Julia Catherina Wessel

Erstmaliger Nachweis von Oxalsäurederivaten bei der Biotransformation von Metamizol im bebrüteten Hühnerei und beim Menschen

Cuvillier Verlag Göttingen

Erstmaliger Nachweis von Oxalsäurederivaten bei der Biotransformation von Metamizol im bebrüteten Hühnerei und beim Menschen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Catherina Wessel

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004
Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2004
ISBN 3-86537-283-X

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Weber

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. T. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2004

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2004
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-283-X

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

1.1 Bedeutung von Metamizol in der modernen Schmerztherapie 3

1.2 Wirkmechanismus der NSAR 6

1.2.1 Hemmung der Prostaglandinsynthese 6

1.2.2 Aktueller Erkenntnisstand zum Wirkmechanismus der NSAR 9

1.3 Wirkungsmechanismus von Metamizol (1) 10

1.3.1 Hemmung der Cyclooxygenase 10

1.3.2 Zentral vermittelte Wirkungsmechanismen von Metamizol (1) 12

1.3.3 Mechanismen der spasmolytischen Wirkung von (1) 13

1.3.4 Beeinflussung oxidativer Vorgänge im Schmerz- und Entzündungsgeschehen 15

1.4 Biotransformation von Metamizol (1) 16

1.4.1 Literaturbefunde 16

1.4.2 Potentielle oxidative Ringöffnung bei der Biotransformation von Metamizol (1) 18

1.5 Zielsetzung der Arbeit 21

2 ANALYTIK DER METHYLOXAMIDSÄURE (9) 23

2.1 Synthese der Methyloxamidsäure (9) 25

2.1.1 Synthese aus Metamizol (1) 25

2.1.2 Synthese aus Oxalsäurediethylester 26

2.2 Derivatisierung der Methyloxamidsäure (9) 27

2.2.1 Darstellung von Phenacylestern durch Umsetzung mit Phenacylbromiden 27

2.2.2 Darstellung von Carbonsäurebenzylestern unter Verwendung von DCC 29

2.2.2.1 Spektrale Daten von 19 31

2.2.2.2 Reaktionsmechanismus zur Bildung von 19 34

2.2.2.3 Einfluss der Molekülstruktur von 9, 14 und 15 auf die Reaktion mit DCC 36

2.2.3 Darstellung von Carbonsäurebenzylestern unter Verwendung von CDI 37

2.2.4 Darstellung von Carbonsäuremethylestern unter Verwendung von Diazomethan 40

2.3 Quantitative Extraktion der Methyloxamidsäure (9) aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie 42

2.3.1 Einfluss der Acidität von 9 auf die Extrahierbarkeit aus wässriger Lösung 42

2.3.2 Anwendung der Ionenaustauschchromatographie in der Harnanalytik 43

2.3.2.1 Entstehung von 15 im Humanstoffwechsel 45

2.3.3 Entwicklung einer optimierten Methode zur Isolierung von 9 aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie 47

2.3.3.1 Modellversuch zur Verwendung von Trifluoressigsäure als Elutionsmittel 47

2.3.3.2 Modellversuch zur Abtrennung von Aminosäuren durch Verwendung eines Kationenaustauschers ... 49
2.3.4 Kombinierte Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von **9** aus biologischem Material ... 50
2.4 Gaschromatographische Auftrennung der Säureextrakte ... 51
2.4.1 Trifluoressigsäureextrakt einer Urinprobe ... 51
2.4.1.1 Analytik des Oxalsäuredimethylesters (**24**) ... 53
2.4.2 Trifluoressigsäureextrakt einer Blindprobe nach Zumischen von Methyloxamidsäure (**9**) ... 53

3 METABOLISIERUNG DER METHYLOXAMIDSÄURE (9) IN DER RATTE 57

3.1 Bisheriger Erkenntnisstand zur Biotransformation der Methyloxamidsäure (9) ... 59
3.2 Aufbau und Durchführung der Metabolisierungsstudie an der Ratte ... 60
3.2.1 Qualitative Analytik des Rattenurins ... 60
3.2.2 Quantitative Analytik des Rattenurins ... 61
3.2.2.1 Erstellung einer Eichgeraden von **22** ... 62
3.2.2.2 Ermittlung der Konzentration von **22** im Rattenurin ... 63
3.3 Interpretation des Rattenexperiments für die Analytik von 9 im Humanurin ... 65

4 METABOLISIERUNG VON METAMIZOL (1) IM BEBRÜTETEN HÜHNEREI 67

4.1 Das bebrütete Hühnerei als Modell zur Untersuchung von Stoffwechselreaktionen ... 69
4.1.1 Biotransformation im Hühnerembryo ... 69
4.2 Literaturbefund zum Metabolismus von Metamizol (1) im bebrüteten Hühnerei ... 72
4.3 Eigene Untersuchungen zum Metabolismus von 1 am bebrüteten Hühnerei ... 74
4.3.1 Zielsetzung ... 74
4.3.2 Versuchsdurchführung ... 75
4.3.2.1 Inokulationsbedingungen und Bebrütung der Hühnereier ... 75
4.3.2.2 Aufarbeitung der Allantoisflüssigkeit ... 78
4.3.2.3 Gaschromatographische Untersuchung der Extrakte ... 78
4.3.3 Ergebnisse ... 79
4.3.3.1 Einfluss von **1**, **7** und **9** auf die Entwicklung der Hühnerembryonen ... 79
4.3.3.2 Analytik der Methyloxamidsäure (**9**) ... 80
4.3.3.3 Analytik der lipophilen Metaboliten durch Flüssig-flüssig-Extraktion ... 84
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 89

5 METABOLISIERUNG VON METAMIZOL (1) IM HUMANSTOFFWECHSEL 91

5.1 Zielsetzung ... 93

5.2 Versuchsdurchführung ... 93

5.2.1 Applikation von **1**, Gewinnung des Probenmaterials ... 93

5.2.2 Aufarbeitung der Urinproben ... 94

5.3 Ergebnisse ... 94

5.3.1 Analytik der lipophilen Metaboliten durch Flüssig-flüssig-Extraktion ... 94

5.3.2 Analytik der Methyloxamidsäure (**9**) ... 97

5.3.3 Untersuchung der Gaschromatogramme auf weitere potentielle Ringöffnungsprodukte des Metamizols (**1**) ... 97

5.3.3.1 Synthese von **25** aus **1**, bzw. **6** ... 100

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 102

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 105

6.1 Zusammenfassung ... 107

6.1.1 Zielsetzung ... 108

6.1.2 Entwicklung eines Nachweisverfahrens für **9** ... 108

6.1.3 Untersuchungen zum Metabolismus von Metamizol (**1**) ... 109

6.1.4 Fazit ... 110

6.2 Ausblick ... 111

7 EXPERIMENTELLER TEIL 113

7.1 Verwendete Geräte ... 115

7.2 Verzeichnis der Abkürzungen ... 117

7.3 Chemikalien/Materialien ... 120

7.3.1 Gaschromatographie ... 120

7.3.2 Säulenchromatographie ... 120

7.3.3 Ionenaustauschchromatographie ... 120

7.3.4 Dünnschichtchromatographie ... 121

7.3.5 Verwendete Chemikalien ... 122

7.3.6 Puffer ... 123

7.3.7 Enzyme ... 123

7.4 Versuchsdurchführung ... 124

7.4.1 Ionenaustauschchromatographie ... 124

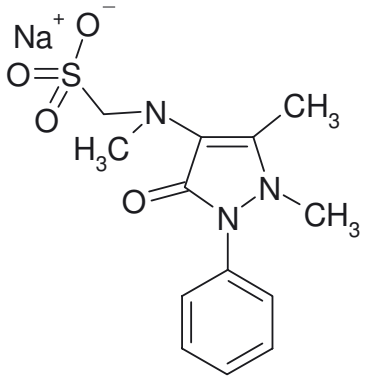
7.4.1.1 Modellversuch zur Verwendung von Trifluoressigsäure als Elutionsmittel ... 124

7.4.1.2 Modellversuch zur Abtrennung von Aminosäuren durch Verwendung eines Kationenaustauschers ... 125
7.4.2.1 Versuchstiere ... 126
7.4.2.2 Durchführung ... 126
7.4.2.3 Aufarbeitung des Probenmaterials ... 127
7.4.2.4 Gaschromatographische Untersuchung ... 127
7.4.3 Metabolisierung von Metamizol (**1**) im bebrüteten Hühnerei ... 130
7.4.3.1 Bruteier ... 130
7.4.3.2 Applizierte Substanzen ... 130
7.4.3.3 Applikation der Substanzen, Inkubation und Extraktion der AF ... 130
7.4.3.4 Extraktion ... 131
7.4.3.5 HCl-Konjugatspaltung ... 131
7.4.3.6 Gaschromatographische Untersuchung ... 131
7.4.4 Metabolisierung von Metamizol (**1**) im Humanstoffwechsel ... 133
7.4.4.1 Versuchsdurchführung ... 133
7.4.4.2 Extraktion ... 133
7.4.4.3 Konjugatspaltung ... 133
7.4.4.4 Gaschromatographische Untersuchungen ... 134
7.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften ... 136
7.6 Charakterisierung der Substanzen ... 138

8 LITERATURVERZEICHNIS 165

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Bedeutung von Metamizol in der modernen Schmerztherapie



Metamizol-Natrium

1

Seit Jahrzehnten ist der Arzneistoff Metamizol (**1**) ein wichtiger Bestandteil der analgetischen Therapie. Er wurde als Weiterentwicklung der bekannten Pyrazolinonderivate synthetisiert und ist seit 1922 unter dem Namen Novalgin® im Handel.

Durch Einführung einer Sulfonsäurestruktur und Bildung des Natriumsalzes konnte eine wasserlösliche Formulierung erzielt werden. Dies erlaubt auch die intravenöse Applikation des Arzneistoffs.

