometers war für die Strukturaufklärung der Verapamilmetaboliten sehr gut geeignet, da bei der Fragmentierung strukturspezifische Bindungsbrüche auftraten. Aus diesen Bindungsbrüchen konnte ein allgemeines Fragmentierungsschema für Verapamil und seine Metaboliten abgeleitet werden. Bei der Strukturaufklärung der Metaboliten nahmen insbesondere die Neutralverluste eine Schlüsselstellung ein.

Eine eindeutige Zuordnung der Metaboliten, insbesondere der Phase-II-Konjugate, war nur mit der 2D  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie möglich. In dieser Dissertation wurden sowohl die offline  $^1\text{H}$  NMR und die online HPLC  $^1\text{H}$  NMR für die Strukturaufklärung der Hauptglucuronide im humanem Urin eingesetzt. Beide Meßverfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die online HPLC  $^1\text{H}$  NMR hat aber den Vorteil, daß die wesentlichen Strukturinformationen relativ schnell ohne aufwendige Probenvorbereitung erhalten werden können.

Insgesamt konnten so die Strukturen von 32 Metaboliten, von den 18 als Phase-II-Konjugate vorlagen, bestimmt werden. Von diesen 32 Phase-I-Metaboliten sind 16 noch nie direkt nachgewiesen worden.

Von den identifizierten Phase-I-Metaboliten sind vor allem die hydroxylierten (M12, M13, M17, M20, M21, M22, M25) und hydroxylierten sowie zusätzlich demethylierten Metaboliten (M8, M18, M19, M29-M32) hervorzuheben, da sie erstmals identifiziert wurden und einen völlig neuen Metabolismusweg des Verapamils aufzeigen.

Anhand der in den Zellkulturen der Rattenkardiomyozyten identifizierten Zwischenstufen M22 und M23 konnte erstmals der Mechanismus der N-Demethylierung während der Metabolisierung des Verapamils eindeutig beschrieben werden.

Von den 18 beschriebenen Phase-II-Konjugaten sind 17 noch nie direkt beschrieben worden. Mit Hilfe der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß bei zwei konkurrierenden Bindungsstellen zumindest die O-Glucuronidierung im Vergleich zur N-Glucuronidierung im Menschen bevorzugt wird.

Von den identifizierten N-Konjugaten sind das quartäre N-Glucuronid des Verapamils und das N-Glucosid bemerkenswert, da sie u. a. in Zellkulturüberständen von primären Rattenhepatozyten nachgewiesen wurden, obwohl die Bildung dieser Verbindungsklassen in der Ratte nur selten vorkommt.

Außerdem wurde der stereoselektive Metabolismus des Verapamils in Zellkulturen primärer Rattenhepatozyten untersucht. Es war zwar bekannt, daß das S-Enantiomer gegenüber dem R-Enantiomer bevorzugt biotransformiert wird. In der vorliegenden Dissertation konnte aber erstmals auch gezeigt werden, daß bei der Glucuronidierung auch bevorzugt das S-Enantiomer konjugiert wird.

Als weitere Ergebnisse aus den Metabolismusstudien bleibt festzuhalten, daß Verapamil nicht nur in Leberzellkulturen stark verstoffwechselt wird, sondern daß auch am Zielorgan, dem Herz- und Gefäßsystem, eine Metabolisierung stattfindet.

Es zeigte sich, daß die die wichtigsten Hauptmetaboliten (M3, M7, M9) und sogar neue, bis dahin unbekannte Strukturen (M8, M22, M23, M26, M27) im Herzen und in den Endothelzellen die Metaboliten M1, M3, M6, M7 und M9 gebildet werden. Die große Zahl an neuen Metaboliten und die gebildeten Metaboliten im Zielorgan, im Tiermodell und beim Menschen können zur Aufklärung und zum Verständnis von Nebenwirkungen des Verapamils im Organismus beitragen.

Desweiteren wurden im Rahmen dieser Dissertation der Metabolismus und die Pharmakokinetik des Verapamils nach inhalativer Applikation in unterschiedlichen Spezies untersucht. In allen untersuchten Spezies wurden die Metaboliten nur in sehr geringen Konzentrationen (im Vergleich zur oralen Applikation) gebildet. Nach inhalativer Applikation zeigten die Plasma- und Lungengewebespiegel bei allen untersuchten Spezies einen zu erwartenden Verlauf: Anflutung während der Expositionsphase und anschließendes Abklingen durch Verteilung und Metabolisierung. Die Untersuchungen belegen, daß die inhalative Applikation des Verapamils eine sinnvolle Alternative zur systemischen Anwendung darstellen könnte.

## 7. Ausblick

Metabolismusstudien sind bei der Zulassung von Arzneimitteln unerlässlich.

Da diese Studien sehr zeitaufwendig und kostenintensiv sind, werden vor allem schnelle, automatisierbare Analysemethoden, die keinen großen Personalaufwand erfordern, gefordert, so daß gerade die modernen Kopplungstechniken wie HPLC-MS<sup>n</sup> und HPLC-NMR bevorzugt bei solchen Studien eingesetzt werden. Leider kommen diese Verfahren aber nicht ohne ein Mindestmaß an Probenvorbereitung aus, weshalb der Trend in die Richtung geht, die Probenvorbereitung in die nachfolgende Analytik zu integrieren, um die Analysenzeit zu verkürzen. Viele der vorgestellten Analysemethoden wie die Säulenschaltung mit ADS- oder MIP-Materialien sowie die in-tube SPME wurden schon in anderen analytischen Bereichen wie der Umwelt- oder Pharmaanalytik erfolgreich eingesetzt, bei Metabolismusstudien haben sie sich aber noch nicht etabliert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die in-tube SPME und die Säulenschaltungen mit RAM- und MIP-Materialien erstmals für Metabolismusstudien eingesetzt. Für den Einsatz in der Routineanalytik ist aber noch weiterer Forschungsbedarf nötig. Die Weiterentwicklung der Sorbentien für eine bessere Kompatibilität und selektivere Extraktion von biologischen Matrices (beispielsweise durch Kombination der RAM mit den MIP-Materialien) und Integration in die automatisierbaren Probenvorbereitungstechniken wird in Zukunft eine noch schnellere und selektivere Analyse von biologischen Proben ermöglichen. Durch Kombination dieser Sorbentien mit neuen, automatisierbaren Probenvorbereitungs- und Analysetechniken können leistungsfähige Analysemethoden für die Zukunft entwickelt werden.



## 8. Literaturverzeichnis

- (1) **Mutschler, E., 1997.** *Arzneimittelwirkungen*: Stuttgart.
- (2) **Lüllmann, H.; Mohr, K.; Ziegler, A., 1996.** *Taschenatlas der Pharmakologie*, 3. ed.: Stuttgart.
- (3) **Funabashi, Y.; Maeshiba, Y.; Inatomi, N.; Tanayama, S.; Harada, S., 1996.** Bioactive metabolites of EM 574 and EM523, erythromycin derivatives having strong gastrointestinal stimulating activity. *J. Antibiotics*, 49: 794-801.
- (4) **Eisenbrand, G.; Metzler, G., 1994.** *Toxikologie für Chemiker*. Stuttgart/New York.
- (5) **Marquardt, H.; Schäfer, S. G., 1997.** *Lehrbuch der Toxikologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg/Berlin.
- (6) **Soucek, P.; Gut, I., 1992.** Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, 22: 83-103.
- (7) **Spatzenegger, M.; Jaeger, W., 1995.** Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.*, 27: 397-417.
- (8) **Hakkola, J.; Pasanen, M.; Purkunen, R.; Saarikoski, S.; Pelkonen, O.; Maenpaa, J.; Rane, A.; Raunio, H., 1994.** Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 59-64.
- (9) **Mercurio, M. G.; Shiff, S. J.; Galbraith, R. A.; Sassa, S., 1995.** Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210: 350-355.
- (10) **Anttila, S.; Hukkanen, J.; Hakkola, J.; Stjernvall, T.; Beaune, P.; Edwards, R. J.; Boobis, A. R.; Pelkonen, O.; Raunio, H., 1997.** Expression and localization of CYP 3A4 and CYP 3A5 in the human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 16: 242-249.
- (11) **Ahmad, N.; Agarwal, R.; Mukhtar, H., 1996.** Cytochrome P-450 and drug development for skin diseases. *Skin. Pharmacol.*, 9: 231-241.
- (12) **Nguyen, L. T.; Ramanathan, M.; Weinstock-Guttman, B.; Dole, K.; Miller, C.; Planter, M.; Patrick, K.; Brownschidle, C.; Jacobs, L. D., 2000.** Detection of cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzyme mRNAs in peripheral blood mononuclear cells using DNA arrays. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 987-993.
- (13) **Thum, T.; Borlak, J., 2000.** Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 130: 1745-1752.
- (14) **Dawson, J. H., 1988.** Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*, 240: 433-439.
- (15) **Dawson, J. H.; Sono, M., 1987.** Cytochrom P-450 and chlorperoxidases: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chem. Rev.*, 87: 1255-1276.

- (16) **Blake, R. C.; Coon, M. J., 1989.** On the mechanism of action of cytochrom P-450. *J. Biol. Chem.*, 264: 3694-3701.
- (17) **Larroque, C.; Lange, R.; Bienvenue, L. M.; van Lier, J. E., 1990.** On the nature of cytochrome P450<sub>sc</sub> "ultimate oxidant": characterization of a productive radical intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 282: 198-201.
- (18) **Karki, S. B.; Dinnocenzo, J. P., 1995.** On the mechanism of amine oxidations by P450. *Xenobiotica*, 25: 711-724.
- (19) **Watanabe, K.; Narimatsu, S.; Yamamoto, I.; Yoshimura, H., 1991.** Oxygenation mechanism in conversion of aldehyde to carboxylic acid catalyzed by a cytochrome P-450 isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 266: 2709-2711.
- (20) **McMurry, T. J.; Groves, J. T., 1986.** *Studies of the mechanism of oxygen activation and transfer catalyzed by cytochrom P450*; Plenum: New York,.
- (21) **Testa, B.; Jenner, P., 1978.** Novel drug metabolites produced by functionalization reactions: chemistry and toxicology. *Drug Metab. Rev.*, 7: 325-369.
- (22) **Miwa, G. T.; Walsh, J. S.; Kedderis, G. L.; Hollenberg, P. F., 1983.** The use of intramolecular isotope effects to distinguish between deprotonation and hydrogen atom abstraction mechanisms in cytochrom P-450 and peroxidase-catalyzed N-demethylation reactions. *J. Biol. Chem.*, 258: 14445-14449.
- (23) **Schwartz, M. A.; Kolis, S. J., 1973.** Oxidation of an amino carbinol by an NAD<sup>+</sup>-dependent microsomal dehydrogenase. *Drug Metab. Dispos.*, 1: 322-331.
- (24) **Ebner, T.; Meese, C. O.; Fischer, P.; Eichelbaum, M., 1991.** A nuclear magnetic resonance study of sparteine delta metabolite structure. *Drug. Metab. Dispos.*, 19: 955-959.
- (25) **Schmid, J.; Busch, U.; Heinzl, G.; Bozler, G.; Kaschke, S.; Kummer, M., 1995.** Meloxicam: Pharmacokinetics and metabolic pattern after intravenous infusion and oral administration to healthy subjects. *Drug Metab. Dispos.*, 23: 1206-1213.
- (26) **Uptahagrove, A. L.; Nelson, W. L., 2001.** Carbinolamines, imines , and oxazolidines from fluorinated popanolol analogs. <sup>19</sup>F NMR and mass spectral characterization and evidence for formation as intermediates in cytochrom P-450 catalyzed N-dealkylation. *Drug Metab. Dispos.*, 372: 1114-1122.
- (27) **Strassburg, C. P.; Nguyen, N.; Manns, M. P.; Tukey, R. H., 1999.** UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, 116: 149-160.
- (28) **McGurk, K. A.; Brierley, C. H.; Burchell, B., 1998.** Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem. Pharmacol.*, 55: 1005-12.
- (29) **Sutherland, L.; bin Senafi, S.; Ebner, T.; Clarke, D. J.; Burchell, B., 1992.** Characterisation of a human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase stably expressed in hamster lung fibroblast cell cultures. *FEBS Lett.*, 308: 161-164.
- (30) **Pham, M. A.; Magdalou, J.; Totis, M.; Fournel-Gigleux, S.; Siest, G.; Hammock, B. D., 1989.** Characterization of distinct forms of cytochromes P-450, epoxide metabolizing enzymes and UDP-glucuronosyltransferases in rat skin. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 2187-2194.

- (31) **Tuckey, R. H.; Strassburg, C. P., 2000.** Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40: 581-618.
- (32) **Hawes, E. M., 1998.** N-Glucuronidation, a common pathway in human metabolism of drugs with a tertiary amine group. *Drug Metab. Dispos.*, 26: 830-846.
- (33) **Huskey, S. E. W.; Miller, R. R.; Chiu, S. H. L., 1993.** N-Glucuronidation. I. Tetrazole N-glucuronidation of selected angiotensin II receptor antagonists in hepatic microsomes from rats, dogs, monkeys and humans. *Drug Metab. Dispos.*, 21: 792-799.
- (34) **Huskey, S. E. W.; Magdalou, J.; Ouizzine, M.; Siest, G.; Chiu, S. H. L., 1994.** N-Glucuronidation reactions III. Regioselectivity of N-glucuronidation of methylbiphenyl tetrazole, methylbiphenyl triazole, and methylbiphenyl imidazole using human and rat recombinant UDP-glucuronosyltransferases stably expressed in V79 cells. *Drug Metab. Dispos.*, 22: 659-662.
- (35) **Chiu, S. H. L.; Huskey, S. E. W., 1998.** Species differences in N- glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.*, 26: 838-847.
- (36) **Dahl-Puustinen, M. L.; Bertilsson, L., 1987.** Formation of a quaternary N-Glucuronide of amitriptyline in human liver microsomes. *Pharm. Toxicol.*, 61: 342-346.
- (37) **Macrae, P. V.; Kinns, M.; Pullen, F. S.; Tarbit, M. H., 1990.** Characterization of a quaternary N- glucuronide metabolite of the imidazole antifungal, thiaconazole. *Drug Metab. Dispos.*, 18: 1100-1102.
- (38) **Takeuchi, M.; Nakano, M.; Mizojiri, K.; Iwatani, K.; Nakagawa, Y.; Kikuchi, J.; Terui, Y., 1989.** Quaternary ammonium glucuronide of croconazole in rabbits. *Xenobiotica*, 19: 1327-1336.
- (39) **Kirkman, S. K.; Zhang, M. Y.; Horwatt, P. M.; Scatina, J. A., 1998.** Isolation and identification of bromfenac glucoside from rat bile. *Drug Metab. Dispos.*, 26: 720-723.
- (40) **Tang, B. K.; Yilmaz, B.; Kalow, W., 1984.** Determination of phenobarbital, p-hydroxy phenobarbital and phenobarbital-N-glucoside in urine by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11: 462-465.
- (41) **Ebner, T.; Heinzl, G.; Prox, A.; Beschke, K.; Wachsmuth, H., 1999.** Disposition and chemical stability of telmisartan 1-O-acylglucuronide. *Drug Metab. Dispos.*, 27: 1143-1149.
- (42) **Mortensen, W. R.; Corcoran, O.; Cornett, C.; Sidelmann, U. G.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Hansen, S. H., 2001.** S-Naproxen- $\beta$ -1-O-acyl-glucuronide degradation kinetic studies by stopped-flow high performance liquid chromatography-<sup>1</sup>H-NMR and high performance liquid chromatography. *Drug Metab. Dispos.*, 29: 375-380.
- (43) **Sherratt, A. J.; Damani, L. A., 1989.** The metabolism of N,N-dimethylaniline by isolated rat hepatocytes: identification of a novel N-conjugate. *Xenobiotica*, 19: 379-388.
- (44) **Huskey, S. E. W.; Doss, G. A.; Miller, R. R.; Schoens, W. R.; Chiu, S. H. L., 1994.** N-Glucuronidation reactions. II. Relative N-glucuronidation reactivity of methylbiphenyl tetrazole, methylbiphenyl triazole, and methylbiphenyl imidazole in rat, monkey, and human hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 22: 651-658.
- (45) **Paul, D.; Standifer, K. M.; Inturrisi, C. E.; Pasternak, G. W., 1989.** Pharmacological characterization of morphine-6- $\beta$ -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J. Pharm.*

*Exp. Ther.*, 251: 477-483.

- (46) **Olsen, J. A.; Moon, R. V.; Anders, M. W.; Fenselau, C.; Shane, B., 1992.** Enhancement of the biological activity by conjugation reactions. *J. Nutrition*, 122: 615-624.
- (47) **M. Vore; Y. Liu; Huang, L., 1997.** Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug Metab. Rev.*, 29: 183-203.
- (48) **Spahn-Langguth, H.; Benet, L. Z., 1992.** Acylglucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab. Rev.*, 24: 5-47.
- (49) **Ritter, J. K., 2000.** Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol. Inter.*, 129: 171-193.
- (50) **Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P., 1991.** *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, 4 ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart,.
- (51) **Lippert, H., 1996.** In *Lehrbuch Anatomie*; Urban und Fischer-Verlag, München: 187-199.
- (52) **Keenan, R. J.; Duncan, A. J.; Yousem, S. A.; Zenati, M.; Schaper, M.; Dowling, R. D.; Alarie, Y.; Burckart, G. J.; Griffith, B. P., 1992.** Improved immunosuppression with aerosolized cyclosporine in experimental pulmonary transplantation. *Transplantation*, 53: 20-25.
- (53) **McElvaney, N. G.; Hubbard, R. C.; Birrer, P.; Chernick, M. S.; Caplan, D. B.; Frank, M. M.; Crystal, R. G., 1991.** Aerosol  $\alpha$ 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet*, 337: 392-394.
- (54) **Hardman, J. G.; Limberg, E., 2001.** *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed.; Mc Graw-Hill,.
- (55) **Pahor, M.; Manto, A.; Pedone, C.; Carosella, L.; Guralnik, J. M.; Carbonin, P., 1996.** Age and severe adverse drug reactions caused by nifedipine and verapamil. *J. Clin Epidemiol.*, 49: 921-928.
- (56) **Fitzpatrick, A. L.; Daling, J. R.; Furberg, C. D.; Kronmal, R. A.; Weissfeld, L., 1997.** Use of calcium channel blockers and breast carcinoma risk in postmenopausal women. *Cancer*, 80: 1438-1147.
- (57) **Pahor, M.; Guralnik, J. M.; Ferrucci, L.; Carti, M. C.; Salive, M. E.; Cerhan, J. R.; Wallace, R. B.; Havlik, R. J., 1996.** Calcium-channel blockade and incidence of cancer in aged populations. *Lancet*, 348: 493-497.
- (58) **Hardell, L.; Axelson, O.; Fredrikson, M., 1996.** Antihypertensive drugs and risk of malignant diseases. *Lancet*, 348: 542.
- (59) **Maccotta, A.; Scibona, G.; Valensin, G.; Gaggelli, E.; Botre, F.; Botre, C., 1991.** Nuclear magnetic resonance investigations of calcium antagonist drugs. II: conformational and dynamic features of verapamil in  $[^2\text{H}_6]\text{DMSO}$ . *J. Pharm. Sci.*, 80: 586-589.
- (60) **Tetreault, S.; Ananthanarayanan, V. S., 1993.** Interaction of calcium channel antagonists with calcium: structural studies on verapamil and its  $\text{Ca}^{2+}$  complex. *J. Med. Chem.*, 36: 1017-1023.
- (61) **Dei, S.; Romanelli, M. N.; Scapecchi, S.; Teodori, E.; Chiarini, A.; Gualtieri, F., 1991.**

Verapamil analogues with restricted molecular flexibility. *J. Med. Chem.*, 34: 2219-2225.

- (62) **Mannhold, R., 1977.** Untersuchungen zum kalziumantagonistischen Wirkungsmechanismus und zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- (63) **Schomerus, M.; Spiegelhalder, B.; Stieren, B.; Eichelbaum, M., 1976.** Physiological disposition of verapamil in man. *Cardiovasc. Res.*, 10: 605-612.
- (64) **Vogelsang, B.; Echizen, H.; Schmidt, E.; Eichelbaum, M., 1984.** Stereoselective first-pass metabolism of highly cleared drugs: studies of the bioavailability of L- and D-verapamil examined with a stable isotope technique. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 18: 733-740.
- (65) **Bhatti, M. M.; Foster, R. T., 1997.** Pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil after intravenous and oral administration of racemic verapamil in a rat model. *Biopharm. Drug Dispos.*, 18: 387-396.
- (66) **McIlhenny, H. M., 1971.** Metabolism of [<sup>14</sup>C] verapamil. *J. Med. Chem.*, 14: 1178-1184.
- (67) **Eichelbaum, M.; Ende, M.; Remberg, G.; Schomerus, M.; Dengler, H. J., 1979.** The metabolism of DL-[<sup>14</sup>C]verapamil in man. *Drug Metab. Dispos.*, 7: 145-148.
- (68) **Nelson, W. L.; Olsen, L. E., 1988.** Regiochemistry and enantioselectivity in the oxidative N-dealkylation of verapamil. *Drug Metab. Dispos.*, 16: 834-841.
- (69) **Nelson, W. L.; Olsen, L. D.; Beitner, D. B.; Pallow, R. J., 1987.** Regiochemistry and substrate stereoselectivity of O-demethylation of verapamil in the presence of the microsomal fraction from rat and human liver. *Drug Metab. Dispos.*, 16: 184-189.
- (70) **Kroemer, H. K.; Gautier, J. C.; Beaune, P.; Henderson, C.; Wolf, C. R.; Eichelbaum, M., 1993.** Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 348: 332-337.
- (71) **Tracy, T. S.; Korzekwa, K. R.; Gonzales, F. J.; Wainer, I. W., 1999.** Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 47: 545-552.
- (72) **Cashman, J. R., 1989.** Enantioselective N-oxygenation of verapamil by the hepatic flavin-containing monooxygenase. *Mol. Pharmacol.*, 36: 497-503.
- (73) **Mutlib, A. E.; Nelson, W. L., 1990.** Synthesis and identification of the N-glucuronides of norgallopamil and norverapamil, unusual metabolites of gallopamil and verapamil. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 252: 593-599.
- (74) **Neugebauer, G., 1978.** Comparative cardiovascular actions of verapamil and its major metabolites in the anaesthetized dog. *Cardiovasc. Res.*, 12: 247-254.
- (75) **Johnson, K. E.; Balderston, S. M.; Pieper, J. A.; Mann, D. E.; Reiter, M. J., 1991.** Electrophysiologic Effects of verapamil metabolites in the isolated heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 17: 830-837.
- (76) **Weymann, J.; Bühler, V.; Hege, H. G.; Müller-Peltzer, H.; Schenk, G.; Stieren, B.; Hollmann, M., 1989.** Metabolism of the calcium antagonist gallopamil in man. *Arzneim.-Forsch.*, 39: 605-607.

- (77) **Mutlib, A. E.; Nelson, W. L., 1990.** Pathways of gallopamil metabolism. Regiochemistry and enantioselectivity of the N-dealkylation processes. *Drug Metab. Dispos.*, 18: 331-337.
- (78) **Mutlib, A. E.; Nelson, W. L., 1990.** Pathways of gallopamil metabolism. Regiochemistry and enantioselectivity of the O-demethylation processes. *Drug Metab. Dispos.*, 18: 309-314.
- (79) **Gross, A. S.; Mikus, G.; Ratge, D.; Wisser, H.; Eichelbaum, M., 1997.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of gallopamil. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 281: 1102-1112.
- (80) **Reiffen, M.; Eberlein, W.; Müller, P.; Psiorz, M.; Noll, K.; Heider, J.; Lillie, C.; Kobinger, W.; Luger, P., 1990.** Specific bradycardic agents. 1. Chemistry, pharmacology, and structure-activity relationships of substituted benzazepinones, a new class of compounds exerting antiischemic properties. *J. Med. Chem.*, 33: 1496-1504.
- (81) **Roth, W.; Bauer, E.; Heinzl, G.; Cornelissen, P. J. G.; van Tol, R. G. L.; Jonkman, J. H. G.; Zuiderwijk, P. D. M., 1993.** Zatebradine: Pharmacokinetics of a novel heart rate-lowering agent after intravenous infusion and oral administration to healthy subjects. *J. Pharm. Sci.*, 82: 99-106.
- (82) **Roth, W.; Koss, F. W.; Hallinan, D.; Lambe, R.; Darragh, A., 1990.** Pharmacokinetics of falipamil after intravenous administration to humans. *J. Pharm. Sci.*, 79: 415-419.
- (83) **Baron, J.; Voigt, J. M., 1990.** Localization, distribution, and induction of xenobiotic-metabolizing enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase activity within lung. *Pharmac. Ther.*, 47: 419-445.
- (84) **Jemal, M.; Teitz, D.; Ouyang, Z.; Khan, S., 1999.** Comparison of plasma sample purification by manual liquid-liquid extraction, automated 98-well liquid-liquid extraction and automated 96-well solid-phase extraction for analysis by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 732: 501-508.
- (85) **Krishnan, T. R.; Ibrahim, I., 1994.** Solid-Phase extraction technique for the analysis of biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12: 287-294.
- (86) **Hennion, M. C., 1999.** Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 656: 3-54.
- (87) **Stevenson, D., 2000.** Immuno-affinity solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 745: 39-48.
- (88) **Thordarson, E.; Jönsson, J. A.; Emneus, J., 2000.** Immunologic trapping in supported liquid membrane extraction. *Anal. Chem.*, 72: 5280-5284.
- (89) **Wulff, G.; Minarik, M., 1990.** Template imprinted polymers for HPLC separation of racemates. *J. Liq. Chromatogr.*, 13: 2987-3000.
- (90) **Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K., 1993.** Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 361: 645-647.
- (91) **Mullett, W. M., 2000.** Investigation of selective binding interactions for analytical separation and determination of pharmaceuticals and toxin. Dissertation, Carleton University, Ottawa, ON, Canada.
- (92) **Shea, K. J.; Sasaki, D. Y., 1991.** An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:

4109-4120.

- (93) **Svenson, J.; Andersson, H. S.; Piletsky, S. A.; Nicolls, I. A., 1998.** Spectroscopic studies of the molecular imprinting self-assembly process. *J. Mol. Recognition*, 11: 83-89.
- (94) **Brüggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K., 2000.** New configurations and applications of molecular imprinted polymers. *J. Chromatogr. A*, 889: 15-24.
- (95) **Owens, P. K.; Karlsson, L.; Lutz, E. S. M.; Andersson, L. I., 1999.** Molecular imprinting for drug bioanalysis. *Trends Anal. Chem.*, 18: 146-154.
- (96) **Knutsson, M.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A., 1998.** Novel chiral recognition elements for molecularly imprinted polymer preparation. *J. Mol. Recog.*, 11: 87-90.
- (97) **Andersson, L. I., 2000.** Molecular imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J. Chromatogr. B*, 739: 163-173.
- (98) **Stevenson, D., 1999.** Molecular imprinted polymers for solid phase extraction. *Trends Anal. Chem.*, 18: 154-158.
- (99) **Barker, S. A., 2000.** Matrix solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, 885: 115-127.
- (100) **Barker, S. A.; Long, A. R.; Hines, M. E., 1993.** Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr.*, 629: 23-34.
- (101) **Crescenzi, C.; Bayouhdh, S.; Cormack, P. A. G.; Klein, T.; Ensing, K., 2001.** Determination of clenbuterol in bovine livers by combining matrix solid phase dispersion and molecular imprinted solid-phase-extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73: 2171-2177.
- (102) **Belardi, R. P.; Pawliszyn, J., 1989.** The application of chemically modified fused silica fibres in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column. *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24: 179-191.
- (103) **Pawliszyn, J., 1997.** *Solid phase microextraction: theory and practice*; Wiley-VCH: New York.
- (104) **Theodoridis, G.; Koster, E. H.; de Jong, G. J., 2000.** Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B*, 745: 49-82.
- (105) **Boyd-Boland, A. A.; Pawliszyn, J., 1996.** Solid-Phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of alkylphenol ethoxylate surfactants in water. *Anal. Chem.*, 68: 1521-1529.
- (106) **Volmer, D. A.; Hui, J. P., 1997.** Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11: 1926-33.
- (107) **Mullett, W. M.; Pawliszyn, J., 2002.** Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted access solid phase microextraction. *Anal. Chem.*, *in Druck*.
- (108) **Koster, E. H. M.; Crescenzi, C.; den Hoedt, W.; Ensing, K.; de Jong, G. J., 2001.** Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 73: 3140-3145.

- (109) **Boos, K. S.; Grimm, C. H., 1999.** High performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. *Trends Anal. Chem.*, 18: 175-180.
- (110) **Boos, K. S.; Fleischer, C. T., 2001.** Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371: 16-20.
- (111) **Koeber, R.; Fleischer, C. T.; Lanza, F.; Boos, K. S.; Sellergren, B.; Barcelo, D., 2001.** Evaluation of a multidimensional solid phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecular imprinted polymers. *Anal. Chem.*, 73: 2437-2444.
- (112) **Fleicher, C. T.; Boos, K. S., 2000.** Bioanalytical solid phase extraction. *GIT Spezial Separation*, 20: 89-92.
- (113) **Haginaka, J.; Sanbe, H., 2000.** Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. *Anal. Chem.*, 72: 5206-5210.
- (114) **Gou, Y.; Eisert, R.; Pawliszyn, J., 2000.** Automated in-tube solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. *J Chromatogr A*, 873: 137-147.
- (115) **Chen, J. A.; Pawliszyn, J., 1995.** SPME coupled to HPLC. *Anal. Chem.*, 67: 2530-2533.
- (116) **Wu, J.; Pawliszyn, J., 2001.** Preparation and applications of polypyrrole films in solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 909: 37-52.
- (117) **Wu, J.; Lord, H.; Pawliszyn, J., 2001.** Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Talanta*, 54: 655-672.
- (118) **Mullett, W. M.; Levsen, K.; Lubda, D.; Pawliszyn, J., 2002.** A bio-compatible in-tube solid phase microextraction capillary for the direct extraction and HPLC determination of drugs in human plasma. *J. Chromatogr. B, im Druck*.
- (119) **Mullett, W. M.; Martin, P.; Pawliszyn, J., 2001.** In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. *Anal. Chem.*, 73: 2383-89.
- (120) **Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., 1976.** On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, 64: 2287-2294.
- (121) **Thomson, B. A.; Iribarne, J. V., 1979.** Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.*, 71: 4451-4463.
- (122) **Thomson, B. A.; Iribarne, J. V.; Dzedzic, P. J., 1982.** Liquid ion evaporation/mass spectrometry/mass spectrometry for the detection of polar and labile molecules. *Anal. Chem.*, 54: 2219-2224.
- (123) **Dole, M.; Hines, R. L.; Mack, L. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., 1968.** Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, 49: 2240-2249.
- (124) **McLucky, S. A.; van Berkel, G. J.; Goeringer, D. E.; Glish, G. L., 1994.** Ion trap mass spectrometry of external generated ions. *Anal. Chem.*, 66: 689A-696A.



- (125) **Schwedt, G., 1995.** *Analytische Chemie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart /New York.
- (126) **Günther, H., 1992.** *NMR-Spektroskopie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart /New York.
- (127) **Shockcor, J. P.; Unger, S. E.; Wilson, I. D.; Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., 1996.** Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal. Chem.*, 68: 4431-4435.
- (128) **Albert, K., 1999.** Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, 856: 199-211.
- (129) **Sandvoss, M., 2000.** Isolierung und Strukturaufklärung von Saponinen des Seesterns *Asterias rubens* mittels eines LC-NMR-MS Screenings sowie weiterer NMR-spektroskopischer Methoden. Dissertation, Universität Hannover, Hannover.
- (130) **Lankford, S. M.; Bai, S. A., 1995.** Determination of the stereochemical composition of the major metabolites of verapamil in dog urine with enantioselective liquid chromatography techniques. *J. Chromatogr.*, 663: 91-101.
- (131) **Richter, O.; Eichelbaum, M.; Schöneberger, F.; Hofmann, U., 2000.** Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 738: 137-147.
- (132) **Garcia, M. A.; Aramayona, J. J.; Bregante, M. A.; Fraile, L. J.; Solans, C., 1997.** Simultaneous determination of verapamil and norverapamil in biological samples by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, 693: 377-382.
- (133) **Cheng, Y. F.; Neue, U. D.; Bean, L., 1998.** Straightforward solid-phase extraction method for the determination of verapamil and its metabolites in plasma in a 96-well extraction plate. *J. Chromatogr. A*, 828: 273-281.
- (134) **Asafu-Adjaye, E. B.; Shiu, G. K., 1998.** Solid Phase extraction-high-performance liquid chromatography determination of verapamil and norverapamil enantiomers in urine. *J. Chromatogr. B*, 1998: 161-167.
- (135) **Sawieki, W., 2001.** A validated method for the determination of verapamil and norverapamil in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25: 689-695.
- (136) **Negrusz, A.; Wacek, B. C.; Toerne, T.; Bryant, J., 1997.** Quantitation of verapamil and norverapamil in postmortem and clinical samples using liquid-liquid extraction, solid phase extraction, and HPLC. *Chromatographia*, 46: 191-196.
- (137) **Hanada, K.; Akimoto, S.; Mitsui, K.; Hashiguchi, M.; Ogata, H., 1998.** Quantitative determination of disopyramide, verapamil and flecainide enantiomers in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 710: 129-35.
- (138) **Oda, Y.; Asawaka, N.; Kajima, T.; Yoshida, Y.; Sato, T., 1991.** On-line determination and resolution of verapamil enantiomers by high-performance liquid chromatography with column switching. *J. Chromatogr.*, 541: 411-418.
- (139) **Brandsteterova, E.; Wainer, I. W., 1999.** Achiral and chiral high performance liquid chromatography of verapamil and its metabolites in serum samples. *J. Chromatogr. B*, 732:

395-304.

- (140) **Fried, K.; Wainer, I. W., 1997.** Review: Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when. *J. Chromatogr. B*, 689: 91-104.
- (141) **Mangani, F.; Luck, G.; Fraudeau, C.; Verette, E., 1997.** On-line column-switching high performance liquid chromatography analysis of cardiovascular drugs in serum with automated sample clean-up and zone-cutting technique to perform chiral separation. *J. Chromatogr. A*, 762: 235-241.
- (142) **Thum, T., 2001.** Cellular dedifferentiation of endothelium is linked to activation and silencing of certain nuclear transcription factors: implications for endothelial dysfunction and vascular biology. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover.
- (143) **Thum, T.; Borlak, J., 2000.** Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*, 355: 979-983.
- (144) **Borlak, J.; Thum, T., 2001.** Induction of nuclear transcription factors, cytochrome P450 monooxygenases, and glutathione S-transferase alpha gene expression in Aroclor 1254-treated rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol.*, 61: 145-153.
- (145) **Blickwede, M., 2001.** Speziesvergleichende Untersuchungen mit primären Kulturen alveolarepithelialer Zellen- Bedeutung für die inhalative Pharmakotherapie. Diplomarbeit, Universität Hannover, Hannover.
- (146) **Hill, H. M., 2000.** Bioanalytical methods validation: A critique of the proposed FDA guidance. *Chromatographia*, 52: 65-69.
- (147) **Ermer, J., 2001.** Validation in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24: 755-767.
- (148) **Green, J. M., 1996.** A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.* : 305A-309A.
- (149) **Haginaka, J.; Sakai, Y., 2000.** Uniform sized molecularly imprinted polymer material for (S)-propranolol. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22: 899-907.
- (150) **Lanza, F.; Hall, A. J.; Sellergren, B.; Berezki, A.; Horvai, G.; Bayouth, S.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C., 2001.** Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Anal. Chim. Acta*, 435: 91-106.
- (151) **Mullett, W. M.; Lai, E. P. C., 1999.** Rapid determination of theophylline in serum by selective extraction using a heated molecularly imprinted polymer micro-column with differential pulsed elution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21: 835-843.
- (152) **Koch, W.; Windt, H.; Walles, M.; Borlak, J.; Clausing, P., 2001.** Inhalation studies with the göttingen minipig. *Inhal. Toxicol.*, 13: 249-259.
- (153) **Hamann, S. R.; Blouin, R. A.; McAllister, R. G., 1984.** Clinical pharmacokinetics of verapamil. *Clin. Pharmacokinet.*, 9: 26-34.
- (154) **Yu, Z.; Westerlund, D.; Boos, K. S., 1997.** Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems. *J Chromatogr. B*, 704: 53-62.