1 gehört zu den so genannten NSAR (Nichtsteroidale Antirheumatika) und verfügt neben seiner analgetischen Wirkung über eine antipyretische sowie eine spasmolytische Wirkkomponente. Deshalb ist es neben der Behandlung von starken akuten und chronischen Schmerzzuständen auch zur Behandlung von Tumorschmerzen und Koliken zugelassen[1]. Die Anwendung ist beschränkt auf Schmerzzustände, bei denen die Anwendung von Acetylsalicylsäure und anderen nicht steroidalen Analgetika nicht ausreichend ist. Diese Anwendungsbeschränkungen und die Einführung der Verschreibungspflicht im Jahre 1987 sind Folgen des in den 60er und 70er Jahren entdeckten Zusammenhangs zwischen der Einnahme von Metamizol (**1**) und dem Auftreten einer Agranulozytose.

---

[1] *Fachinformation Novalgin®*, Aventis Pharma, Stand Februar **2003**

Bereits seit Jahrzehnten wird das Nutzen-Risiko-Potential von **1** kontrovers diskutiert und beurteilt. Dies hatte zur Folge, dass der Arzneistoff in vielen Ländern gänzlich vom Markt verschwunden ist, währenddessen er besonders in Entwicklungsländern großen Einsatz findet und ohne Verschreibung erhältlich ist. In Ländern wie Großbritannien, USA, Kanada und Australien ist Metamizol (**1**) seit Jahrzehnten aus der Therapie verschwunden[2].

Beispielsweise verlor **1** 1974 in Schweden die Zulassung, da das Risiko der Agranulozytose zu diesem Zeitpunkt mit einer Inzidenz von 1:3.000 beurteilt wurde. Nachdem neuere Studien das Risiko auf 1:20.000 – 1:30.000 einschätzten (z.B. IAAAS, International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study), erfolgte 1995 eine erneute Markteinführung in diesem Land, die allerdings im Jahre 1999 von der Firma Hoechst wieder zurück genommen wurde, da trotz geringer Anwenderzahlen innerhalb eines Jahres sieben Fälle einer Agranulozytose eintraten. Nach diesen Anwendungsbeobachtungen schätzten die schwedischen Behörden die damalige Inzidenz auf 1:1700[3].

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es nicht gelungen, das Agranulozytose-Risiko genau zu beziffern. So schwanken die veröffentlichten Zahlen zwischen einer Inzidenz von 1:1.700 und 1:1.500.000.

Die Herstellerfirma Hoechst beruft sich auf einen Vergleich der potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen von vier häufig verwendeten Analgetika (Metamizol (**1**), Paracetamol, Acetylsalicylsäure, Diclofenac)[4]. Hier wurden die Daten für das Auftreten gastrointestinaler Blutungen, Anaphylaxien, anaplastischer Anämien und Agranulozytosen aus einschlägigen Studien entnommen und bewertet. Für jedes Analgetikum wurde die zusätzliche Mortalität innerhalb einer Anwendungswoche berechnet (Mortalität nach Einnahme des Arzneistoffes aufgrund einer der genannten Nebenwirkungen, abzüglich der Basismortalität ohne Einnahme des Arzneistoffs aufgrund einer dieser Ursachen (siehe Abbildung 1).

---

[2] J. E. Edwards, H. J. McQuay, *Lancet*, **2002**, *360*, 1438

[3] *arznei-telegramm*, **1999**, *6*, 64 - 65

[4] S. E. Andrade, C. Martinez, A. M. Walker, *J. Clin. Epidemiol.*, **1998**, *12*, 1357 - 1365

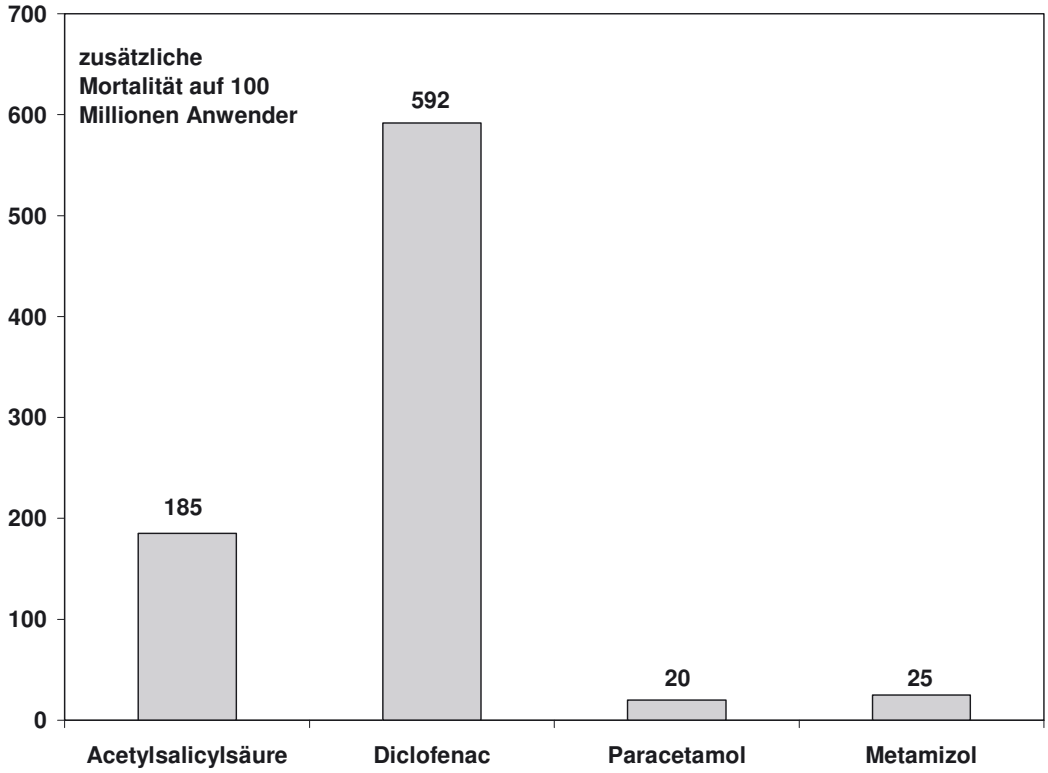


Abbildung 1: Mortalitätsrisiko gebräuchlicher Analgetika

1 schnitt neben Paracetamol als das Arzneimittel mit der geringsten Zusatzmortalität ab. Zwar liegt das Risiko einer Agranulozytose nach Einnahme von Metamizol um ein vielfaches höher, als nach Einnahme eines der drei anderen Analgetika, allerdings weist Metamizol eine hundertfach geringere Rate an schweren gastrointestinalen Komplikationen auf als z.B. Diclofenac. Somit erweist sich **1** trotz des Risikos einer Agranulozytose als ein risikoärmeres Analgetikum als die freiverkäufliche Acetylsalicylsäure oder das häufig verschriebene Diclofenac.

Den Diskussionen zum Thema Agranulozytose zum Trotz gehört Metamizol (**1**) im klinischen Bereich zu den häufig verwendeten Analgetika. Hier macht man sich neben der analgetischen Wirkung besonders die spasmolytische Wirkung bei der Therapie von Koliken zu Nutze. Außerdem ermöglicht die Gabe von **1** in vielen Fällen die Reduktion bzw. das Absetzen von opioden Analgetika. Allerdings ist besonders bei der intravenösen Verabreichung dieser Substanz Vorsicht geboten, da es bei einer zu schnellen Injektion zu anaphylaktischen Schockreaktionen kommen kann.

Aufgrund der aktuellen Diskussion über diesen altbewährten Arzneistoff besteht auch zum heutigen Zeitpunkt die Notwendigkeit, sich mit der Wirkung von **1** auf den Humanstoffwechsel zu beschäftigen.

1.2 Wirkmechanismus der NSAR

Der Wirkungsmechanismus der NSAR ist bis heute nicht vollständig geklärt. Bis in die 90er Jahre wurde die Wirkung dieser Arzneistoffe ausschließlich auf die Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückgeführt.

1.2.1 Hemmung der Prostaglandinsynthese

Prostaglandine sind wesentlich an der Entstehung und Unterhaltung von Schmerz, Fieber und Entzündungsprozessen im menschlichen Körper beteiligt. Durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität unterstützen sie die Einwanderung von Entzündungsmediatoren. Außerdem sensibilisieren sie die Nozizeptoren für die Wirkung von Schmerzmediatoren (z.B. Bradykinin). Prostaglandin E_2 vermittelt zusätzlich im zentralen Nervensystem die Entstehung von Fieber.

Prostaglandine werden im Körper durch eine mehrstufige Biosynthese gebildet: Arachidonsäure wird von der Phospholipase A_2 aus der Membran freigesetzt und anschließend von der Cyclooxygenase in zwei Folgereaktionen in Prostaglandin PGH_2 umgewandelt. (Zuerst erfolgt durch die eigentliche Cyclooxygenase-Reaktion die Einführung einer Endoperoxidgruppe und anschließend wird in der Peroxidase-Reaktion die Peroxigruppe an Position 15 zur Hydroxygruppe reduziert.) Dieses stellt die Vorstufe der Prostaglandine, sowie des Prostacyclins und des Thromboxans dar (siehe Abbildung 2). Die nicht-opioden Analgetika greifen durch Hemmung der Cyclooxygenase in diese Biosynthese ein, und vermindern dadurch die Bildung der Prostaglandine.