- (155) **Rosenstock, H. M.; Draxl, K.; Steiner, B. W.; Herron, J. T., 1977.** *J. of Physical and Chemical Reference Data*, 6:.
- (156) **Soine, W. H.; Soine, P. J.; England, T. M.; Ferkany, J. W.; Agriesti, B. E., 1991.** Identification of phenobarbital N-glucosides as urinary metabolites of phenobarbital in mice. *J. Pharm. Sci.*, 80: 99-103.
- (157) **Beckett, A. H.; Dyk, J. M. v.; Chissick, H. H.; Gorrod, J. W., 1971.** Metabolic oxidation on aliphatic basic nitrogen atoms and their  $\alpha$ -carbon atoms-some unifying principles. *J. Pharm. Pharmac.*, 23: 809-812.
- (158) **Foster, A. B.; Jarman, M.; Stevens, J. D.; Thomas, P.; Westwood, J. H., 1974.** Isotope effects in O- and N-demethylations mediated by rat liver microsomes: an application of direct insertion electron impact mass spectrometry. *Chem. Biol. Inter.*, 9: 327-340.
- (159) **Cnubben, N. H. P.; Peelen, S.; Borst, J.W.; Vervoort, J.; Veeger, C.; Rietjens, I. M., 1994.** Molecular Orbital-Based quantitative Structure-Activity Relationship for the Cytochrome P450 4-Hydroxylation of Halogenated Anilines. *Chem. Res. Toxicol.*, 7: 590-598.
- (160) **Koymans, L.; Donne-Op den Kelder, G. M.; te Koppele, J. M.; Vermeulen, N. P. E., 1993.** Generalized cytochrome P450 mediated oxidation and oxygenation reactions in aromatic substrates with activated N-H, O-H, C-H, or S-H substituents. *Xenobiotica*, 23: 633-648.
- (161) **Guroff, G.; Daly, J. W.; Jerina, D. M.; Renson, J.; Witkop, B.; Udenfriend, S., 1967.** Hydroxylation-induced migration: the NIH shift. Recent experiments reveal an unexpected and general result of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Science*, 157: 1524-1530.
- (162) **Soucek, P.; Zuber, R.; Anzenbacherova, E.; Anzenbacher, P.; Guengerich, F. P., 2001.** Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC Pharmacol.*, 1: 11-15.
- (163) **Skaanild, M. T.; Friis, C., 1997.** Characterization of the P450 system in Gottingen minipigs. *Pharmacol. Toxicol.*, 80 Suppl 2: 28-33.
- (164) **Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E.; Zuber, R.; Soucek, P.; Guengerich, F. P., 2002.** Pig and minipig cytochromes P450. *Drug Metab. Dispos.*, 30: 100-102.
- (165) **Lee, C.; Watt, K. C.; Chang, A. M.; Plopper, C. G.; Buckpitt, A. R.; Pinkerton, K. E., 1998.** Site-selective differences in cytochrome P450 isoform activities: comparison of expression in rat and rhesus monkey lung and induction in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 26: 396-400.

# **Anhang**

## HPLC- Chromatographie

### a) Chromatographie der Hepatozytenextrakte (Phase-I- und Phase-II-Metaboliten): Probenvorbereitung durch SPE (siehe Kapitel 3.4.3)

<b>Säule</b>	RP8 Select B 250 x 2 mm, 4µm		
<b>Eluent</b>	AcCN [A] NH <sub>4</sub> Acetat (0.01 M, pH = 6) [B]		
<b>Fluß</b>	0.2 ml/min		
<b>Gradient</b>	<b>t (min)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
	0	25	75
	15	50	50
	30-55	75	25
	55-60	25	75

### b) Chromatographie der Hepatozytenextrakte (Phase-I- und Phase-II-Metaboliten): Probenvorbereitung durch Säulenschaltung mit ADS-Vorsäule (siehe Kapitel 3.4.5)

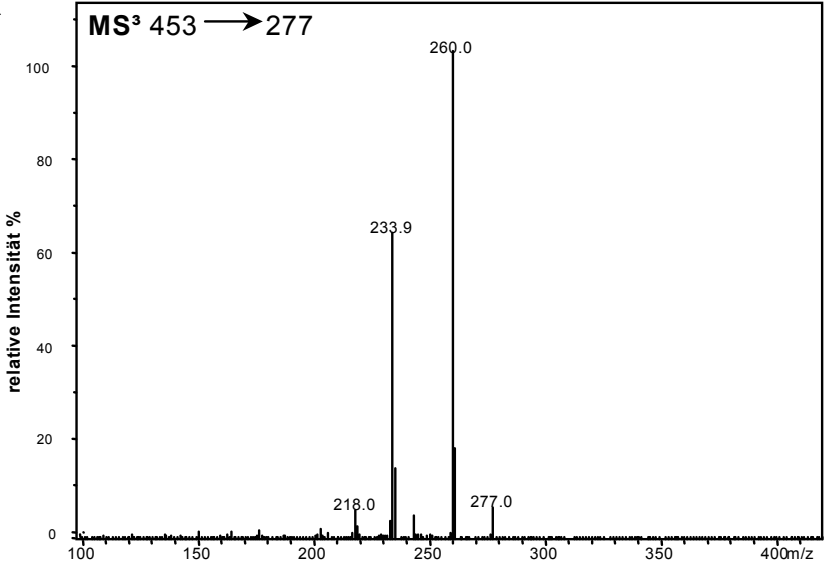
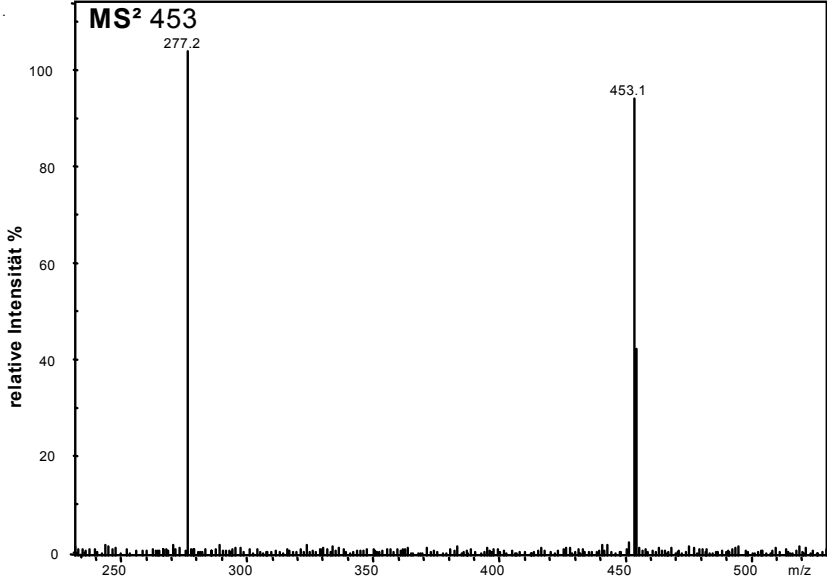
<b>Säule</b>	RP8 Select B 250 x 4 mm, 5µm		
<b>Eluent</b>	AcCN [A] NH <sub>4</sub> Acetat (0.01 M, pH = 6) [B]		
<b>Fluß</b>	0.6 ml/min		
<b>Split</b>	1:4; 125 µl/min ins MS		
<b>Gradient</b>	<b>t (min)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
	0-30	25	75
	30-60	80	20
	60-75	25	75

## MS-Parameter

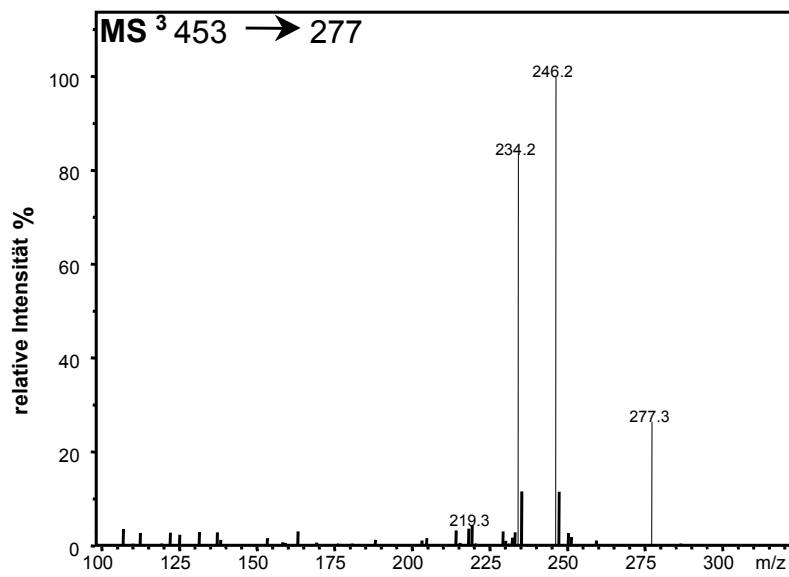
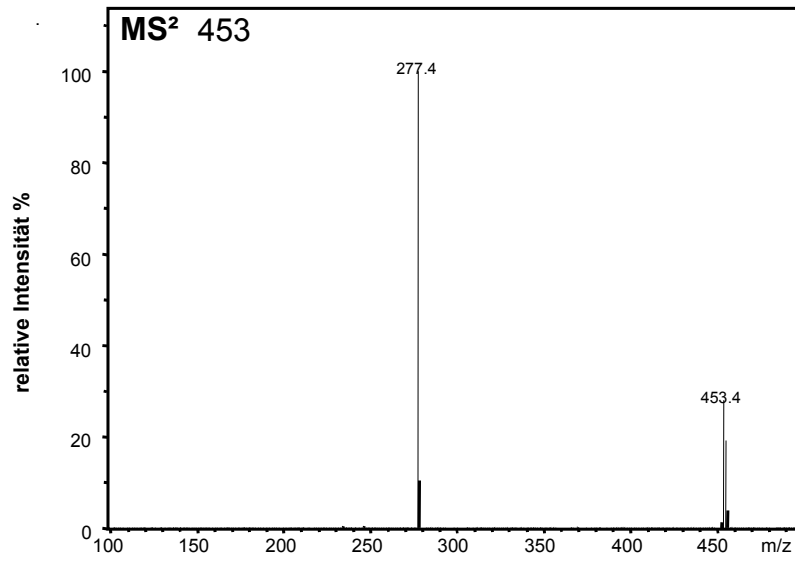
<b>MS-Parameter für die Bestimmung von Verapamil und seinen Metaboliten</b>		
ESI-Quelle	Ionisierung	Positiv-ESI
	Kapillarspannung	3500 V
	Endplattenspannung	3000V
	Gasfluß Trockengas	11 L/min
	Temperatur Trockengas	300-350 °C
	Nebulizer	40 psi
Detektor- und Blockspannungen	Multiplier	1.500 V
	Dynode	7.0 kV
	Skimmer 1 Block	100 V
	Skimmer 2 Block	300 V
Linsenspannungen	Trap Drive	30.6
	Skimmer 1	24.5 V
	Skimmer 2	6.0 V
	Octopole RF Amplitude	120.0 Vpp
	Octopole $\Delta$	2.40 V
	Lens 1	- 5.0 V
	Lens 2	-60.0 V
	Octopole	2.70 V
	Capillary Exit	94.0 V
Trap	Scan-Range	100-700 m/z
	MS/MS Amplitude	Amplitude 0.65-0.8V für Verapamil und Phase-I-Metabolite Amplitude 0.4 V für Phase-II-Metaboliten
	Auto MS/MS	Smart Frag Start Amplitude 30 % Smart Frag EndAmplitude 200 %

# MS-Spektren

M1

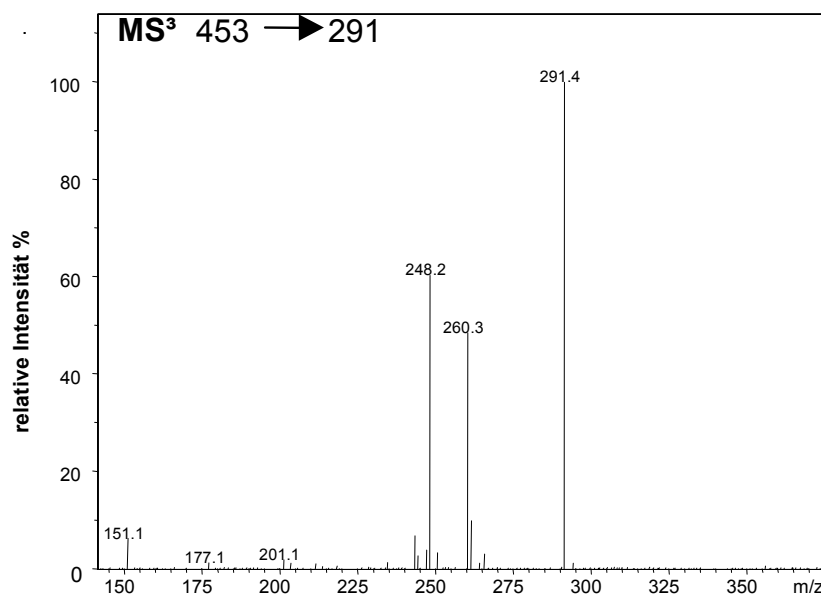
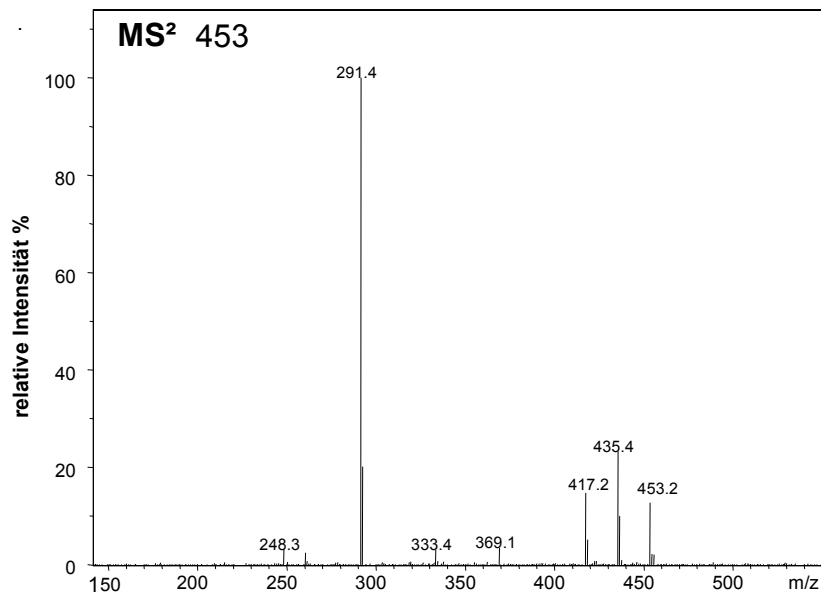


# M2

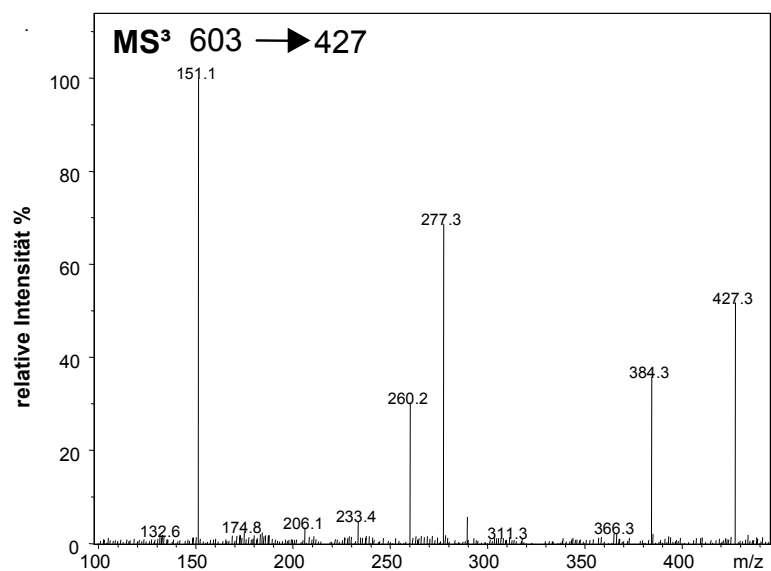
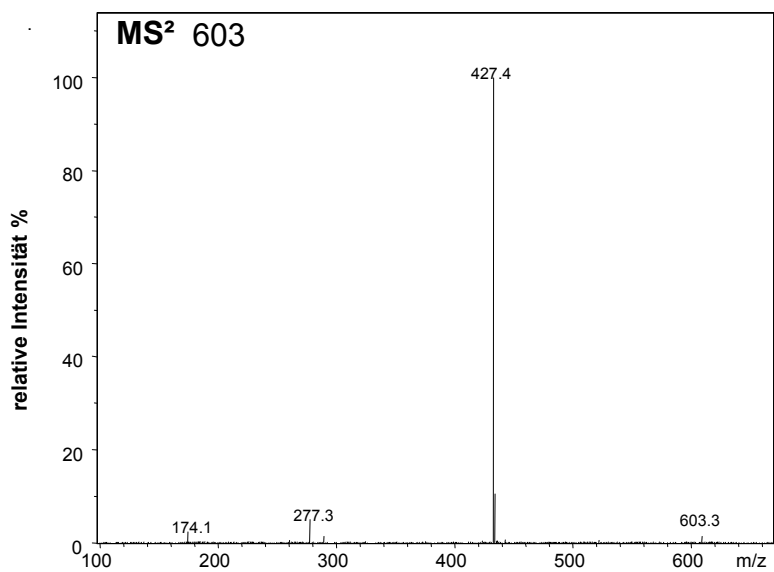




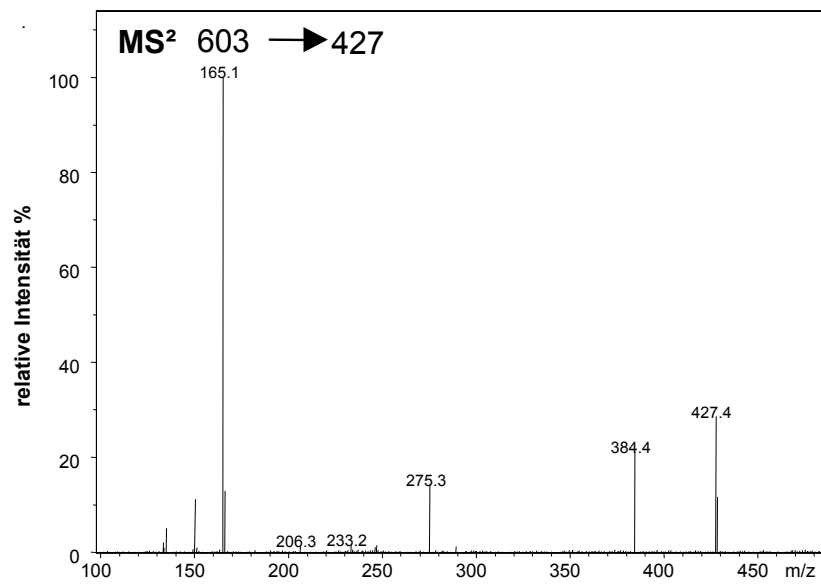
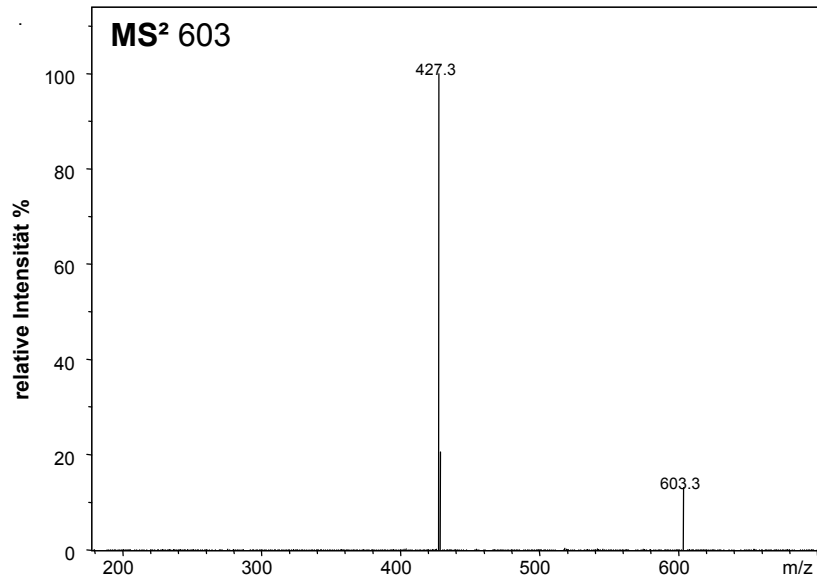
### M3



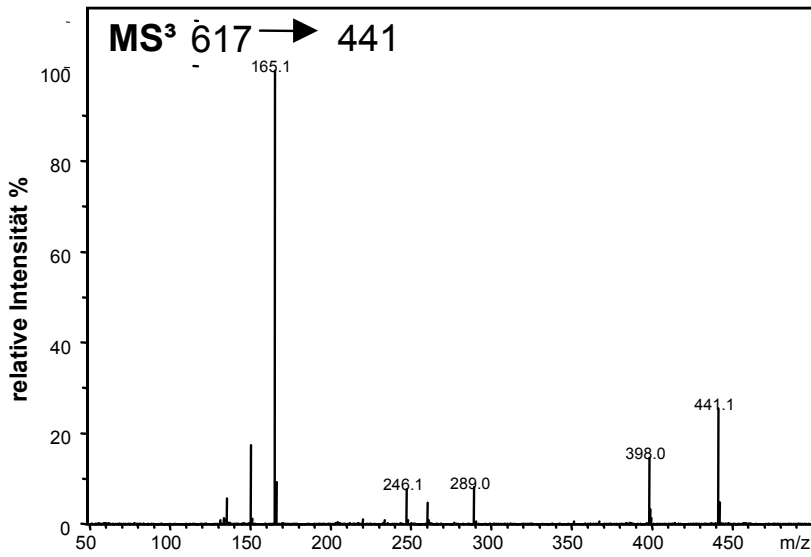
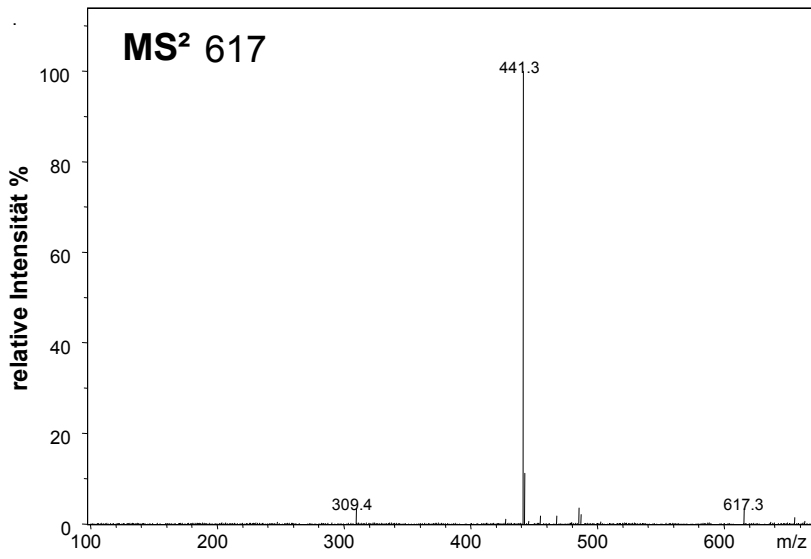
# M4



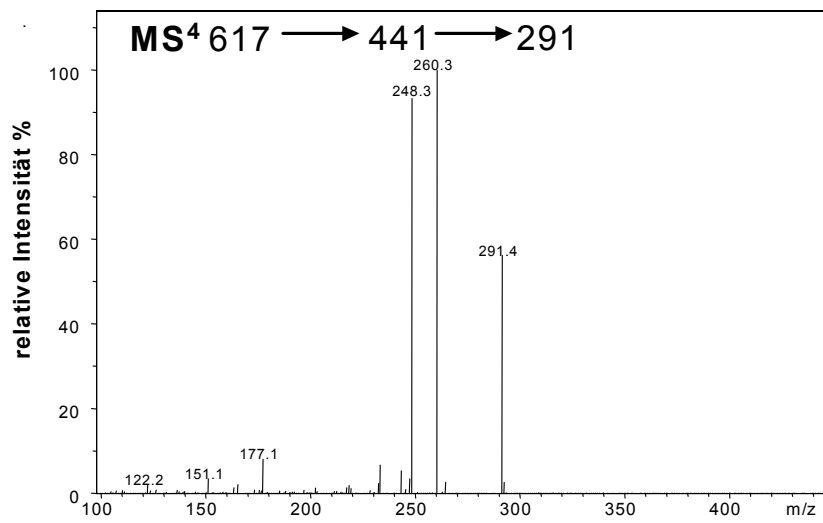
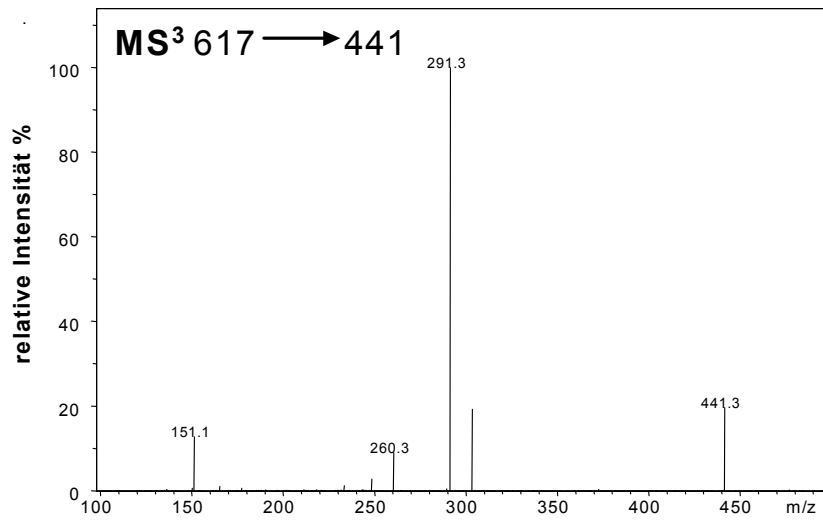
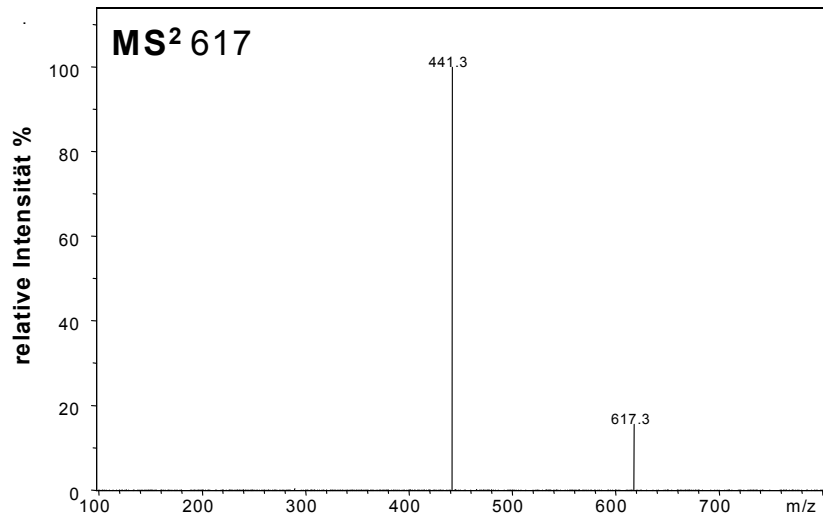
# M5



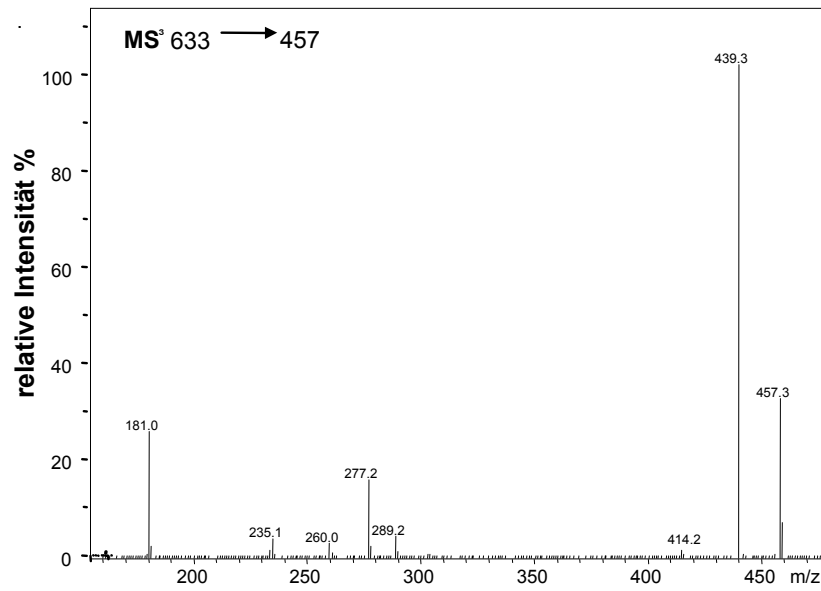
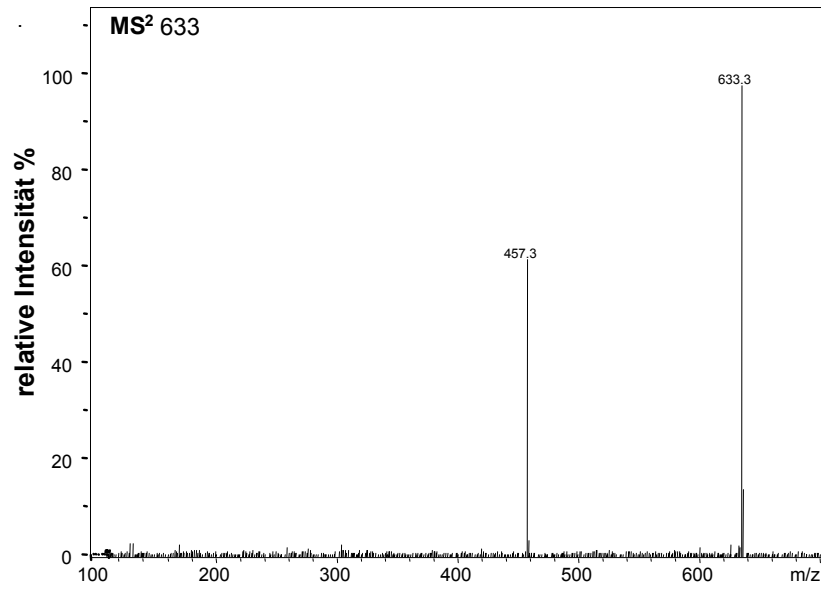
**M6**



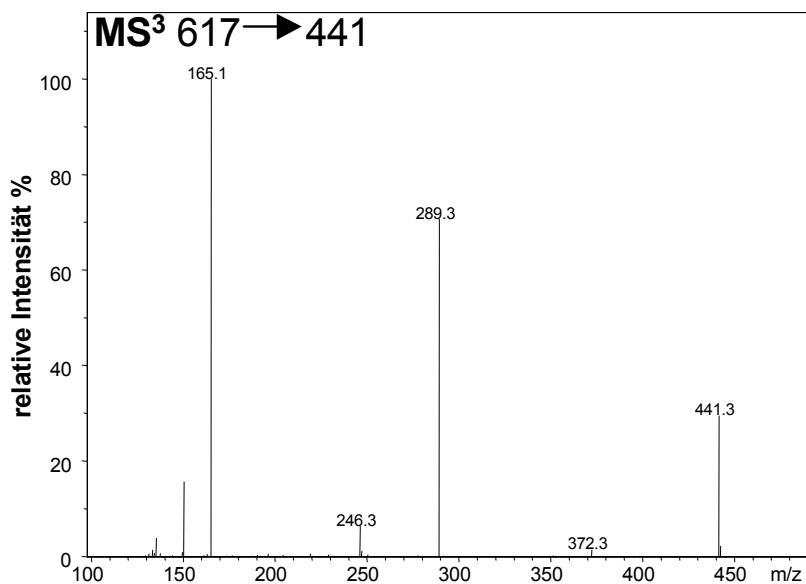
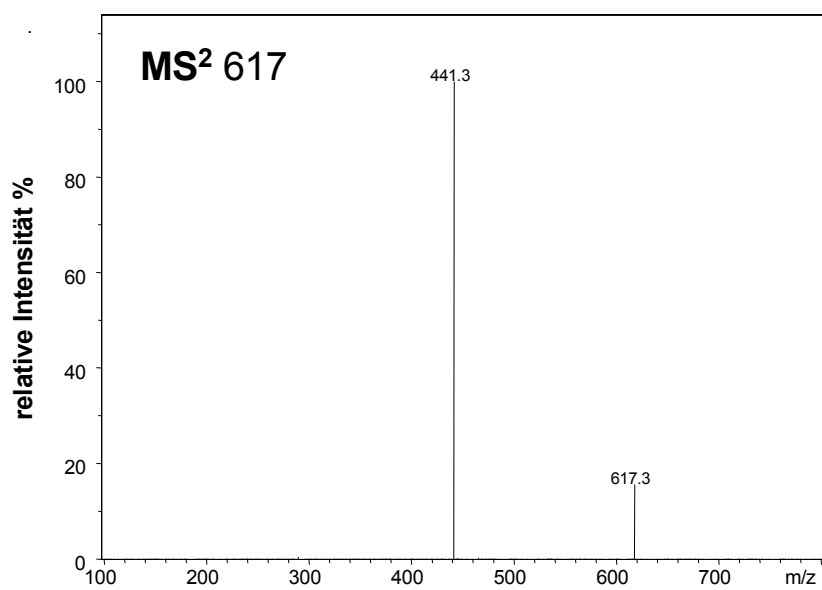
# M7



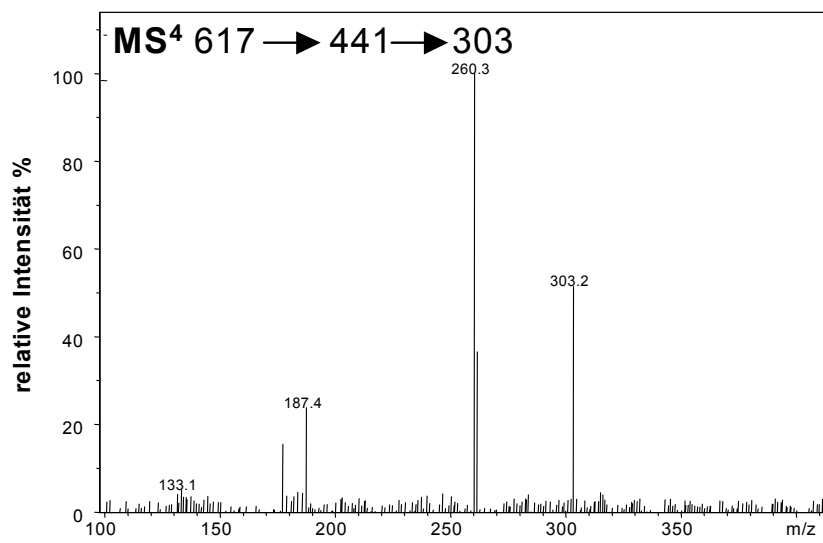
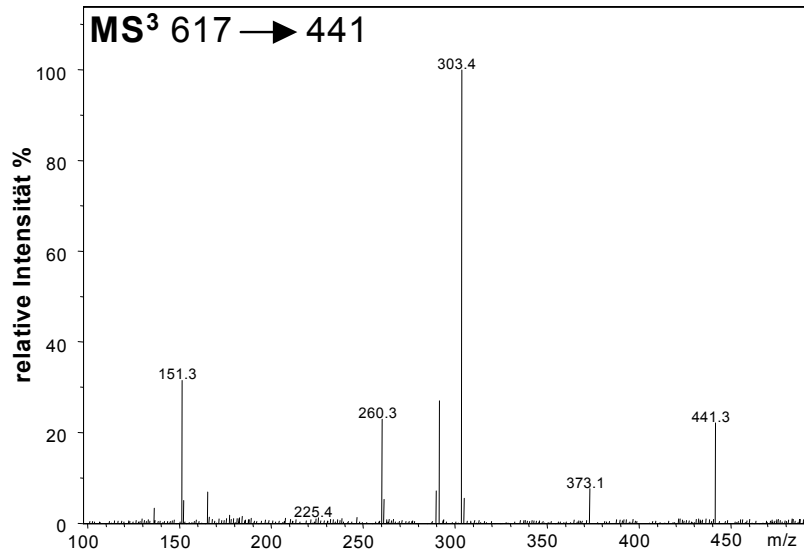
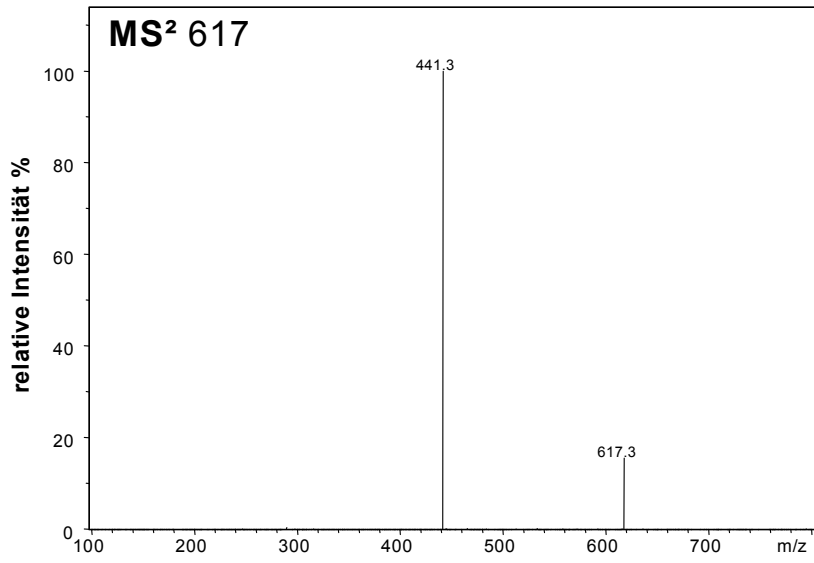
# M8