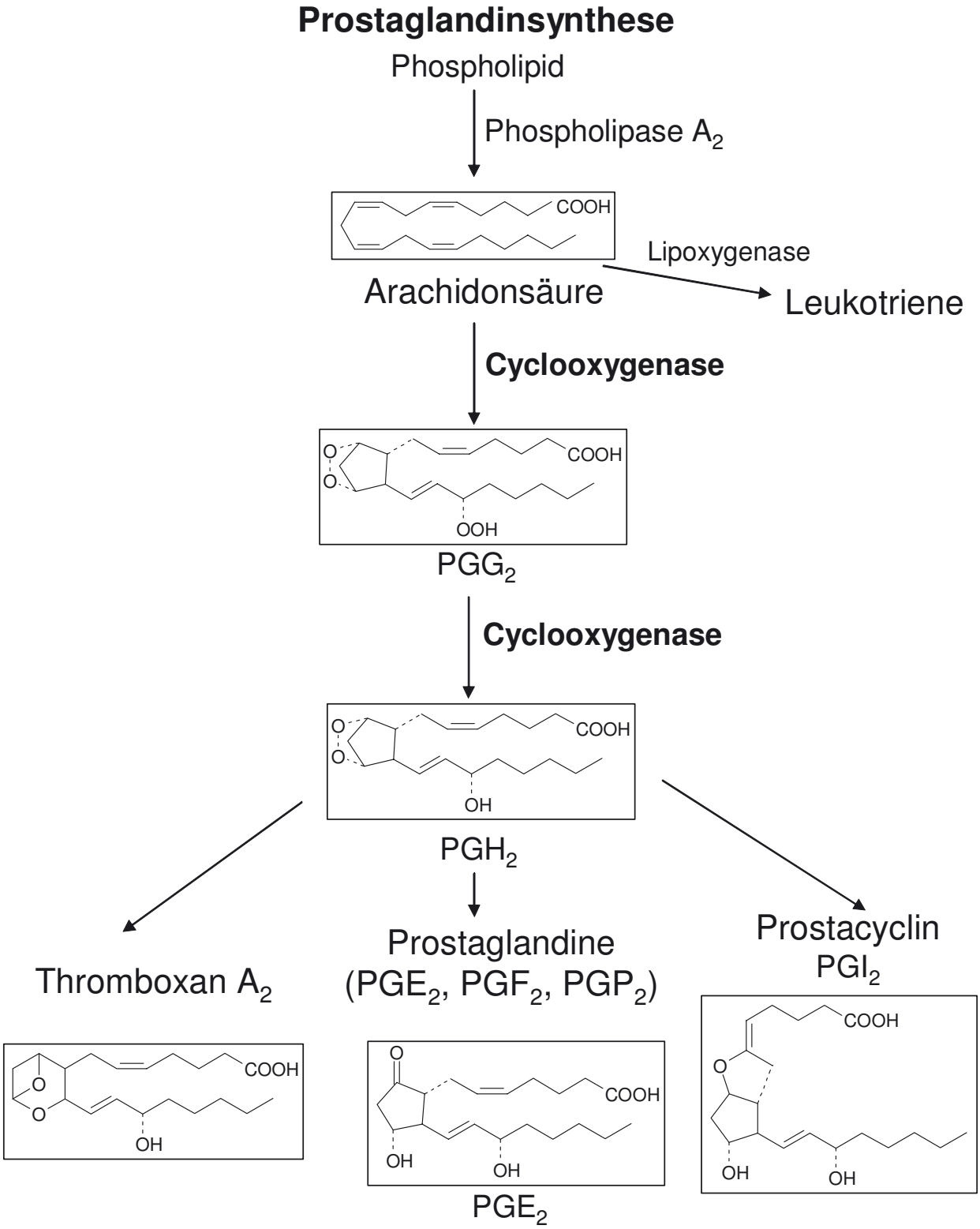


Abbildung 2: Prostaglandinsynthese

Bisher waren zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase bekannt: In den 70er Jahren wurde erstmals die cyclooxygenasehemmende Wirkung der sauren Analgetika

publiziert[5]. Anfang der 90er konnte die Struktur der COX-1 von Smith und Marnett beschrieben werden[6]. 1991 wurde von mehreren Arbeitsgruppen die COX-2 identifiziert und ihre Struktur analysiert[7]. Diese beiden Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verteilung in Geweben und Expressionsregulation. Während die COX-1 als konstitutives Enzym zahlreiche Stoffwechselprozesse steuert wie z. B die Regulation der Magensäuresekretion, und damit eine Schutzfunktion im menschlichen Körper besitzt, wird die COX-2 als induzierbares Enzym bezeichnet. Die Induktion erfolgt vor allem im Rahmen von Entzündungen oder Gewebeschädigungen durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren.

Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass eine selektive Hemmung der COX-2 für die Bekämpfung von Entzündungen und Schmerzen optimal sei, da hierbei die physiologischen Funktionen der COX-1 nicht beeinträchtigt würden. Hierdurch erhoffte man sich eine Reduktion der bekannten Nebenwirkungen, die durch die Hemmung der COX-1 zustande kommen, wie z.B. die Bildung von Magen-Darm-Ulzera. Diese Hypothese konnte durch Anwendung selektiver COX-2 Hemmstoffe, wie z. B. Rofecoxib nicht bestätigt werden. Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass es bei Gabe dieser neuen Arzneistoffe ebenfalls zu unerwünschten Nebenwirkungen kommt[z. B.8.]

Im Jahr 2002 wurde neben der COX-1 und COX-2 eine neue Isoform der Cyclooxygenase entdeckt. Die so genannte COX-3 ist hauptsächlich im Gehirn lokalisiert und könnte eine Erklärung für die Wirkung des altbekannten Analgetikums Paracetamol bieten[9]. Allerdings sind die für eine Hemmung der COX-3 benötigten Konzentrationen relativ hoch und werden bei einer normalen Dosierung nicht erreicht. Deshalb kann nach Meinung von Experten diese spezifische Hemmwirkung nicht die Ursache der analgetischen Wirkung von

---

[5] J. R. Vane, *Nature New Biol.*, **1971**, *231*, 232 - 235

[6] W. L. Smith, L. J. Marnett, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1083*, 1 - 17

[7] J. Sirois, J. S. Richards, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 6382 - 6388

[8] C. Bombardier, L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, R. Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M. B. Ferraz, C. J. Hawkey, M. C. Hochberg, T. K. Kvien, T. J. Schnitzer; VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1520 -1528

[9] N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. T. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton D. L. Simmons, Proc. Natl. Acad. Sci., **2002**, *99*, 13926 - 13931

Paracetamol sein[10]. Vielmehr wird als wahrscheinlich erachtet, dass Paracetamol auf andere Weise in die Prostaglandinsynthese eingreift. Nach jüngsten Untersuchungen[11] soll sich dieser Arzneistoff aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften restriktiv auf die Entstehung der Entzündungsmediatoren auswirken. Dabei wird die Peroxidase-Reaktion gehemmt, die für die Reduktion von PGG_2 in PGH_2 verantwortlich ist. Paracetamol scheint also nicht über eine spezifische Hemmwirkung die Aktivität der COX zu beeinflussen, sondern kann durch seine oxidierbare Struktur selbst in Redoxreaktionen eingreifen, die für die Entstehung von Schmerzen notwendig sind.

1.2.2 Aktueller Erkenntnisstand zum Wirkmechanismus der NSAR

Als weiterer möglicher Angriffspunkt der NSAR werden die neu entdeckten Prostaglandin-Transporter genannt. Diese Transporter gehören zu den sogenannten „ABC-Transportern“, die eine Vielzahl von Substanzen unter Verbrauch von ATP (ABC = ATP-binding cassette) durch Biomembranen transportieren. Für eine Reihe der bekannten Analgetika, insbesondere mit Arylpropionsäurestruktur, konnte eine Blockade des so genannten MRP4-Rezeptors nachgewiesen werden[12].

Ein ebenfalls neues Wirkprinzip könnte eine Unterbindung der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Schmerz- und Entzündungsgeschehen darstellen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten einen Einfluss von Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und Ibuprofen auf die Aktivierung von NF-κB feststellen[13,14,15]. NF-κB induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, die für die Entstehung von Entzündungsmediatoren (z.B. IL-1) verantwortlich sind.

---

[10] Interview mit B. Hinz, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **2003**, *143*, 2160 - 2161

[11] O. Boutaud, D. M. Aronoff, J. H. Richardson, L. J. Marnett, J. A. Oates, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 7130 - 7135

[12] G. Reid, P. Wielinga, N. Zelcer, I. van der Heijden, A. Kuil, M. de Haas, J. Wijnholds, P. Borst, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 9244 - 9249

[13] E. Kopp, S. Gosh, *Science*, **1994**, *265*, 956 - 959

[14] M. J. Yin, Y. Yamamoto, R. B. Gaynor, *Nature*, **1998**, *396*, 77 - 80

[15] N. Scheuren, H. Bang, T. Münster, K. Brune, A. Pahl, *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, *123*, 645 - 652

Abramson und Weissmann veröffentlichten bereits 1989 eine Zusammenfassung mit bis dato neuen Wirkmechanismen der NSAR[16]. Es konnte z.B. eine verminderte Einwanderung von Neutrophilen durch Acetylsalicylsäure und Salicylsäure beobachtet werden. Dieser Effekt wird allerdings erst bei Gabe von hohen Dosen (im antiinflammatorischen Bereich) dieser Substanzen relevant.

Offensichtlich gehen die Wirkungen der NSAR über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese hinaus und beinhalten je nach ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur zahlreiche weitere Angriffspunkte im Entzündungsgeschehen.

Deshalb lassen sich die oben genannten Erkenntnisse nicht generell auf alle NSAR übertragen. Vielmehr erfordert jeder Arzneistoff in dieser Gruppe eine differenzierte Betrachtung seiner spezifischen Struktur und der daraus abzuleitenden biologischen Wirkung.

1.3 Wirkungsmechanismus von Metamizol (1)

Bei einer Untersuchung zum Wirkungsmechanismus von **1** stellt sich zunächst die Frage, ob es sich dabei um den eigentlichen Wirkstoff oder um ein Prodrug handelt. So ist bekannt, dass Metamizol-Na (**1**) nach oraler oder intravenöser Gabe innerhalb weniger Minuten vollständig zum 4-Methylaminoantipyrin (**2**) hydrolysiert[17]. Deshalb sind alle in-vitro-Untersuchungen mit Metamizol selbst nur unter großem Vorbehalt zu beurteilen.

1.3.1 Hemmung der Cyclooxygenase

Lanz et al. veröffentlichten 1985 Untersuchungen zur Hemmung der Prostaglandinfreisetzung aus Mausperitonealmakrophagen durch Metamizol (**1**) und seine bekannten Metaboliten[18]. Diese Zellen spielen durch die Freisetzung von Prostaglandinen eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. Nach Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Testsubstanz wurde die

---

[16] S. B. Abramson, G. Weissmann, *Arthritis Rheum.*, **1989**, *32*, 1 - 9

[17] Eine Übersicht über die bekannten Metaboliten **2** – **6** ist auf Seite 15 dargestellt.