# M9

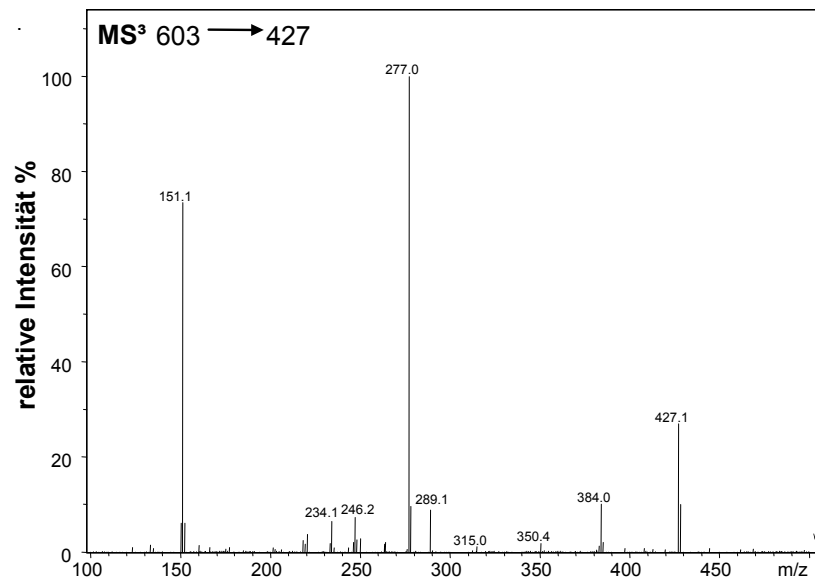
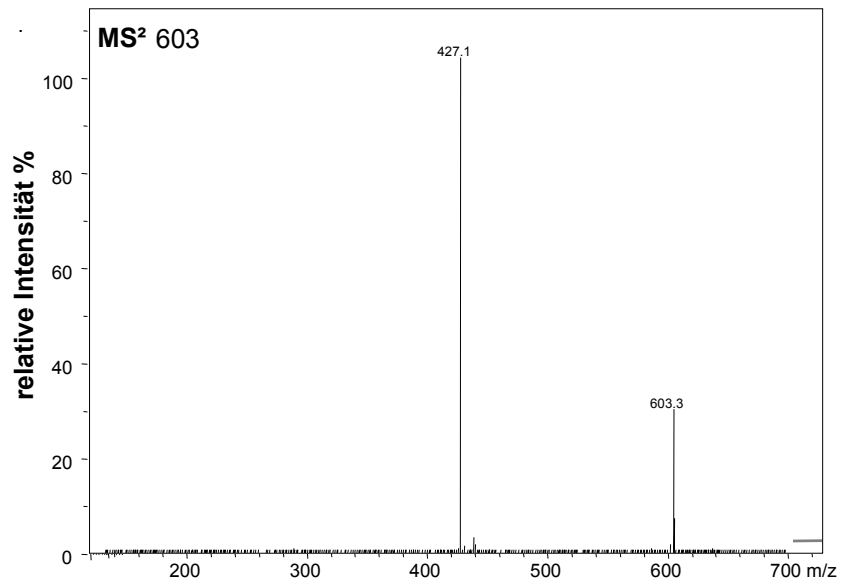


# M10

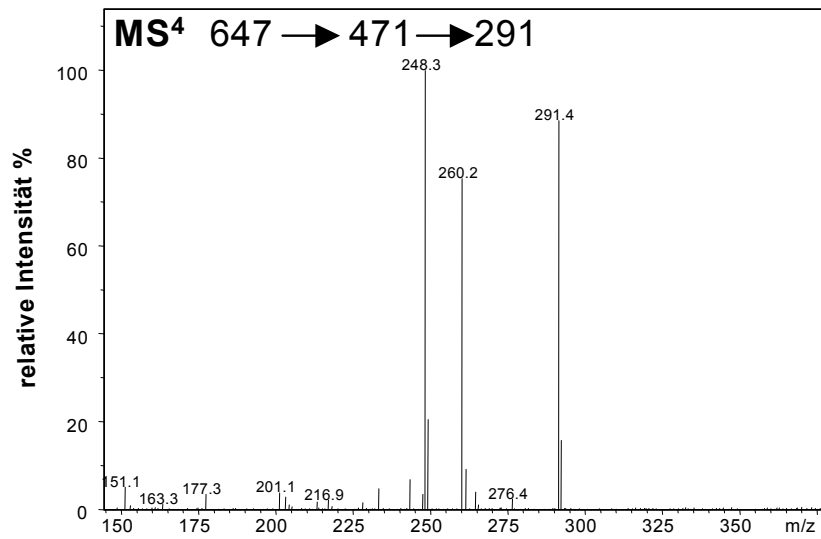
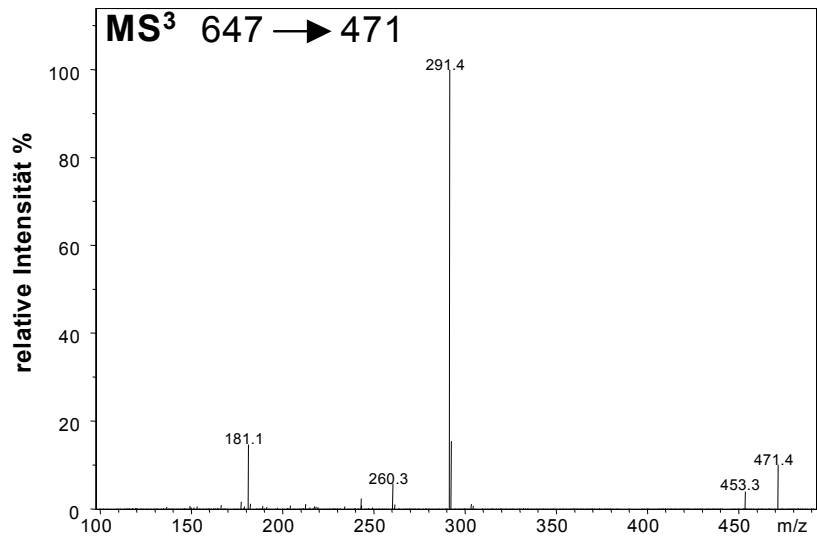
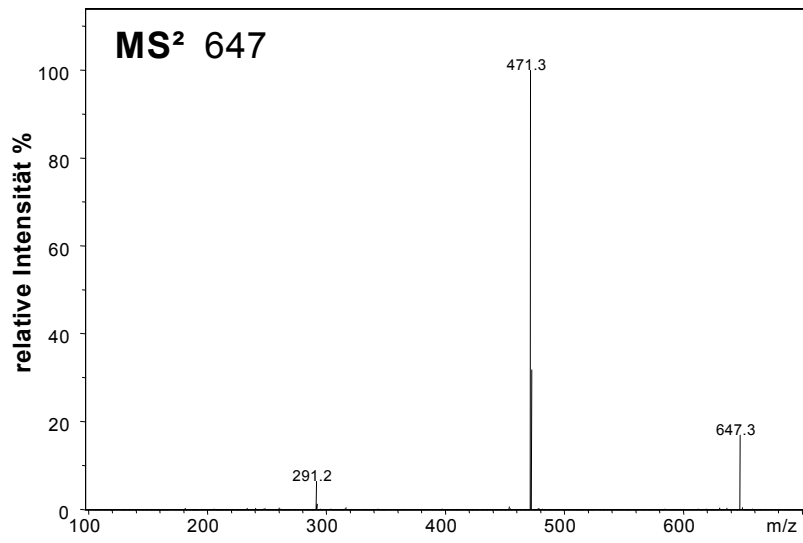




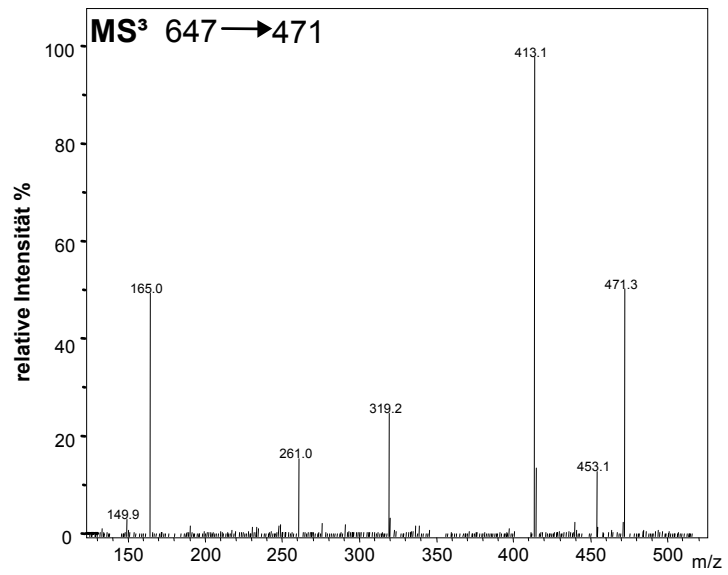
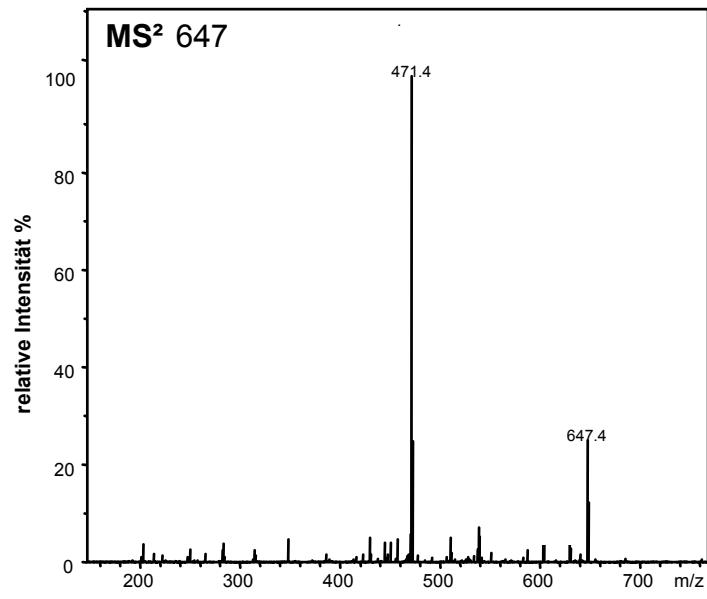
# M11



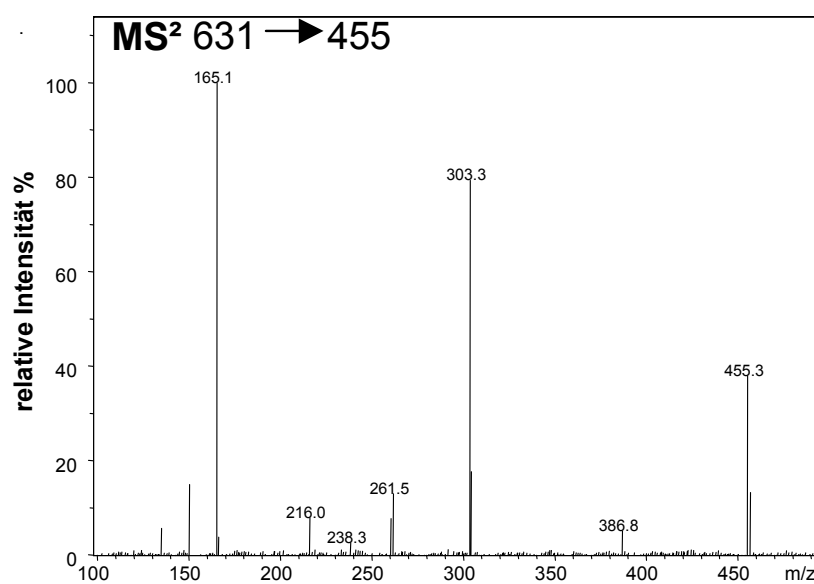
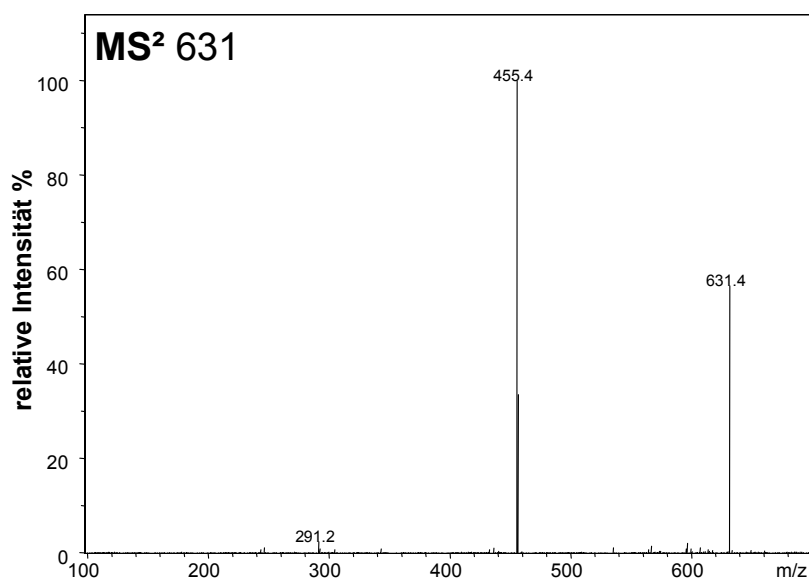
# M12



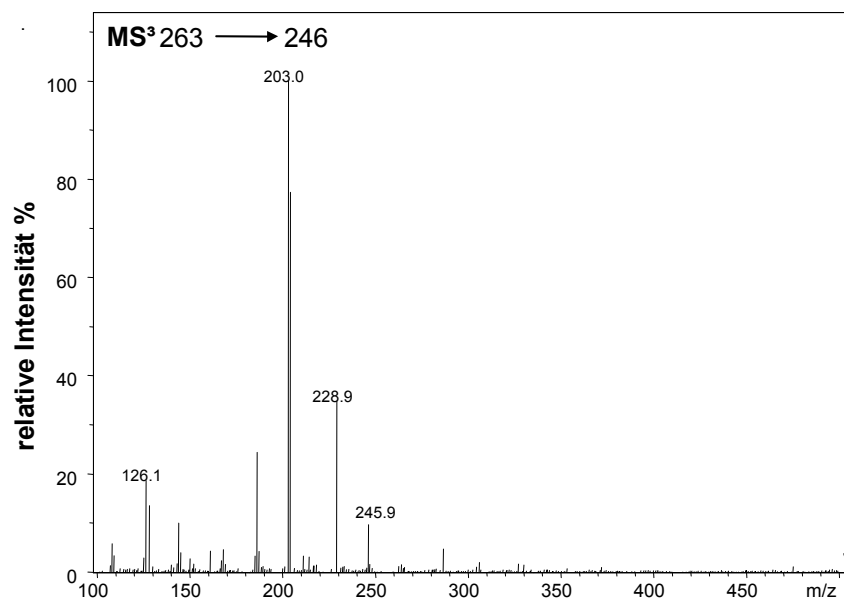
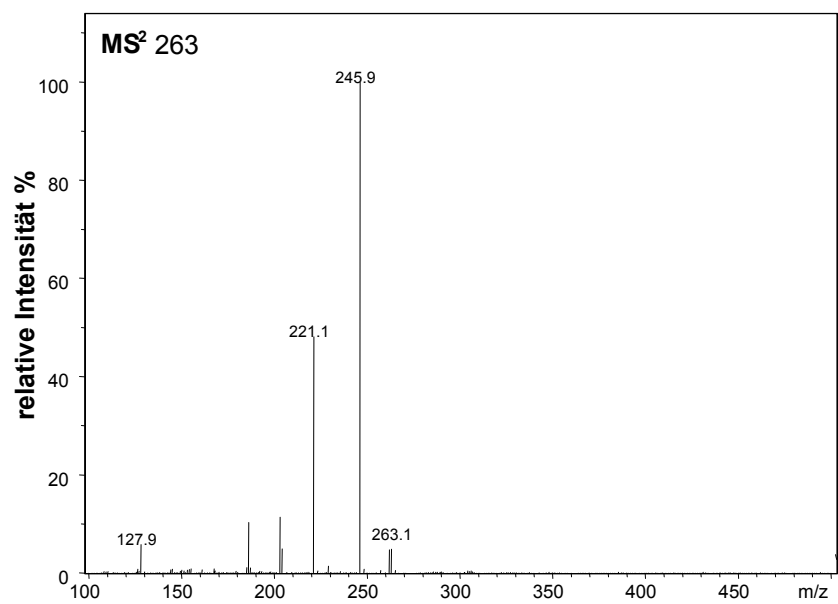
# M13