[18] R.Lanz, B. A. Peskar, K.Brune, *100 Jahre Pyrazolone* (Hrsg. K. Brune, R. Lanz), Urban & Schwarzenberger, **1985**, 105 - 112

Prostaglandinfreisetzung stimuliert und durch eine quantitative Bestimmung von PGE_2 die Wirkung der Testsubstanz ermittelt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass **1** zwar die Prostaglandinfreisetzung hemmt (60% Hemmung durch eine 300 µM Lösung), allerdings bei kurzen Inkubationszeiten von fünf Minuten deutlich schwächer als seine Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (**2**) und 4-Aminoantipyrin (**3**). Gleichzeitig war die Freisetzung an Leukotrien LTC_4 erhöht, was auf eine Verschiebung des Arachidonstoffwechsels zugunsten des Lipoxygenaseweges hinweist.

Bei einer verlängerten Inkubationszeit von zwei Stunden erzielt **1** dieselbe Wirkung wie 4-Methylaminoantipyrin (**2**). Dieser Effekt ist durch eine rasche Hydrolyse von **1** zu **2** zu erklären.

Die Metaboliten 4-Formylaminoantipyrin (**4**) und 4-Acetylaminoantipyrin (**5**) haben keine Wirkung auf die Prostaglandinfreisetzung.

Damit wurde gezeigt, dass Metamizol (**1**) und seine Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (**2**) und 4-Aminoantipyrin (**3**) die Bildung der Prostaglandine hemmen. Allerdings liegen die ermittelten Hemmkonzentrationen z. T. über den maximalen Plasmaspiegeln, die nach einer Einzeldosis von 500 – 1000 mg (**1**) erreicht werden[19].

Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Weithmann und Alpermann bestätigt[20]. Sie beschrieben ebenfalls eine Hemmung der Prostaglandinsynthese durch die Metaboliten **2** und **3**, sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation durch **2**.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung des Metamizols (**1**) auf die mittlerweile drei bekannten Isoformen der Cyclooxygenase durchgeführt und eine Quantifizierung der Hemmwirkung vorgenommen. Die Interpretation der ermittelten Hemmkonzentrationen bezüglich der Selektivität für eine bestimmte Isoform der COX wird durch große Schwankungen innerhalb der Ergebnisse erschwert. Dies ist einerseits auf die Unterschiede in den verwendeten Testsystemen zurückzuführen, anderseits auf die „ungünstige Auswahl“ der getesteten Substanzen.

---

[19] V. Vlahov, M. Badian, M.Verho, N. Bacracheva, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 61 - 65

[20] K. U. Weithmann, H.-G. Alpermann, *Arzneim.-Forsch.*, **1985**, *35*, 947 - 952

1999 untersuchten Campos et al. die Hemmung der COX-1 und COX-2 durch **1** im Zellversuch, sowie die Positionierung des Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (**2**) im aktiven Zentrum von COX-1 und COX-2 durch computergestützte „Molecular Modelling"-Verfahren[21].

2 lässt sich als Inhibitor in beide aktiven Zentren einpassen und zeigt keine Selektivität für eine der beiden Isoformen der Cycloxygenase.

Die IC_{50}-Werte, die im Zellversuch für **1** ermittelt wurden, zeigen zwar teilweise eine Prävalenz für eine Hemmung der COX-2, allerdings können diese Werte nicht interpretiert werden, da **1** selbst nicht als Wirkform in Frage kommt.

Eine Untersuchung zur Hemmung der mittlerweile drei bekannten Isoformen der Cyclooxygenase durch eine Reihe von Analgetika veröffentlichten 2002 Chandrasekharan et al[9]. Leider beschränken sich die IC_{50}-Werte auf Angaben für Metamizol (**1**) und Dimethylaminoantipyrin (**10**). Beide Substanzen zeigen eine klare Prävalenz für die COX-3, wobei Metamizol (**1**) sogar über eine neunmal stärkere Hemmwirkung auf die COX-3 als Paracetamol verfügt, welches als Paradebeispiel eines COX-3-Hemmers propagiert wird. Dieser Wert eignet sich allerdings weniger zur Interpretation als der IC_{50}-Wert für Dimethylaminoantipyrin, welches strukturell mit den wirksamen Metaboliten des Metamizols zu vergleichen ist. Er liegt mit ca. 210 µg/ml etwa um den Faktor zehn über den maximalen Plasmaspiegeln der Metamizolmetaboliten.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass bis zum heutigen Zeitpunkt die Relevanz einer Cyclooxygenasehemmung für den Wirkungsmechanismus von Metamizol (**1**) nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

1.3.2 Zentral vermittelte Wirkungsmechanismen von Metamizol (1)

Eine grundlegende Voraussetzung für die zentrale Wirkung von Metamizol (**1**) ist die Fähigkeit der entstehenden Metaboliten die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Cohen et al. konnten 1998 zeigen, dass nach oraler Einnahme von Metamizol die vier Hauptmetaboliten **2**, **3**, **4** und **5** in die

[21] C. Campos R. De Gregorio, R. García-Nieto, F. Gago, P. Ortiz, S. Alemany, *Eur J Pharmacol.* **1999**, *378*, 339 - 347

Cerebrospinalflüssigkeit gelangen und somit die Grundlage für die Erklärung eines zentralen Wirkmechanismus liefern können[22].

Dass die analgetische Wirkung von **1** über eine periphere Nozizeption hinausgeht, konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden. So linderte eine Metamizol-Injektion in bestimmte Regionen von Mäusehirnen wirksam viszerale Schmerzen[23]. Dieser Effekt ließ sich durch Gabe von Naloxon nicht antagonisieren, was eine Wirkung über Opiodrezeptoren ausschließt. Außerdem wurde bei Kombination von **1** mit Morphin eine Zunahme der analgetischen Wirkung festgestellt.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass eine Applikation von **1** mittels i.c.v. (intracerebroventricularer Injektion) eine Dosisreduktion im Vergleich zur i.v.-Gabe um den Faktor zehn ermöglicht, ohne einen Verlust der analgetischen Wirkung zu erleiden[24]. Diese Erkenntnis wird durch Collares und Vinagre bestätigt, die eine verlangsamte Magenentleerung nach i.c.v. als Bestimmungsgröße für die zentrale Wirkung von **1** verwendeten[25]. Ihrer Meinung nach ist die zentrale Wirkung im paraventriculairen Nucleus, einer Region im Hypothalamus lokalisiert und verläuft unter Beteiligung des Nervus vagus.

1.3.3 Mechanismen der spasmolytischen Wirkung von (1)

Die spasmolytische Wirkung von **1** ist wiederholt in-vivo bestätigt und dokumentiert worden. So senkt es eindeutig die Motilität der ableitenden Harnwege und wird aufgrund dessen häufig bei Nierenkoliken eingesetzt[26].

---

[22] O. Cohen, E. Zylber-Katz, Y. Caraco, L. Granit, M. Levy, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1998**, *54*, 549 - 553

[23] J. Taylor, B. Mellström, I. Fernaud, J. R. Naranjo, *Eur J Pharmacol.* **1998**, *351*, 39 - 47

[24] A. Beirith, A. R. S. Santos, A. L. S. Rodrigues, T. B. Creczynski-Pasa, J. B. Calixto, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *345*, 233 - 245

[25] E. F. Collares, A. M. Vinagre, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, *36*, 1375 - 1382

[26] H. J. Schroth, A. Steinsträßer, R. Berberich, G. Kloss, *100 Jahre Pyrazolone* (Hrsg. K. Brune, R. Lanz), Urban & Schwarzenberger, **1985**, 145 - 154

Seit Einführung von Metamizol (**1**) wurde der spasmolytische Wirkungsmechanismus in zahlreichen experimentellen Studien untersucht. Bis heute herrscht Uneinigkeit darüber, ob die spasmolytische Wirkung ausschließlich peripher oder gegebenenfalls auch zentral verursacht wird.

So wies die Firma Hoechst 1956 eine periphere spasmolytische Wirkung am isolierten Meerschweinchen-Uterus nach, wobei sich hier jedoch wiederum die Frage nach der tatsächlichen Wirkform von **1** stellt. So wurde nicht untersucht, ob die Wirkung von Metamizol (**1**) selbst oder durch das nach der Hydrolyse freigesetzte Sulfit oder durch Spaltprodukte wie **2** vermittelt wird.

Um diese Fragestellung zu umgehen, orientiert man sich zur Beurteilung der spasmolytischen Wirkkomponente besser an in-vivo Experimenten, welche die komplexe Metabolisierung von **1** berücksichtigen. So kamen Alexander et al. 1963 zu der Erkenntnis, das nach i.v.-Applikation von **1** die Wirkung von Cholin und Acetylcholin am Uterus und am Darm von Kaninchen abgeschwächt wird, Metamizol (**1**) also über eine Wirkung an muskarinergen Rezeptoren eine periphere spasmolytische Wirkung aufweist[27].

Ebenfalls beschrieben wurde die Aufhebung des bronchokonstriktorischen Effekts von Histamin und Serotonin durch **1** bei asthmatischen Meerschweinchen[28]. Hier zeigte **1** eindeutig eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Bronchien.

Neuere Daten beschreiben ausführlich die Wirkung von Metamizol (**1**) auf die Muskulatur des Magen-Darm-Trakts und die sich daraus ergebenden Anwendungsgebiete. So wird neben einer Relaxation der glatten Muskulatur die Peristaltik des Darms nicht beeinflusst, bzw. sogar erhöht. Zum Beispiel antagonisiert Metamizol (**1**) die opstipierende Wirkung von Tramadol und könnte somit als sinnvolle Ergänzung einer Schmerztherapie mit Opiaten verwendet werden[29]. Als Mechanismus dieser Wirkung wird hier von einer

---

[27] K. Alexander, A. Khreis, G. Traut, *Arzneim.-Forsch.*, **1963**, *13*, 493 - 497

[28] L. Zicha, F. Scheiffarth, E. Schmid, U. Alms, G. Schott, *Arzneim.-Forsch.*, **1961**, *11*, 598 - 602

[29] E. Planas, R. Poveda, S. Sanchez, A. Romero, M. M. Puig, *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*, 223 - 226

vermehrten Freisetzung von Serotonin (peripher oder zentral) ausgegangen, das die Wirkung von Tramadol auf die Noradrenalinfreisetzung aufhebt.