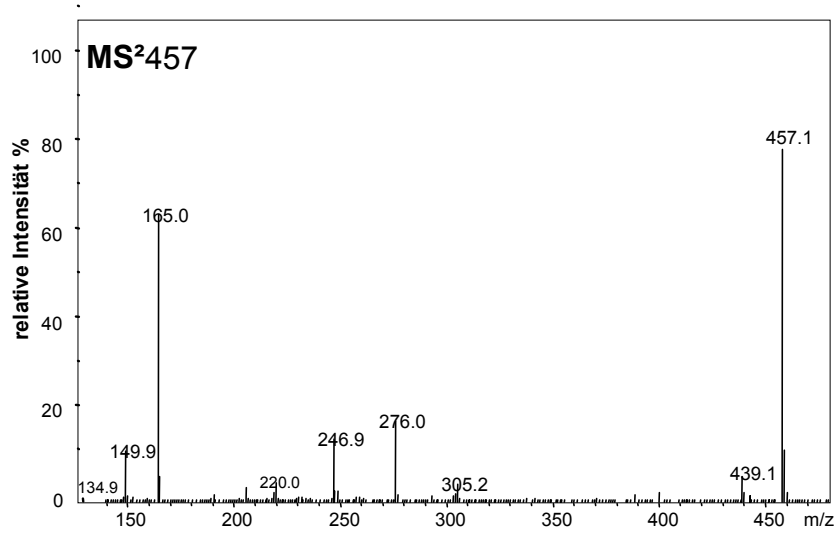
# M14



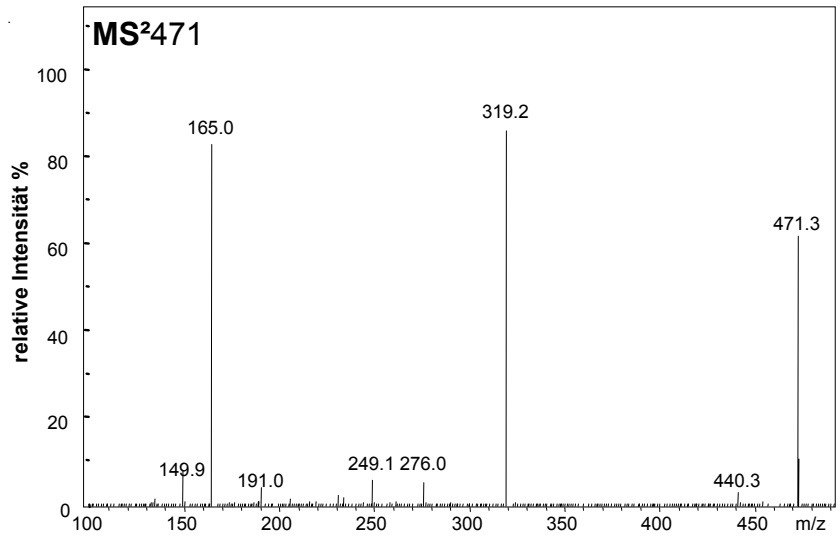
# M15



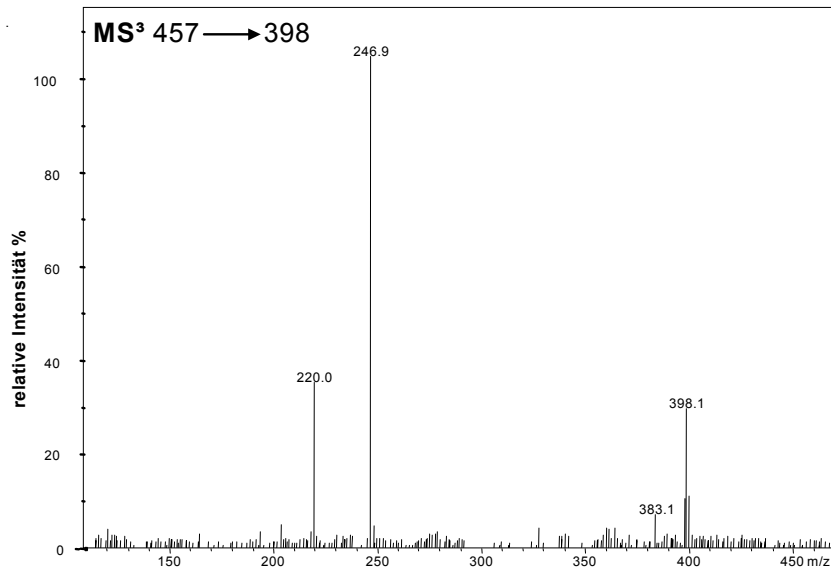
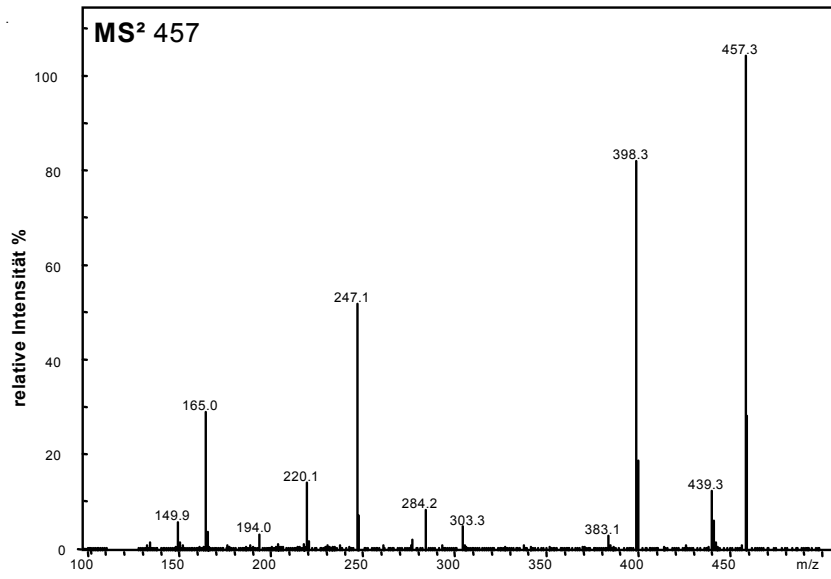
### M16



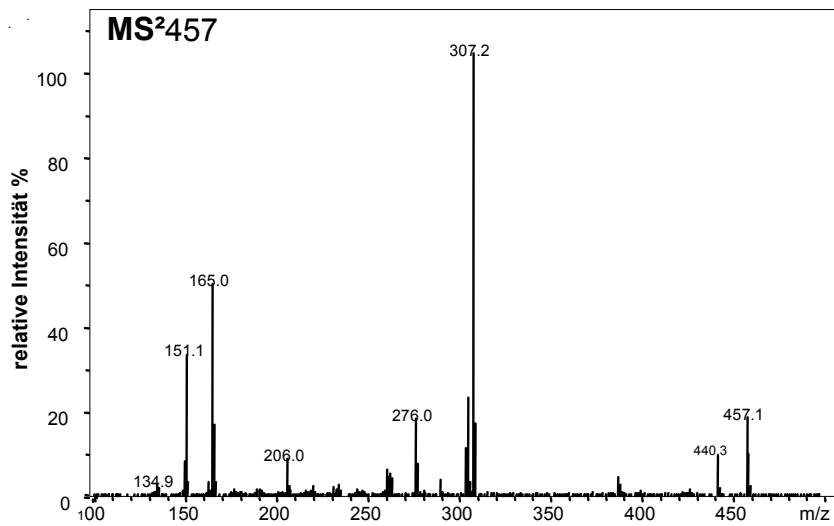
### M17



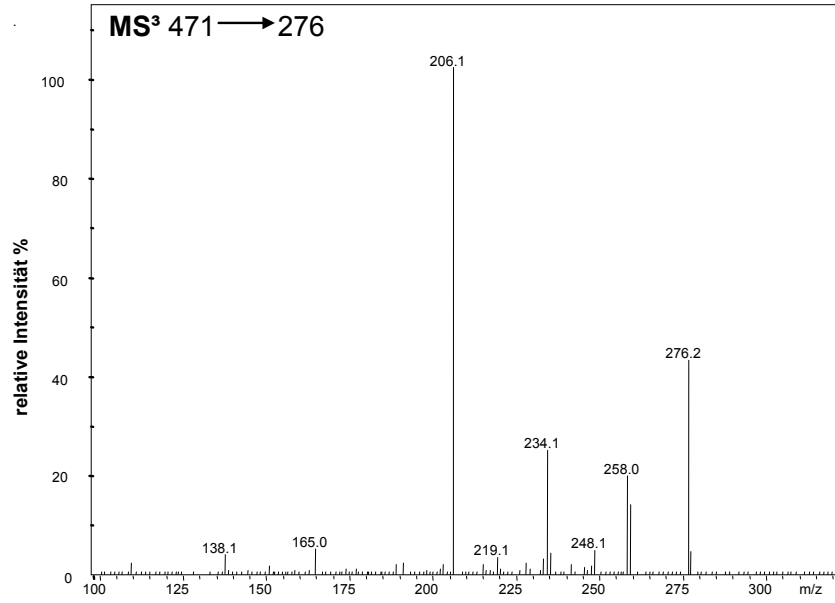
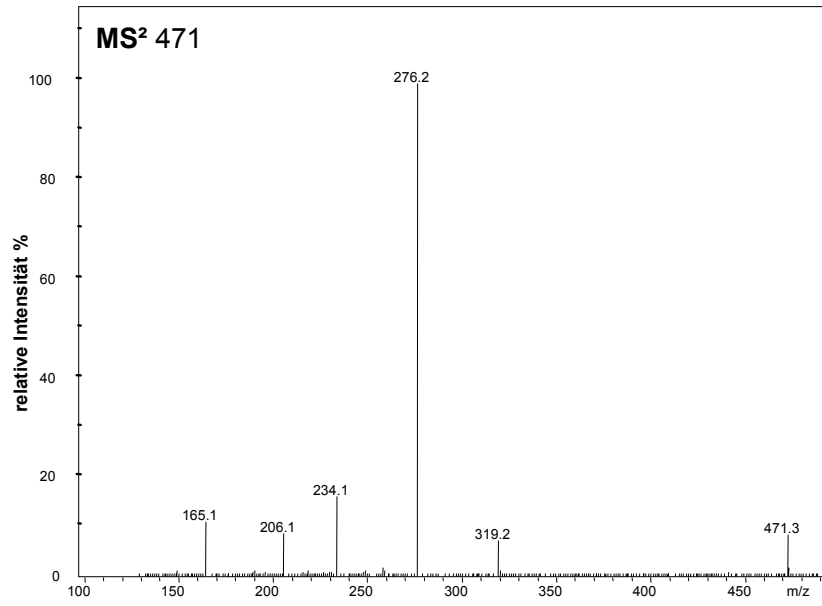
# M18



# M19

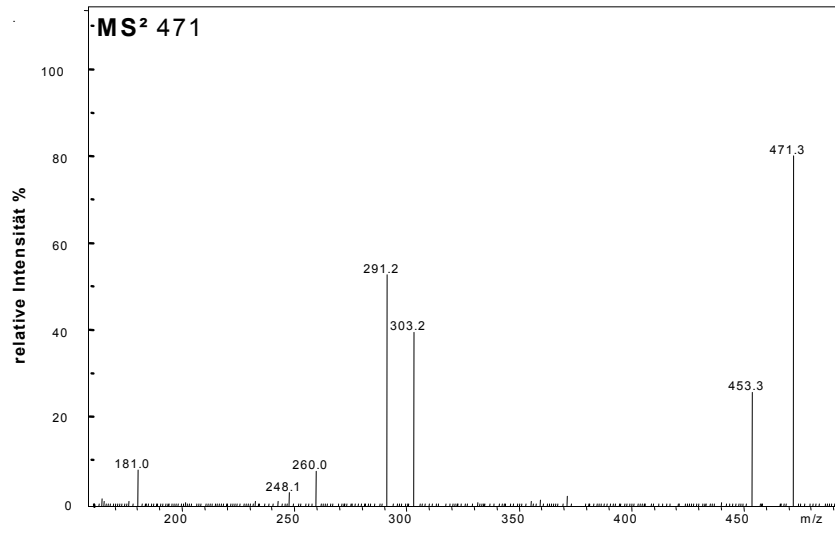


# M20

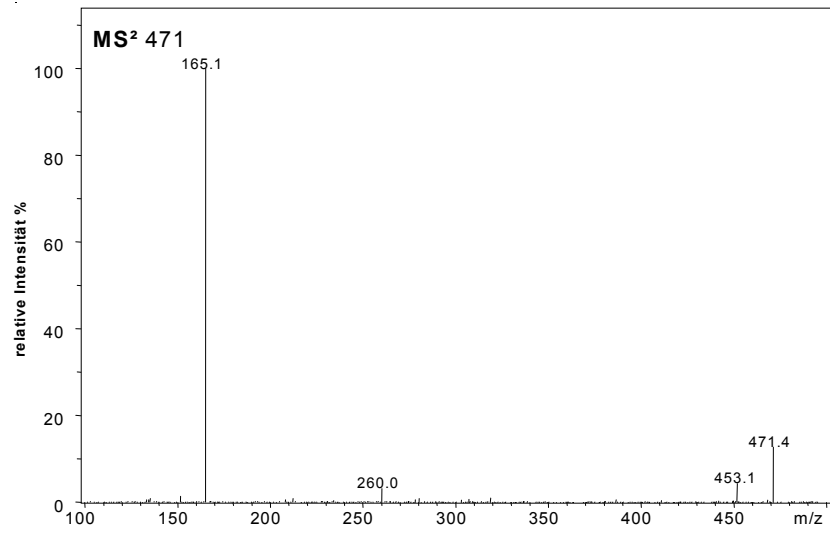




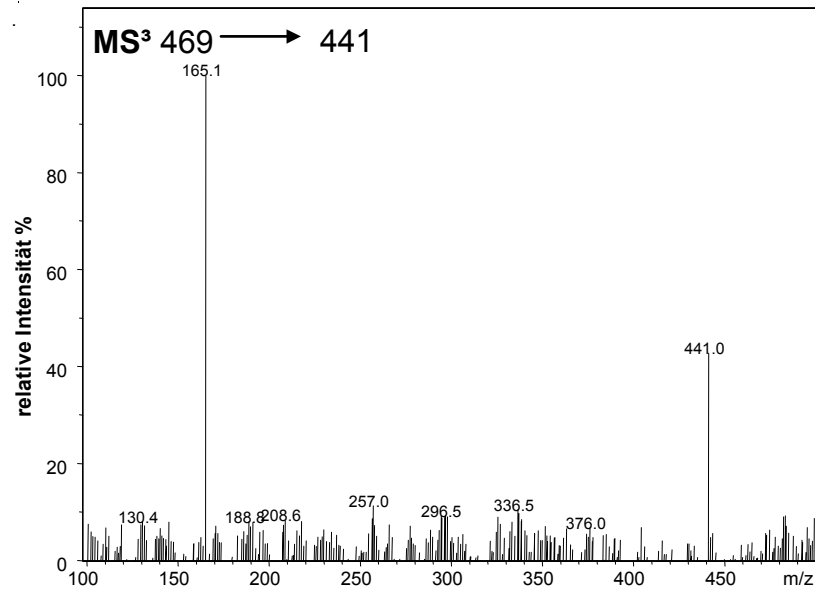
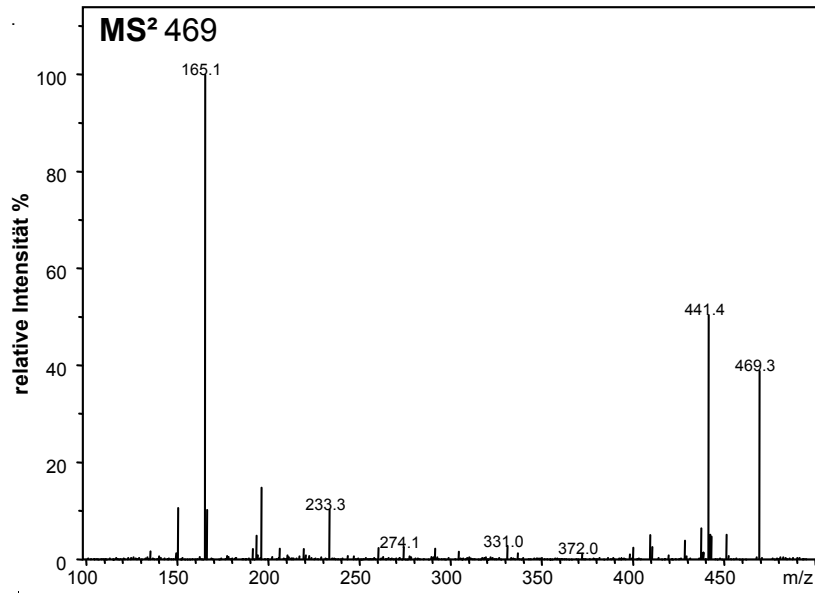
## M21



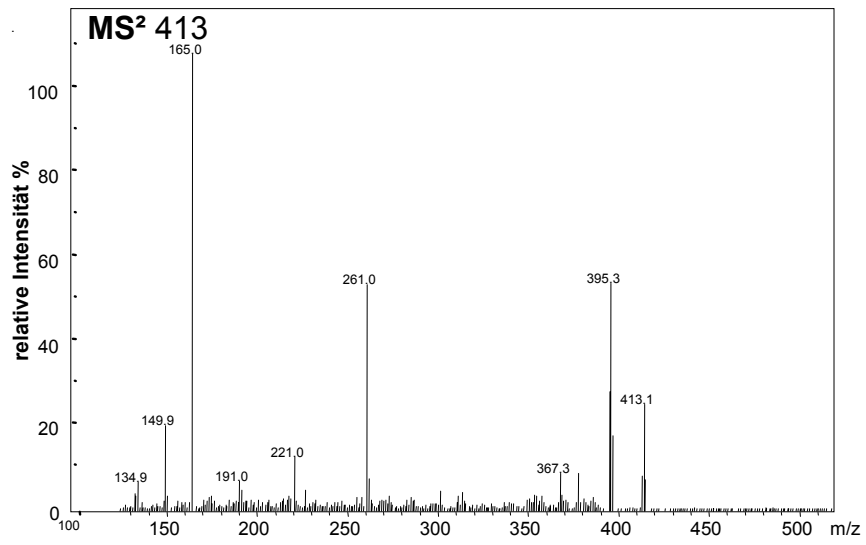
## M22



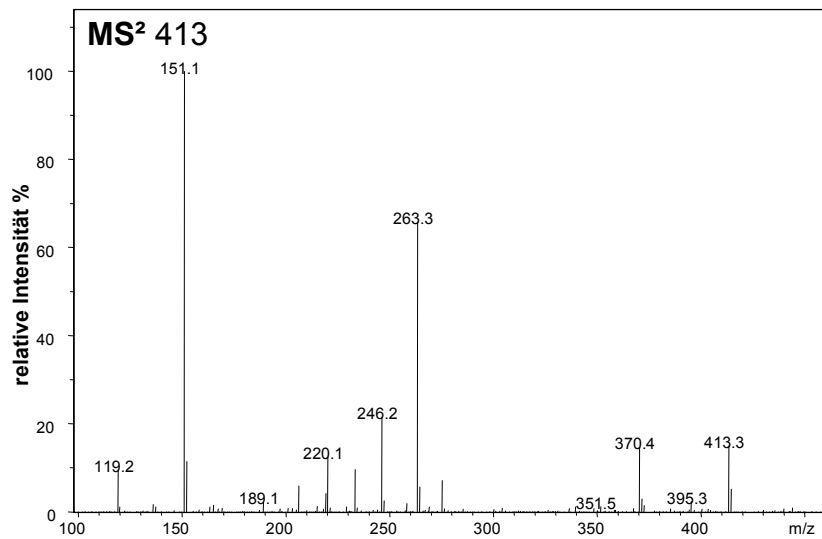
# M 23



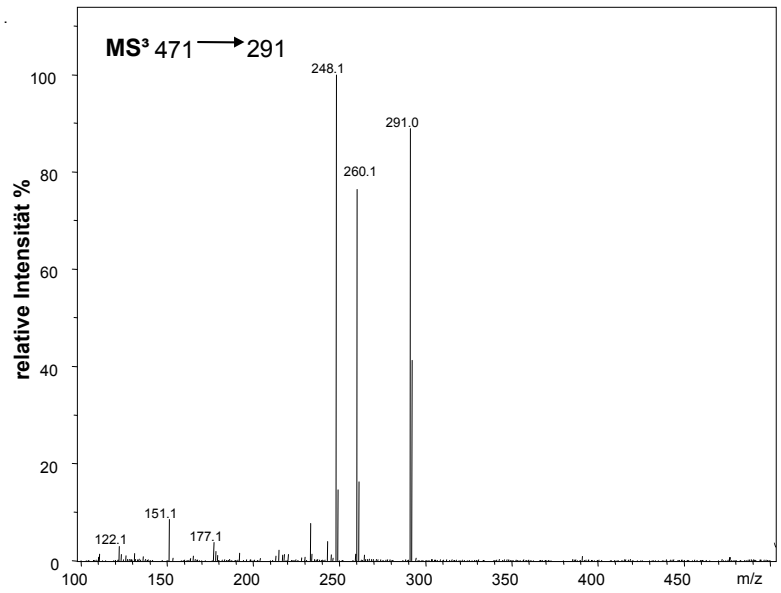
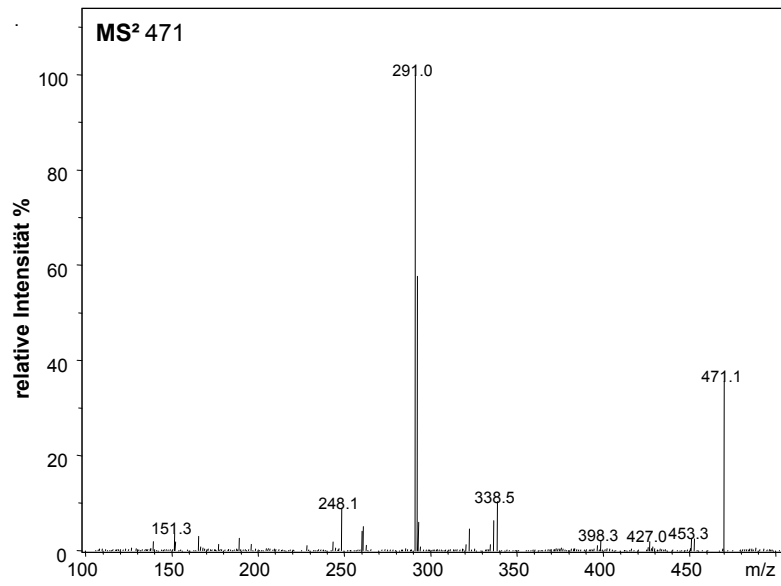
## M24