Reis et al. untersuchten die Wirkung von **1** auf epileptische Ratten[30]. Der krampflösende Effekt von **1** wurde durch vorhergehende Applikation von Naloxon verhindert, was erneut eine Wirkung über Opiodrezeptoren vermuten lässt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die spasmolytische Wirkung nicht über eine Freisetzung von $NO^{\bullet}$ vermittelt wird, da die Gabe eines NO-Synthase-Hemmstoffes (L-NOARG), die antikonvulsive Wirkung von **1** nicht herabsetzt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Metamizol (**1**) und seine bisher bekannten Metaboliten viele verschiedene pharmakologische Wirkungen aufweisen, die allerdings nicht ausreichen, um die gute analgetische und spasmolytische Wirkung dieses Arzneimittels erklären zu können.

1.3.4 Beeinflussung oxidativer Vorgänge im Schmerz- und Entzündungsgeschehen

Wie bereits unter 1.2.1 für Paracetamol beschrieben, könnte der Wirkungsmechanismus von Metamizol (**1**) ebenfalls über eine Beeinflussung oxidativer Reaktionen im Entzündungsgeschehen zu erklären sein. Diese Annahme wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass die analgetische Wirkung von **1** von der Anwesenheit von $NO^{\bullet}$ abhängig ist.

Duarte et al. zeigten 1992, dass die analgetische Wirkung von **1** nach Verabreichung eines Hemmstoffs der $NO^{\bullet}$-Synthase aufgehoben ist[31]. Mittlerweile ist bekannt, dass $NO^{\bullet}$ an nozizeptiven Vorgängen sowohl im peripheren Gewebe, als auch im Zentralnervensystem beteiligt ist. In welcher Weise es dort seine Wirkung entfaltet, ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings ist vielfach belegt, dass $NO^{\bullet}$ vor allem mit reaktiven Sauerstoffspezies reagieren kann, die im Schmerz- und Entzündungsgeschehen vermehrt

---

[30] G. M. L. Reis, M. C. Doretto, I. D. G. Duarte, M. A. K. F. Tatsuo, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, *36*, 1263 - 1268

[31] I. D. G. Duarte, I. R. Dos Santos, B. B. Lorenzetti, S. H. Ferreira, *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, *217*, 225 - 227

freigesetzt werden[32]. Die daraus resultierenden hochreaktiven Verbindungen, wie zum Beispiel das Peroxinitritradikal wirken zytotoxisch und könnten selbst an nozizeptiven Vorgängen beteiligt sein.

Sollte Metamizol nun ebenfalls in der Lage sein, oxidative Reaktionen im Schmerz- und Entzündungsgeschehen zu beeinflussen und beispielsweise die Bildung solcher toxischer Produkte durch Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies zu verhindern, so wäre dies ein neuer Ansatz zur Erklärung der analgetischen Wirkung.

1.4 Biotransformation von Metamizol (1)

1.4.1 Literaturbefunde

Bis heute lässt sich die Metabolisierung von **1** im menschlichen Stoffwechsel nicht quantitativ nachvollziehen. Obwohl bekannt ist, dass die Strahlungsdosis des ^{14}C-markierten Wirkstoffes innerhalb von 72 h fast quantitativ im Urin wieder gefunden wird (> 90 %)[33], variiert der Anteil der identifizierten Metaboliten an der verabreichten Dosis beträchtlich. Während Volz und Kellner 1980 nach ^{14}C-Markierung 65 – 70 % einer Einmalgabe von 480 mg Metamizol (**1**) in Form der Metaboliten **2**, **3**, **4** und **5** im Urin wieder finden konnten[34], belief sich die Gesamtbilanz von Vlahov et al. 1990 nur auf 44 % bekannter Metaboliten im Urin[35].

Levy et al veröffentlichten 1995 eine Zusammenfassung von zwölf Studien zum Metabolismus von **1**[36], die einen Überblick über die bisherigen Erkenntnisse zur Biotransformation von **1** ermöglicht.

Nach oraler Einnahme wird **1** im Magen-Darm-Trakt direkt zum 4-Methylaminoantipyrin (**2**) hydrolysiert, welches nahezu quantitativ absorbiert

---

[32] H.-J. Duchstein, S. Riederer, C. Erbach, *Pharm. Unserer Zeit*, **1999**, *28*, 197 - 207

[33] O. Christ, H.-M. Kellner, G. Ross, W. Rupp, A. Schwarz, *Arzneim.-Forsch.*, **1973**, *23*, 1760 - 1767

[34] M. Volz, H.-M. Kellner, *Br. J. Clin. Pharmac.*, **1980**, *10*, 299 - 308

[35] V. Vlahov, M. Badian, M. Verho, N. Bacracheva, Br. *J. Clin. Pharmac.*, **1990**, *38*, 61 - 65

[36] M. Levy, E. Zylber-Katz, B. Rosenkranz, *Clin. Pharmacokinet.*, **1995**, *28*, 216 - 234

wird. Anschließend wird **2** zu 4-Formylaminoantipyrin (**4**) oxidiert, sowie zu 4-Aminoantipyrin (**3**) demethyliert, welches durch eine polymorphe N-Acetyl-Transferase in der Leber zum 4-Acetylaminoantipyrin (**5**) acetyliert wird.

Als ein weiterer Metabolit entsteht 4-Hydroxyantipyrin (**6**), welches als Glucuronid konjugiert ausgeschieden wird. Es konnte bisher allerdings nur in geringen Mengen im Urin identifiziert werden.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die beschriebenen Metaboliten von **1**, sowie deren prozentuale Anteile an einer Gesamtdosis des Arzneistoffs.

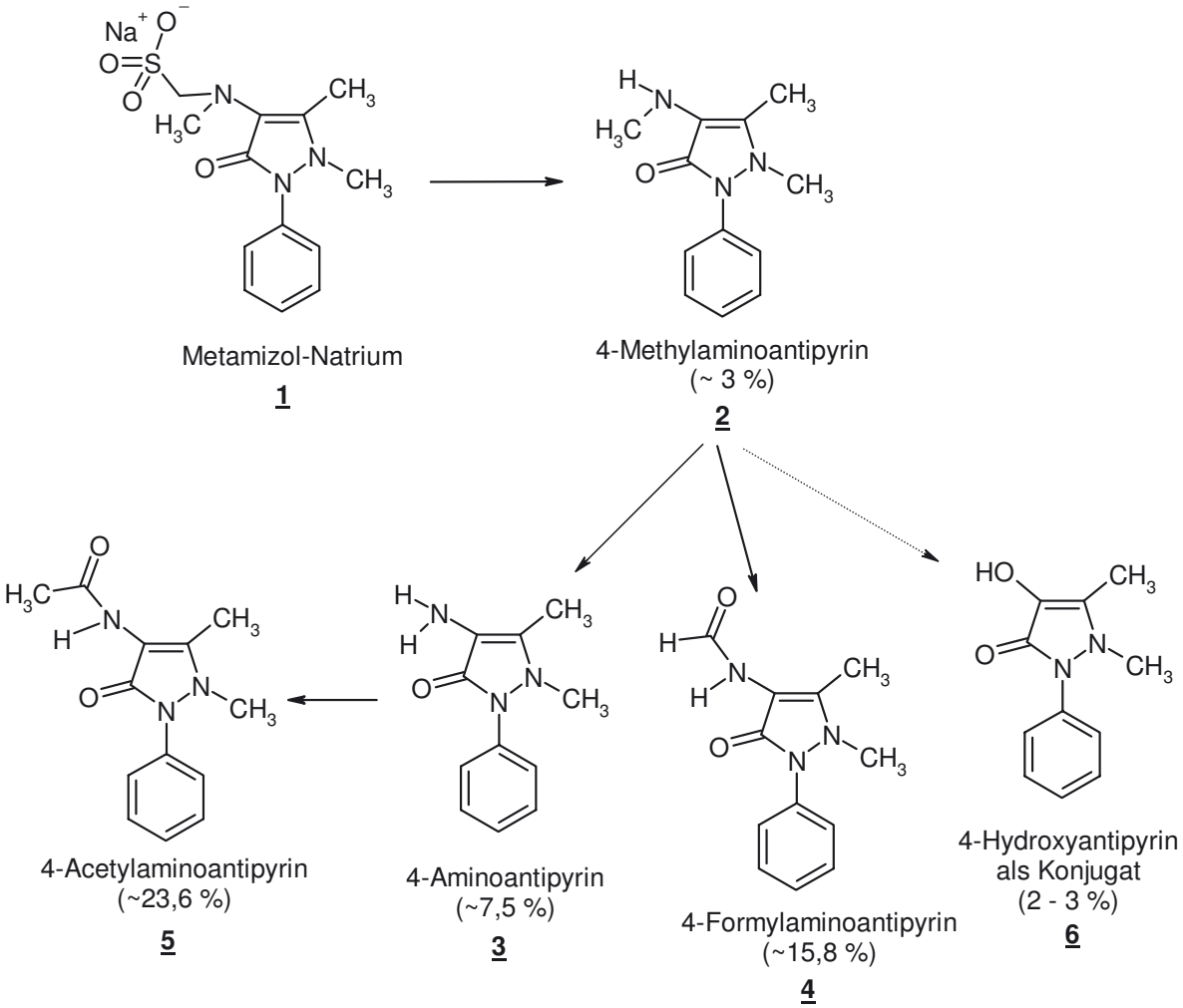


Abbildung 3: Biotransformation von Metamizol (**1**)

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus den oben genannten Studien. Es besteht also eine Diskrepanz zwischen der verabreichten Menge an Metamizol (**1**) und der Gesamtmenge an identifizierbaren Metaboliten im Urin. Obwohl nahezu die gesamte Menge des ^{14}C-markierten Metamizols im Urin nach drei

Tagen als Strahlung wieder erscheint[33], können nur ca. 50 % der verabreichten Menge als definierte Metaboliten wieder gefunden werden. Eigene Versuche mit verschiedenen Probanden haben ergeben, dass die Gesamtmenge der „extrahierbaren Metaboliten“ **2** - **6** nur maximal 15 % der oral verabreichten Dosis ausmachen. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass es neben den bekannten Biotransformationswegen von **1** zusätzliche Abbauwege im Humanstoffwechsel geben dürfte.