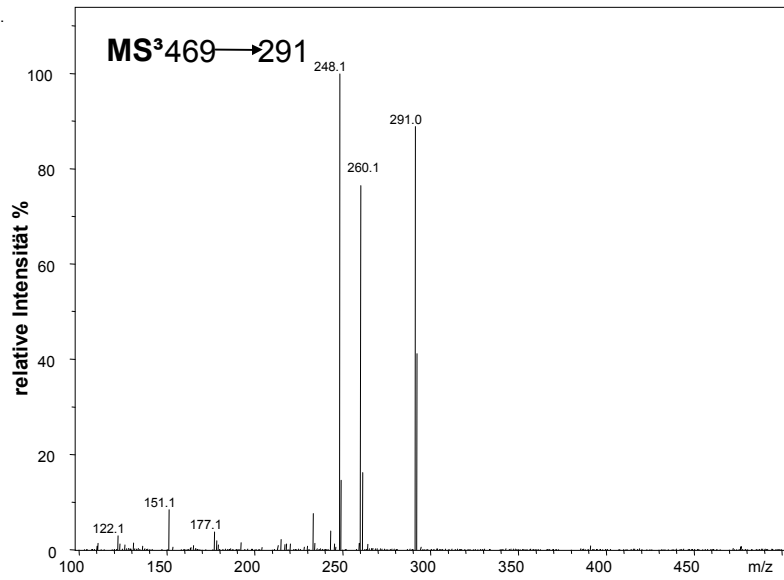
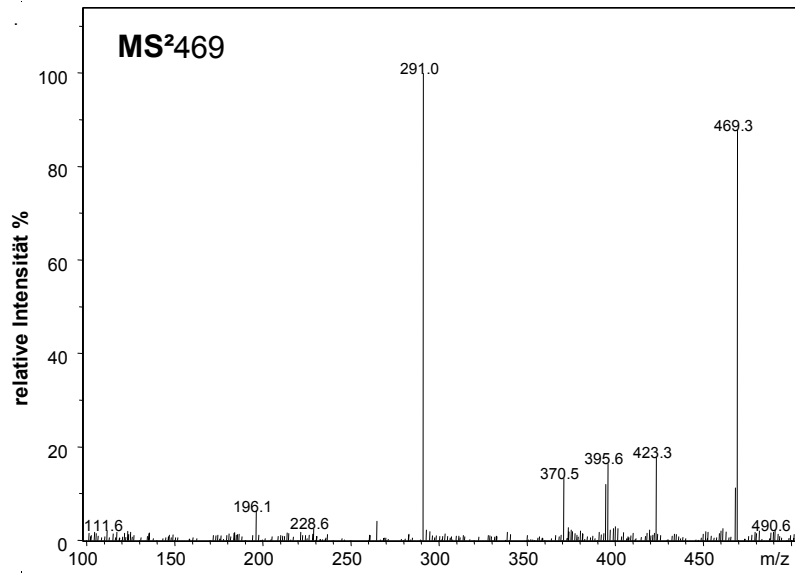
## M25



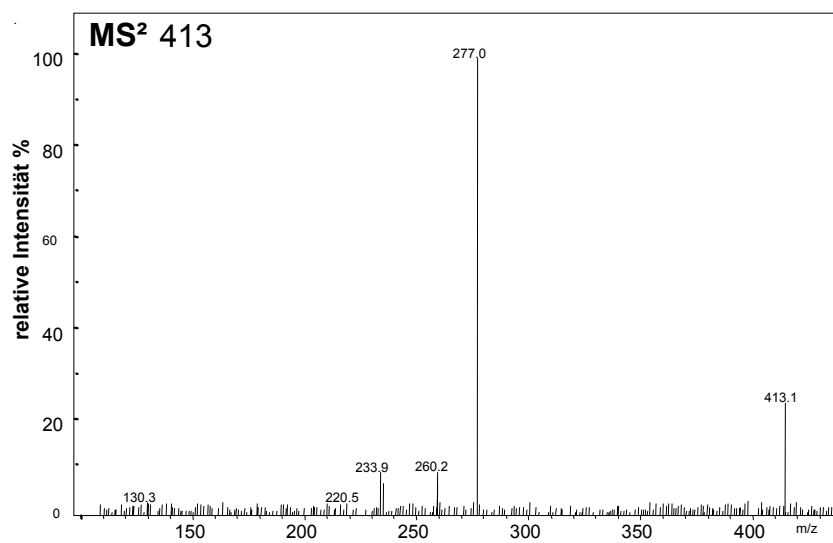
# M26



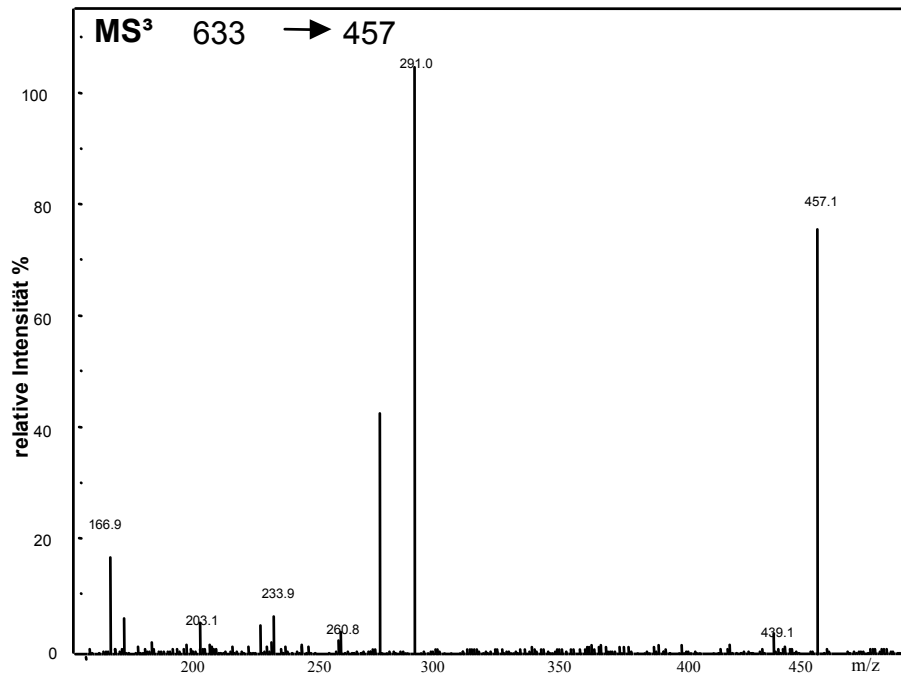
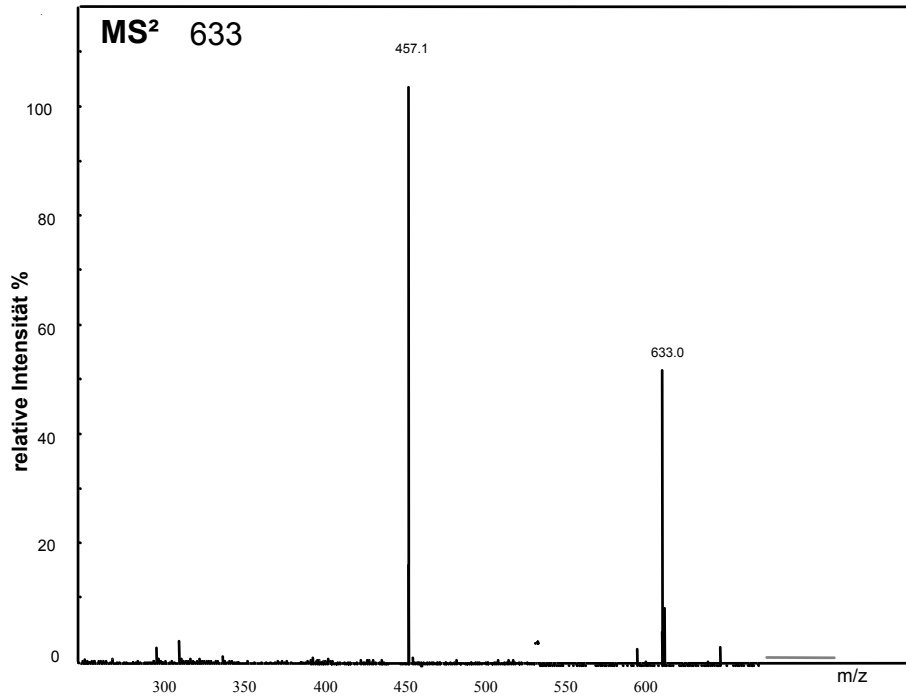
# M27



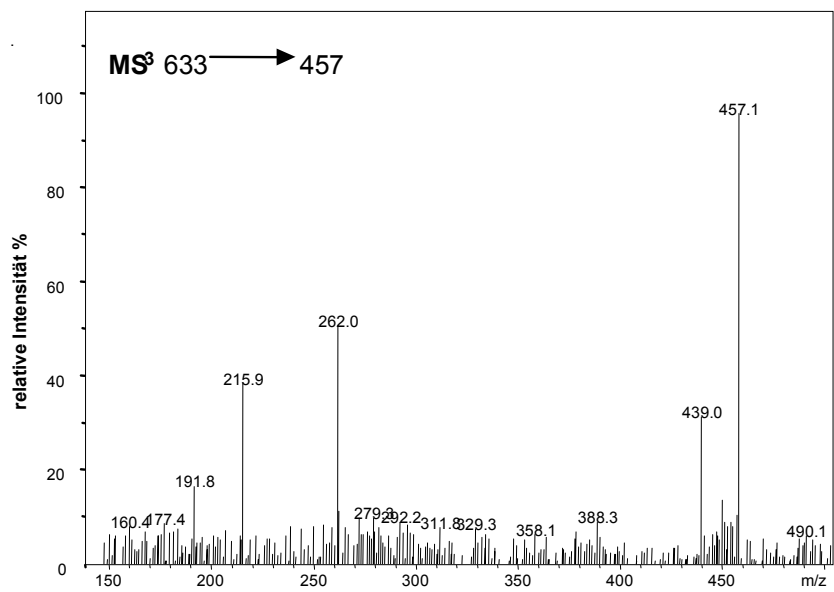
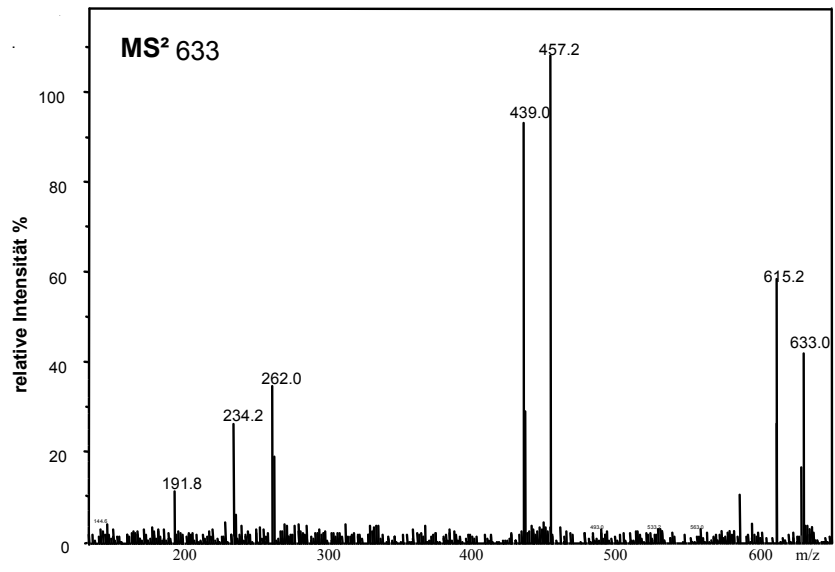
# M28



# M29

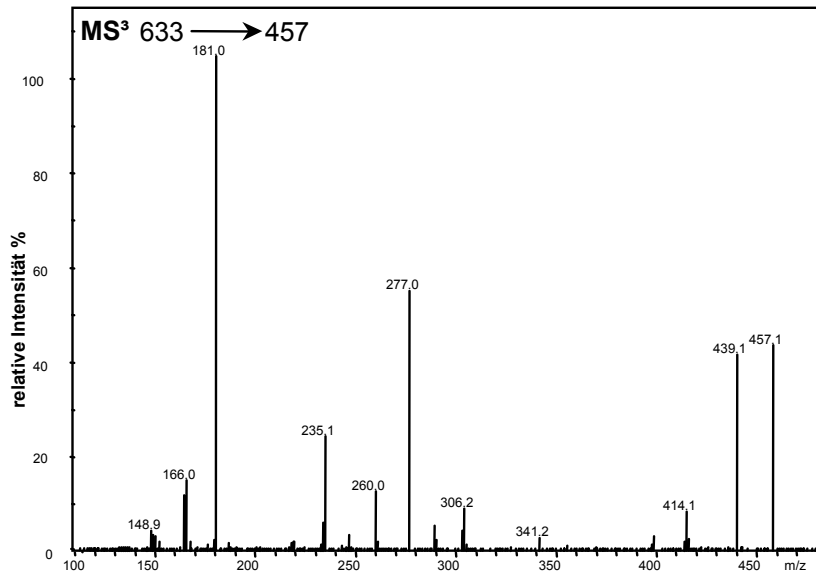
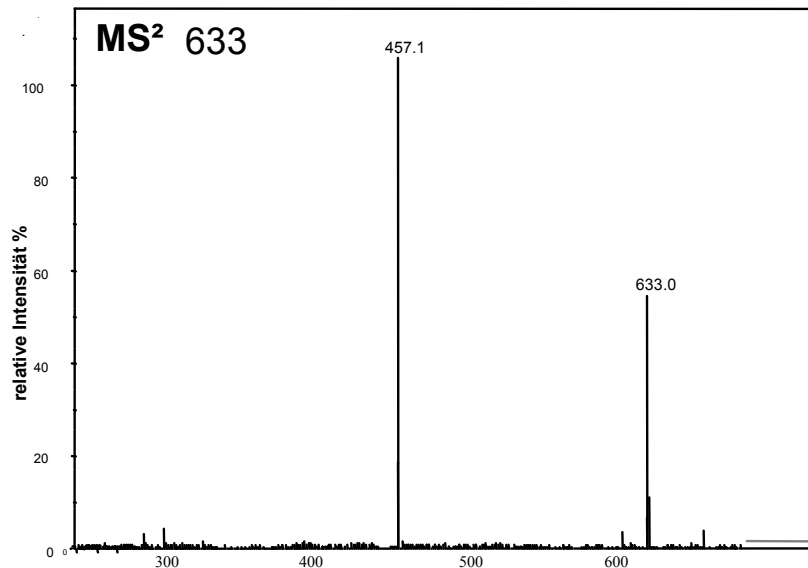