1.4.2 Potentielle oxidative Ringöffnung bei der Biotransformation von Metamizol (1)

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich der Pyrazolinonring von **1** unter nahezu physiolologischen Bedingungen oxidativ öffnen lässt.

So wurden außer Metamizol (**1**) weitere Pyrazolinone auf ihre Beständigkeit gegenüber oxidativen Testsystemen, wie Metaperiodat, Singulettsauerstoff und Wasserstoffperoxid getestet[37,38,39]. Unter der Voraussetzung einer raschen Hydrolyse von **1** zu **2** wurden die Untersuchungen direkt am Hydrolyseprodukt 4-Methylaminoantipyrin (**2**) durchgeführt. Um möglichst zellähnliche Bedingungen zu simulieren, wurde **2** mit extrem verdünntem H_2O_2 umgesetzt[40]. Nach einer Reaktionszeit von 18h bei Raumtemperatur konnten bei neutralem pH ca. 20 % des Oxalsäurehydrazids **7** isoliert werden. Dieses „primäre“ Ringöffnungsprodukt **7** zerfällt in wässriger Lösung bei pH 7,4 bereits bei Raumtemperatur in kurzer Zeit in das Hydrazid **8** und in die Methyloxamidsäure (**9**)[39].

---

[37] H. Weber, E. Wollenberg, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **1988**, *321*, 551-553

[38] H.-J. Duchstein, G. Ruch-Zaske, G. Holzmann, E. Wollenberg, H. Weber, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **1988**, *321*, 25 - 27

[39] H. Weber, R. Breßer, *Pharmazie*, **1996**, *51*, 152 - 155

[40] K. Traber, Dissertation, Düsseldorf **2000**, 16 - 17

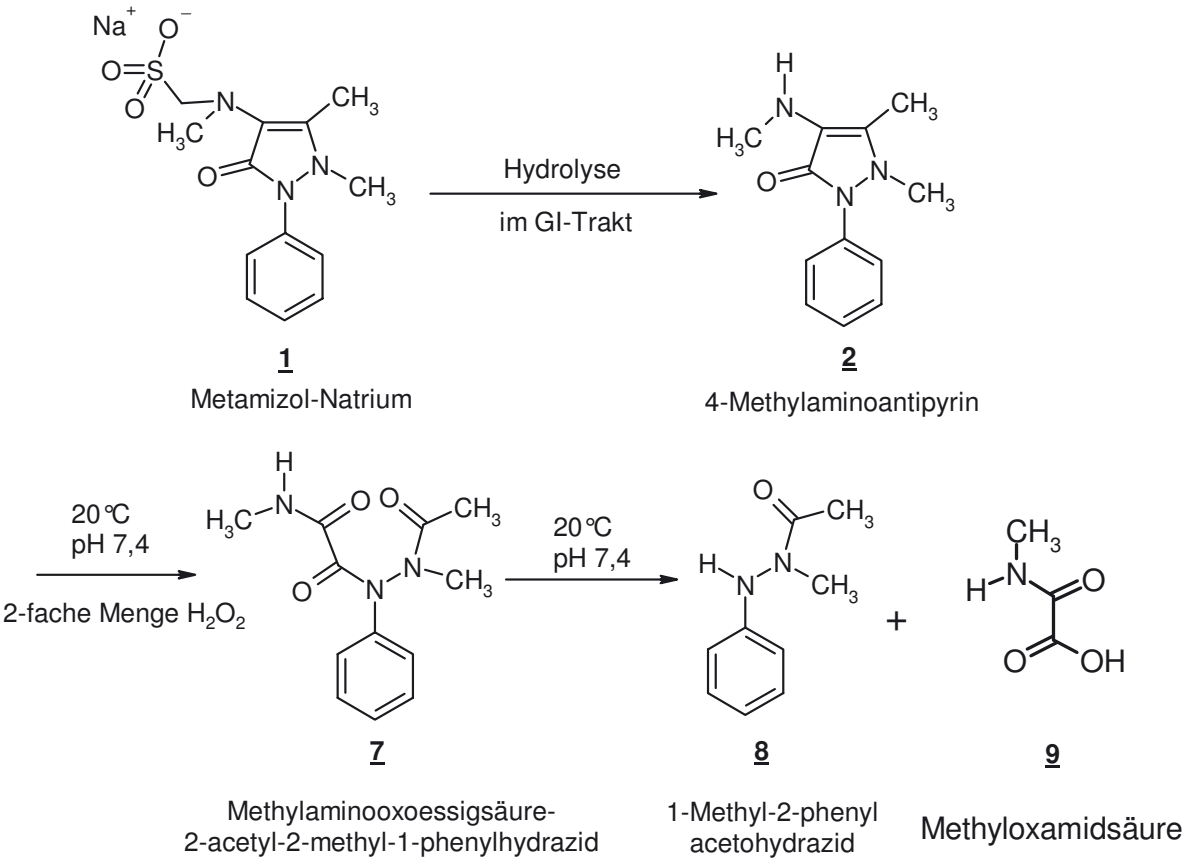


Abbildung 4: Potentieller Biotransformationsweg von **1** über eine oxidative Ringöffnung des Pyrazolinonringes

Das entstandene Acetohydrazid **8** wurde in der Dissertation von R. Breßer ausführlich untersucht[41,42]. Dort wurde gezeigt, dass die Struktur äußerst instabil gegenüber aktiven Sauerstoffspezies ist und sich deshalb nicht als Beleg für die Ringöffnung bei der Biotransformation von **1** eignet. Auch die aus **8** entstehenden Oxidationsprodukte erwiesen sich als äußerst instabil[40].

Bisher gibt es lediglich eine einzige Literaturstelle, die **8** als Metaboliten von **1** beschreibt[43]. Bei diesem Zitat handelt es sich um einen Abstract der europäischen Tagung der ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) aus dem Jahre 1993. Dort wurde ohne weitere Details festgestellt, dass nach ^{13}C- und ^{14}C-Markierung von **1** und anschließender oraler

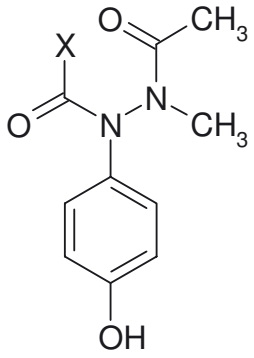
---

[41] R. Breßer, H. Weber, *Pharmazie*, **1996**, *51*, 470 - 476

[42] R. Breßer, Dissertation, Düsseldorf, **1996**

[43] M. Volz, H.-W. Fehlhaber, F. Siebenlist, Tagungsabstract European ISSX meeting, International Society for the Study of Xenobiotics, 26. – 29.09.1993, Tours

Applikation des Arzneistoffes das Acetohydrazid **8** im Urin von Menschen identifiziert werden konnte. Außerdem wurde aus dem Urin von der Ratte nach Applikation von **1** eine weitere Verbindung mit offenem Pyrazolinonring isoliert, deren Struktur allerdings nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (siehe Abbildung 5).



X = unbekannter Substituent

Abbildung 5: Ringoffener Metabolit (Ratte) mit unbekannter Struktur

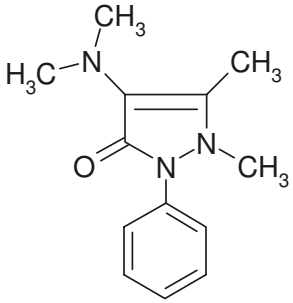
Diese qualitativen Ergebnisse wurden allerdings nur auf der genannten Tagung als Abstract präsentiert und später nie mit weiteren Details belegt oder ausführlich publiziert.

Im Rahmen einer weiteren Publikation zu diesem Thema wurden 2002 einige Pyrazolinonanalgetika, sowie die Abbauprodukte **11** und **8**, aus dem durch Oxidation aufbereitetem Grundwasser im Großraum Berlin nachgewiesen[44]. Neben Phenazon und Propyphenazon wurden Rückstände von 4-Dimethylaminoantipyrin (**10**) (Pyramidon®) gefunden, welches bereits 1978 aufgrund der Bildung von karzinogenen Nitrosaminen vom Markt genommen wurde, bis dahin jedoch von einem Betrieb im Berliner Norden produziert worden war.

Die Autoren gehen davon aus, dass die bis heute existierenden Rückstände des aus dieser Quelle stammenden 4-Dimethylaminoantipyrins (**10**) für die Verunreinigung des Grundwassers verantwortlich sind. Neben **10** wurde dessen Abbauprodukt **11** identifiziert, welches analog zum Oxidationsprodukt **7** des 4-Methylaminoantipyrins (**2**) eine Oxalsäurehydrazidstruktur aufweist.

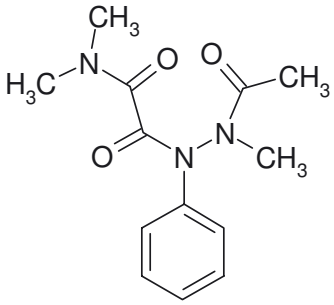
---

[44] K. Reddersen, T. Heberer, U.Dünnbier, *Chemosphere*, **2002,** *49*, 539 - 544



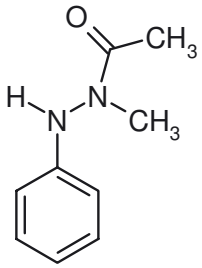
10

4-Dimethylaminoantipyrin



11

Dimethylaminooxoessigsäure-2-acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazid



8

1-Methyl-2-phenyl acetohydrazid

Abbildung 6: Rückstände von Dimethylaminoantipyrin **10** und dessen Abbauprodukten im Berliner Grundwasser

Das Acetohydrazid **8** konnte allerdings nur in Spuren nachgewiesen werden und könnte auch als Artefakt bei der Aufarbeitung des Probenmaterials entstanden sein.

Zusammenfassend kann nur der Schluss gezogen werden, dass aufgrund der Instabilität von **7** und **8** der Reaktionsweg einer oxidativen Ringöffnung von **2** *in-vivo* eher über das Hydrolyseprodukt Methyloxamidsäure (**9**) bestätigt werden sollte.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In Hinblick auf die immer noch andauernde, kontrovers geführte Debatte um die Anwendung von Metamizol (**1**) schien es mehr denn je notwendig, eine sinnvolle Erklärung für den Wirkungsmechanismus einerseits und für die unerwünschten Nebenwirkungen andererseits zu suchen. So wäre es möglich, dass bis dato nicht als Metaboliten identifizierte Abbauprodukte von **1** sowohl für die Wirkungen, als auch für die unerwünschten Nebenwirkungen (z. B Agranulozytose) verantwortlich sind.

Aus diesem Grund schien es sinnvoll, die bisherigen Erkenntnisse zum Abbau von **1** in Form von *in-vivo*-Untersuchungen fortzuführen und so einen alternativen, von der Labilität der Phenylhydrazinderivate unabhängigen Beweis für die oxidative Ringöffnung des Arzneistoffs bei der Biotransformation zu liefern.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es bei der Metabolisierung von **1** tatsächlich zu einer oxidativen Öffnung des Pyrazolinonringes kommt. Dabei standen jedoch nicht in erster Linie die metabolisch instabilen Verbindungen **7** und **8**[42], sondern die Methyloxamidsäure (**9**) im Mittelpunkt des Interesses, deren analytische und metabolische Eigenschaften weitgehend unbekannt waren.

Als Untersuchungsmaterial wurden der Urin von Mensch und Ratte, sowie die Allantoisflüssigkeit bebrüteter Hühnereier gewählt.

Somit ergaben sich folgende Zielsetzungen für die vorliegende Arbeit:

- Entwicklung einer qualitativen und quantitativen Analytik für die Methyloxamidsäure (**9**) aus unterschiedlichem insbesondere biologischem Probenmaterial.

- Untersuchung zur metabolischen Stabilität der Methyloxamidsäure (**9**) als potentiellem Metaboliten von Metamizol (**1**).

- *In-vivo*-Untersuchungen zur Biotransformation von Metamizol (**1**) anhand unterschiedlicher Biotransformationsmodelle unter Anwendung der zuvor etablierten Analytik der Methyloxamidsäure (**9**).

2 ANALYTIK DER METHYLOXAMIDSÄURE (9)

2.1 Synthese der Methyloxamidsäure (9)

Für die Entwicklung der qualitativen und quantitativen Analytik einer Substanz ist es notwendig, diese in einem ausreichenden Maße zur Verfügung zu haben. Da die Methyloxamidsäure (9) trotz ihrer einfachen Struktur nicht kommerziell erhältlich ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Synthesewege entwickelt.

2.1.1 Synthese aus Metamizol (1)

Die Herstellung der Methyloxamidsäure erfolgte durch oxidative Ringöffnung von 2 mit nachfolgender Hydrolyse des Oxamazids 7. Als Nebenprodukt entsteht das Hydrazid 8 (Abbildung 7).

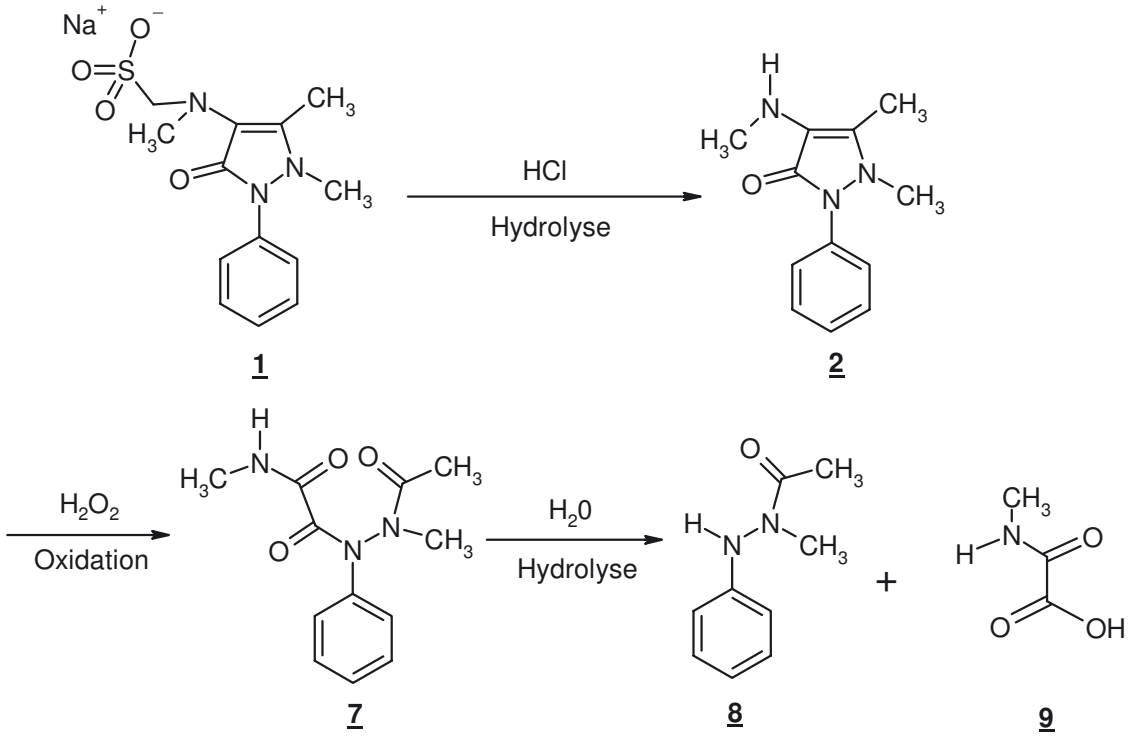


Abbildung 7: Synthese von Methyloxamidsäure (9) aus Metamizol

Das 4-Methylaminoantipyrin (2) erhält man durch Verkochen von 1 im salzsauren Milieu, um die Hydrolyseprodukte Sulfit und Formaldehyd zu entfernen. Bedingt durch die hervorragende Wasserlöslichkeit der Methyloxamidsäure konnte die Isolierung nicht durch eine Flüssig-flüssig-Extraktion erfolgen, sondern wurde aus dem getrockneten Rückstand der salzsauren wässrigen Phase mit Diethylether vorgenommen. Die Ausbeute dieser Synthese lag bei ca. 40 %.

2.1.2 Synthese aus Oxalsäurediethylester

Diese alternative Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Synthesevorschrift von O. Wallach, in der die Umsetzung von Oxalsäurediethylester mit Methylamin beschrieben wird[45]. Man erhält Methyloxamidsäureethylester (**12**), welcher durch eine anschließende Hydrolyse im alkalischen Milieu zur gewünschten Methyloxamidsäure (**9**) verseift wurde.

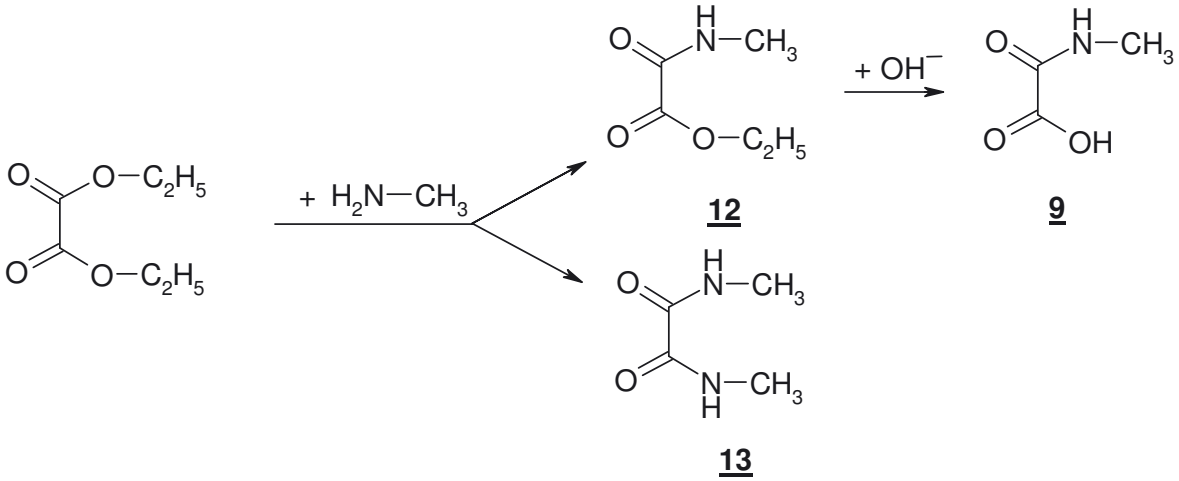


Abbildung 8: Synthese der Methyloxamidsäure (**9**) aus Oxalsäurediethylester

Problematisch war hier die Ermittlung des optimalen Mengenverhältnisses der eingesetzten Edukte, um einerseits die Aminolyse der zweiten Carbonsäurefunktion des Oxalsäurediethylesters so niedrig wie möglich zu gestalten und andererseits den eingesetzten Oxalsäurediethylester komplett zu **9** umzusetzen. Es stellte sich heraus, dass ein äquimolares Verhältnis der beiden Edukte zur bestmöglichen Ausbeute an **12** führt. Trotzdem erhält man nach Erhitzen des Reaktionsansatzes im alkalischen Milieu ein Gemisch aus **9** und **13**. Durch mehrmalige Extraktion der wässrigen Phase mit Chloroform ließ sich dieses Nebenprodukt quantitativ entfernen. Die salzsaure wässrige Phase wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft und der trockene Rückstand mit Ether extrahiert. Die Ausbeute dieser Synthese lag ebenfalls bei 40 % und entspricht damit den Angaben in der Literatur[45].

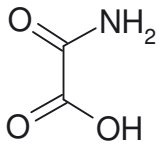
Trotz gleicher Ausbeute ist dieser Syntheseweg eindeutig vorzuziehen, da der Arbeitsaufwand wesentlich geringer ist.