# M30

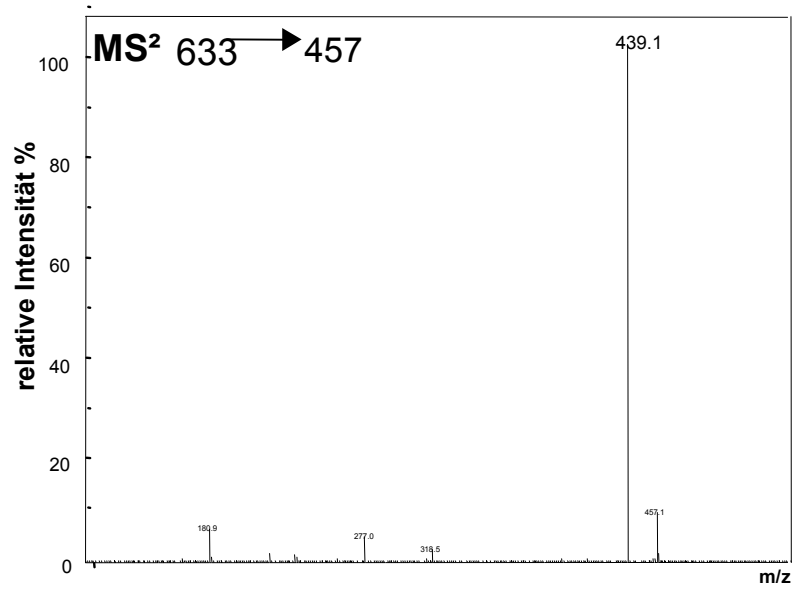
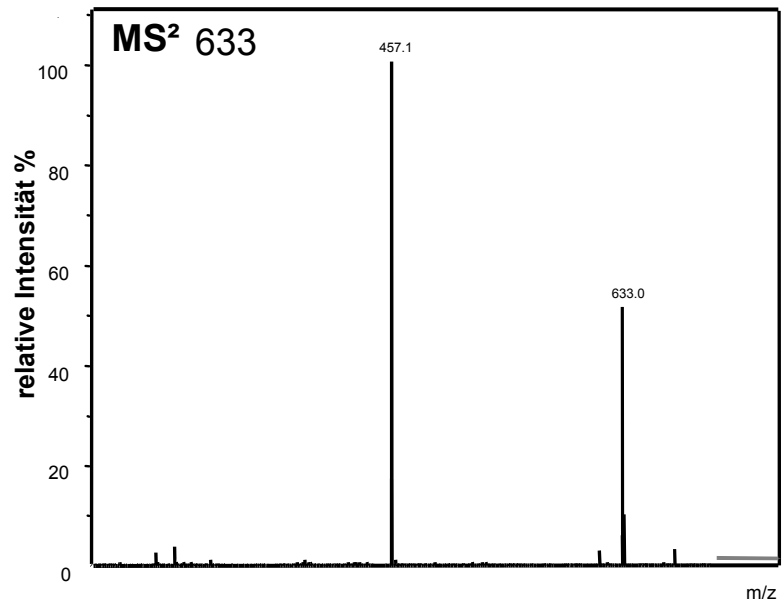




# M31

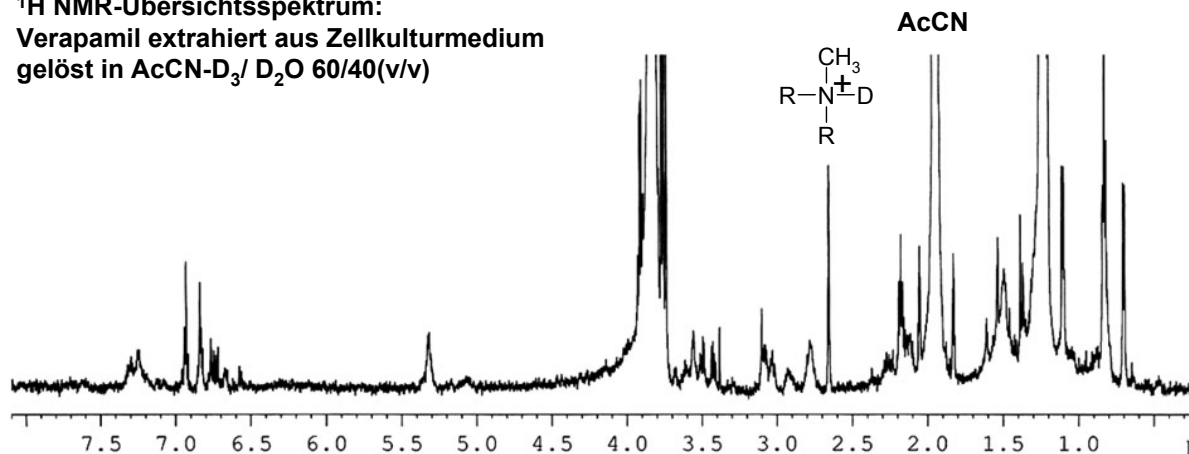


# M32

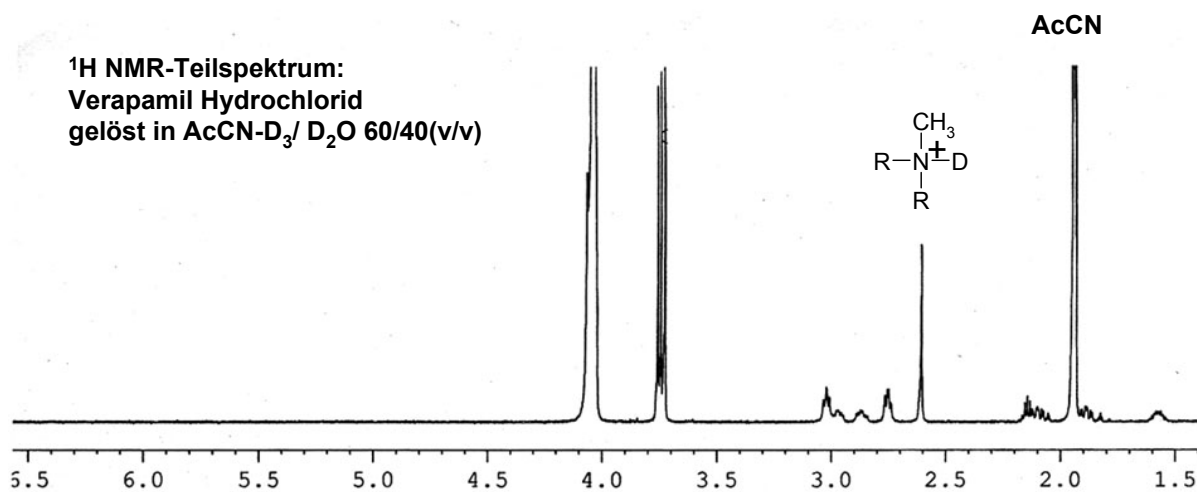


**$^1\text{H}$  NMR-Spektrum von Verapamil nach Extraktion aus Zellkulturmedium, und Vergleich mit dem  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von Verapamil-Hydrochlorid und der freien Base**

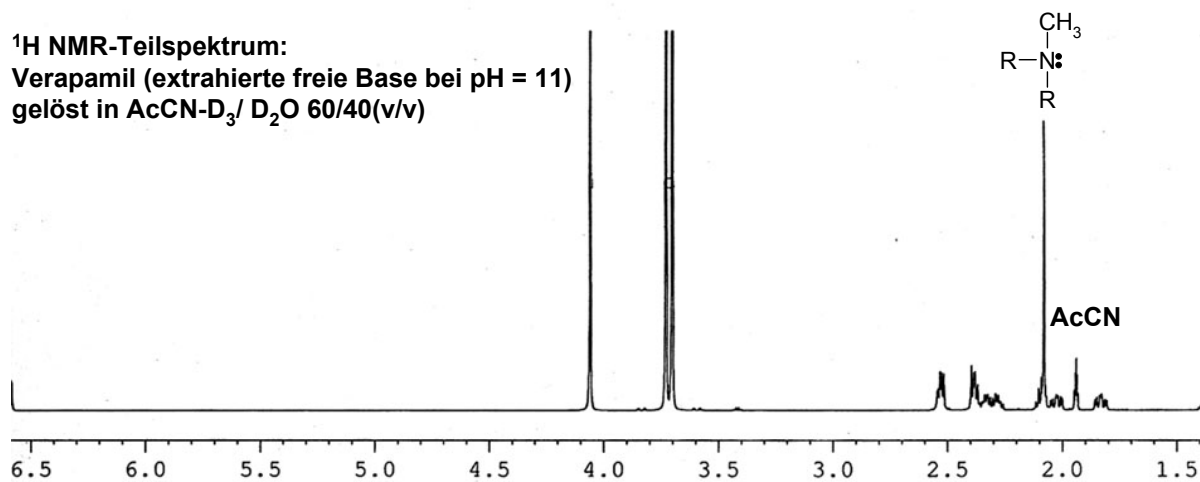
**$^1\text{H}$  NMR-Übersichtsspektrum:**  
 Verapamil extrahiert aus Zellkulturmedium  
 gelöst in  $\text{AcCN-D}_3/\text{D}_2\text{O}$  60/40(v/v)



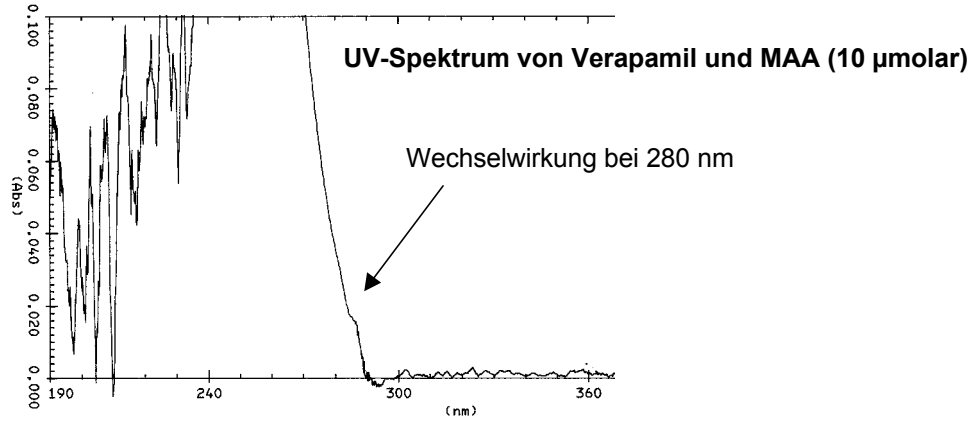
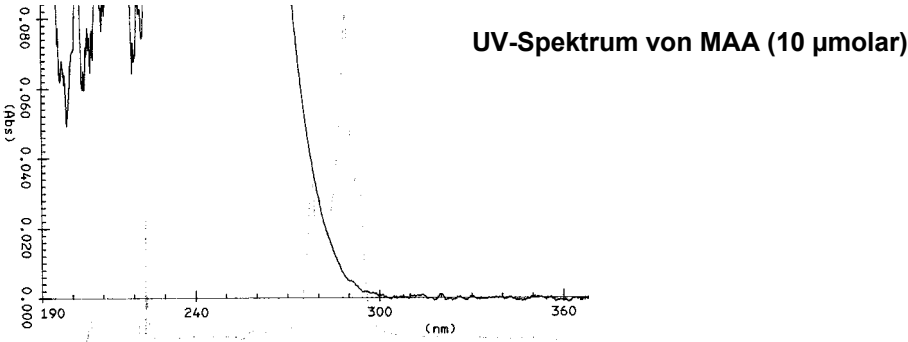
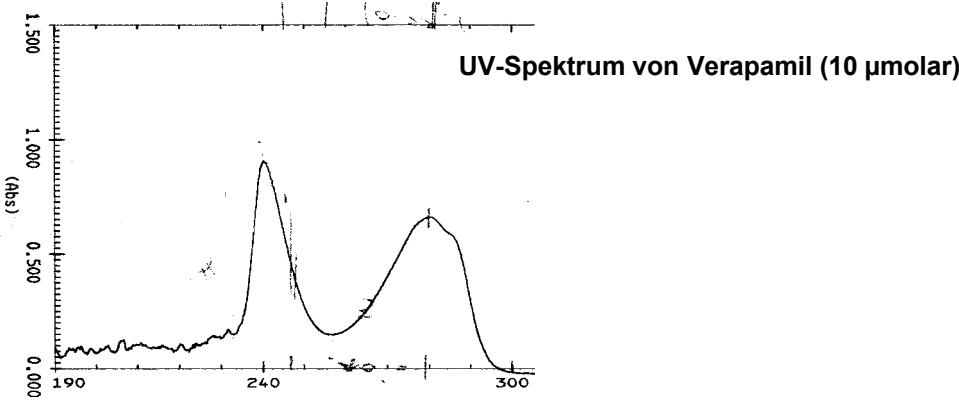
**$^1\text{H}$  NMR-Teilspektrum:**  
 Verapamil Hydrochlorid  
 gelöst in  $\text{AcCN-D}_3/\text{D}_2\text{O}$  60/40(v/v)



**$^1\text{H}$  NMR-Teilspektrum:**  
 Verapamil (extrahierte freie Base bei pH = 11)  
 gelöst in  $\text{AcCN-D}_3/\text{D}_2\text{O}$  60/40(v/v)



# MIP: UV-Spektroskopische Analyse



## Veröffentlichungen

### Artikel

**Walles, M.; Thum, T.; Levsen, K.; Borlak, J., 2001.** Verapamil metabolism in distinct regions of the heart and in cultures of cardiomyocytes of adult rats, *Drug Metab Dispos.* 29: 761-768.

**Koch, W.; Windt, H.; Walles, M.; Borlak, J.; Clausing, P., 2001.** Inhalation studies with the goettingen minipig, *Inhal Toxicol.*, 13: 249-59.

**Walles, M.; Thum, T.; Levsen, K.; Borlak, J.** Verapamil: new insight into the mechanism of drug oxidation in the human heart. *J. Chromatogr. A*, im Druck

**Walles, M.; Mullett, W.M.; Levsen, K.; Borlak, J.; Wunsch, G., Pawliszyn J.** Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, im Druck.

**Walles, M.; Thum, T.; Levsen, K.; Borlak, J.** New phase I and phase II metabolites of verapamil identified in cell cultures of rat hepatocytes by LC-MS<sup>n</sup>. *Drug Metab. Dispos.*, im April 2002 zur Publikation eingereicht.

**Walles, M.; Elend, M.; Preiss, A.; Levsen, K.; Borlak, J.** Investigation of the human metabolism of verapamil: new phase I and phase II metabolites identified by LC-MS<sup>n</sup> and LC-NMR. *Xenobiotica*, im April 2002 zur Publikation eingereicht.

**Mullett, W.M.; Walles, M.; Levsen, K.; Pawliszyn J.** New approaches for drug metabolism studies: on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by molecular imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.*, im April 2002 zur Publikation eingereicht.

**Walles, M.; Blickwede, M.; Borlak, J.; Wunsch, G.; Levsen, K.** Application of the ADS precolumn switching technique and MSPD for verapamil drug metabolism studies and pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B*, im April 2002 zur Publikation eingereicht.

### Vorträge

**Walles, M.; Thum, T.; Preiss, A.; Borlak, J.; Levsen K., 2000.** Metabolismusuntersuchungen mit HPLC-MS<sup>n</sup> am Beispiel von Verapamil, LifeCom, März 2000, Düsseldorf, Deutschland.

**Walles, M.; Thum, T.; Preiss, A.; Borlak, J.; Levsen K., 2001.** Metabolismusstudien mit HPLC-MS<sup>n</sup> und ADS-Säulenschaltung am Beispiel des Verapamil, GDCH-Chromatographieseminar in Hohenroda, Januar 2001, Hohenroda, Deutschland.

### Poster

**Walles, M., Thum, T., Preiss, A., Borlak, J., Levsen K., 2000.** Metabolismusuntersuchungen mit HPLC-MS<sup>n</sup> am Beispiel von Verapamil, DGMS-Tagung, Februar 2000, Berlin, Deutschland.

**Walles, M., Thum, T., Preiss, A., Borlak, J., Levsen K., 2001.** Metabolismusuntersuchungen mit HPLC-MS<sup>n</sup> und ADS-Säulenschaltung am Beispiel des Verapamil, Anakon, April 2001, Konstanz, Deutschland.

## Lebenslauf

Name: Markus Walles  
Geburtsdatum: 29.10.1973  
Geburtsort: Lingen  
Familienstand: ledig

## Schulausbildung

1980-1984 Grundschole am Roggenkamp, Nordhorn  
1984-1986 Orientierungstufe Deegfeld, Nordhorn  
1986-1993 Stadtringgymnasium, Nordhorn  
Mai 1993 Allgemeine Hochschulreife

## Studium

Oktober 1993- Oktober 1998 Chemiestudium an der Universität Göttingen  
Februar 1996 Diplomvorprüfung  
Mai 1996-Juli 1996 Studium an der Universität XI von Paris/Orsay, Frankreich,  
gefördert von ERASMUS  
August 1996-Oktober 1996 Praktikum bei der Bayer AG, Leverkusen  
Februar 1998-Oktober 1998 Diplomarbeit in der Abteilung Toxikologie im Zentrum für  
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Göttingen  
Thema: *Studie zum Metabolismus des Piperonylbutoxids und  
seiner inhibitorischen Wirkung auf das Cytochrom  
P450-System*  
Oktober 1998 Diplomprüfung

## Promotion

Januar 1999-April 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für  
Toxikologie und Aerosolforschung ITA, Hannover, Promotion  
unter der Leitung von Prof. Dr. Karsten Levsen (Analytische  
Chemie), PD Dr. Jürgen Borlak (Pharmaforschung und  
medizinische Biotechnologie) und Prof. Dr. Gerold Wunsch  
(Institut für Anorganische Chemie der Universität Hannover)  
Thema: *Neue Analysenmethoden für Metabolismusstudien am  
Beispiel des Calciumantagonisten Verapamil*

## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerold Wunsch, für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung sowie die hilfreichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Levsen und Herrn Privatdozent Dr. Jürgen Borlak danke ich für das interessante Thema im Bereich Metabolismusforschung, die wertvollen Diskussionen und die Förderung der Arbeit, die zum Gelingen der Promotion beigetragen haben sowie für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Analytische Chemie und der Abteilung für Pharmaforschung und medizinische Biotechnologie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit stets eine angenehme und kollegiale Atmosphäre geschaffen haben.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Alfred Preiss, Dr. Martin Sandvoss und Manfred Elend für die Unterstützung bei den NMR-Messungen und Thomas Thum sowie Maren Blickwede, Carolin Zwadlow und Iona Vata für die Versorgung mit biologischen Proben.

Bei Herrn Privatdozent Dr. Wolfgang Koch bedanke ich mich für das Modellieren der Pharmakokinetiken.

Dr. Wayne Mullett (University of Waterloo, Ontario, Kanada) danke ich für die Einführung in die Welt der MIPs und Herrn Prof. Dr. Janusz Pawliszyn (University of Waterloo, Ontario, Kanada) für wertvolle Diskussionen und Anregungen bezüglich der in-tube SPME.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei den Firmen Bruker-Daltonik (Bremen), Bruker Analytische Meßtechnik GmbH (Rheinstetten) sowie Agilent (Waldbronn).

Bei den Herren Dr. Axel Saft, Dr. Christoph Grote, Dr. Martin Sandvoss und meinem Kollegen Lutz Elflein bedanke ich mich für das abendliche Unterhaltungsprogramm außerhalb des Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Katrin Fricke für das Korrekturlesen der Arbeit und die Nachhilfestunden in Pharmakologie.

Bei meinem Bruder Dr. Thorsten Walles bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft bezüglich medizinischen und pharmakologischen Fragestellungen.

Mein herzlicher Dank gilt zuletzt meinen Eltern und Großeltern, die mich auch schon während meines Studiums immer unterstützt haben.