---

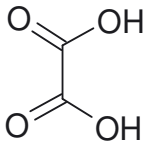
[45] O. Wallach, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1877**, *184*, 67ff

2.2 Derivatisierung der Methyloxamidsäure (9)

Da **9** keine UV-Absorption aufweist und zudem keine Farbreaktion zur Detektion bekannt ist, sollte zunächst eine einfache Möglichkeit gefunden werden, **9** mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zu identifizieren. Zu diesem Zweck war es notwendig, ein Derivat zu entwickeln, welches eine Fluoreszenzlöschung bei 254 nm aufweist. Die Carbonsäurefunktion von **9** sollte mit Hilfe bekannter Derivatisierungsmethoden mit einem entsprechenden Strukturelement verknüpft werden. Diese Derivatisierung sollte auch aus biologischem Probenmaterial (z. B. Harn oder Allantoisflüssigkeit aus bebrüteten Hühnereiern) vorgenommen werden können, einfach durchzuführen sein und möglichst quantitativ erfolgen. Da **9** zunächst nicht zur Verfügung stand, wurde auch mit der käuflichen Oxamidsäure (**14**) gearbeitet, da sie praktisch die gleichen Eigenschaften wie **9** aufweist.



14



15

Abbildung 9: Oxamidsäure (**14**) und Oxalsäure (**15**)

Außerdem wurde die Oxalsäure (**15**) in diese Untersuchungen einbezogen, da ihre Entstehung durch Hydrolyse bei der Biotransformation der Methyloxamidsäure (**9**) durchaus denkbar wäre.

Da die Esterbildung eine häufig beschriebene Möglichkeit zur Derivatisierung von Carbonsäuren ist, werden nachfolgend einige der bekanntesten Methoden sowie deren Nutzen für die Analytik von **9**, **14** und **15** beschrieben.

2.2.1 Darstellung von Phenacylestern durch Umsetzung mit Phenacylbromiden

Phenacylbromide können ohne vorherige Aktivierung der Carbonsäuren direkt zu den entsprechenden Phenacylestern umgesetzt werden, wobei das Carbonsäureanion nukleophil am Acylhalogenid angreift.

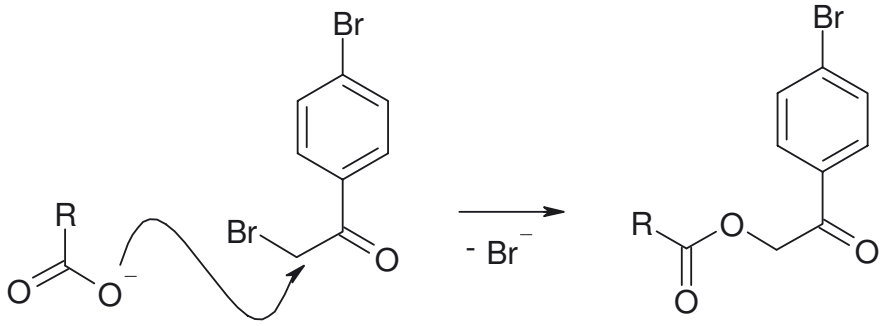


Abbildung 10: Allgemeine Darstellung der Derivatisierung von Carbonsäuren mit p-Bromphenacylbromid

In der Literatur findet man überraschenderweise nur Hinweise zur Herstellung des Diphenacylesters von Oxalsäure (**15**), wobei Methylcellosolve® (Ethylenglykolmonomethylether) als Lösungsmittel verwendet wurde[46]. Die Literaturangaben (Ausbeute 40 % und spektrale Daten) konnten durch eigene Untersuchungen bestätigt werden.

Bei Dicarbonsäuren soll durch Zusatz des Kronenethers Dicyclohexyl-18-krone-6 eine quantitative Umsetzung der jeweiligen Carbonsäure zum Diphenacylester möglich sein[47]. Dies konnte jedoch für **15** nicht bestätigt werden.

Alle Versuche zur Darstellung der Phenacylester von **9** und **14** führten dagegen nicht zum Erfolg. Trotz unterschiedlicher Reaktionsbedingungen konnte lediglich der Alkohol **16** als einzige definierte Verbindung aus den Ansätzen isoliert werden (Abbildung 11).

---

[46] J. Berger, *Acta Chem. Scand.*, **1956**, *10*, 638 - 640

[47] E. Grushka, H.D. Durst, E.J. Kikta Jr., *J. Chromatogr.*, **1975**, *112*, 673 - 678

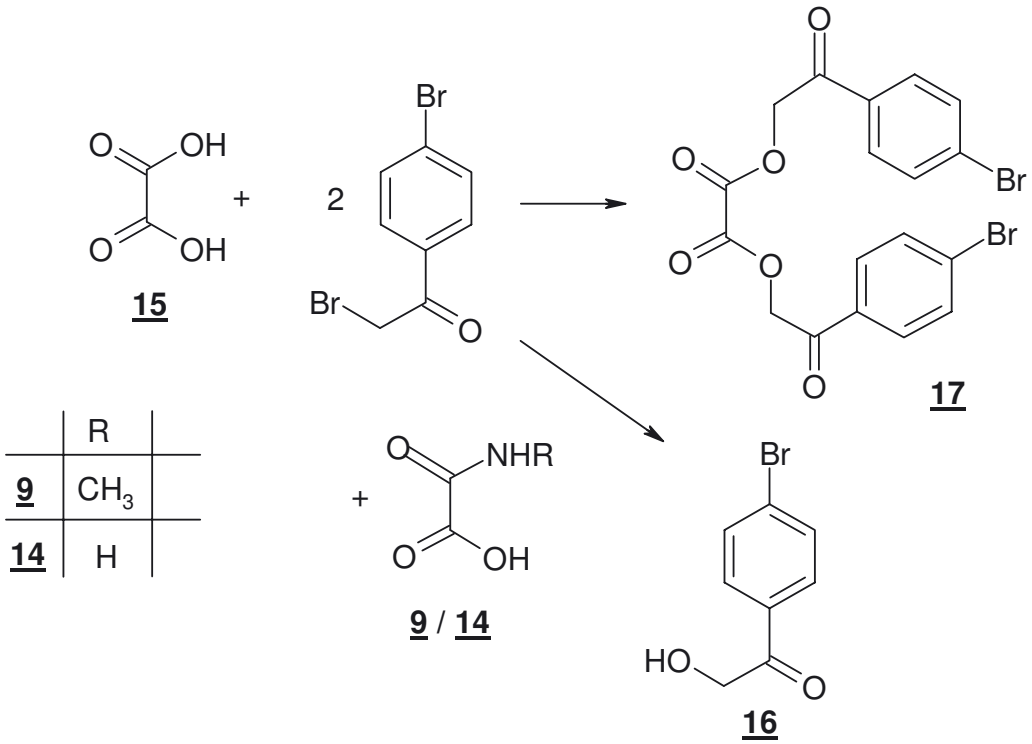


Abbildung 11: Umsetzung von **9**, **14** und **15** mit p-Bromphenacylbromid

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass sich diese Derivatisierungsmethode offensichtlich nicht zur Charakterisierung der Oxamidsäuren **9** und **14** bzw. zur quantitativen Umsetzung von **15** eignet.

2.2.2 Darstellung von Carbonsäurebenzylestern unter Verwendung von DCC (Dicyclohexylcarbodiimid)

Eine gängige Methode zur Synthese von Carbonsäureestern besteht in der Verknüpfung von Carbonsäure und Alkohol in Gegenwart äquimolarer Mengen DCC. Als reaktives Zwischenprodukt tritt ein Imidoester auf, der mit dem Alkohol unter Bildung von N,N'-Dicyclohexylharnstoff (DCU) reagiert (Abbildung 12). In der Modifizierung nach Neises und Steglich wird zusätzlich 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator verwendet um dadurch eine Steigerung der Ausbeuten zu erreichen, sowie die Bildung von Nebenprodukten zu vermindern[48].

[48] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.*, **1978**, *90*, 556-557

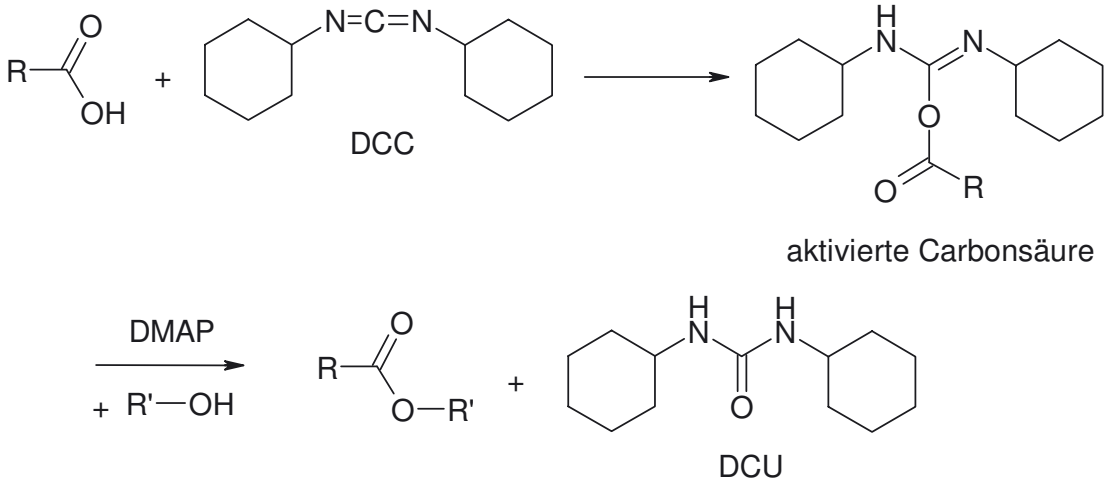


Abbildung 12: Veresterung von Carbonsäuren unter Verwendung von DCC

Nach dieser Methode sollten die Benzylester von **9**, **14** und **15** hergestellt werden, die in nahezu quantitativer Ausbeute erwartet wurden. Man erhielt jedoch nicht die gewünschten Ester **18** und **20**, sondern in beiden Fällen nur das Imidazolidintrion **19** in mäßigen Ausbeuten als einziges Reaktionsprodukt (Abbildung 13).

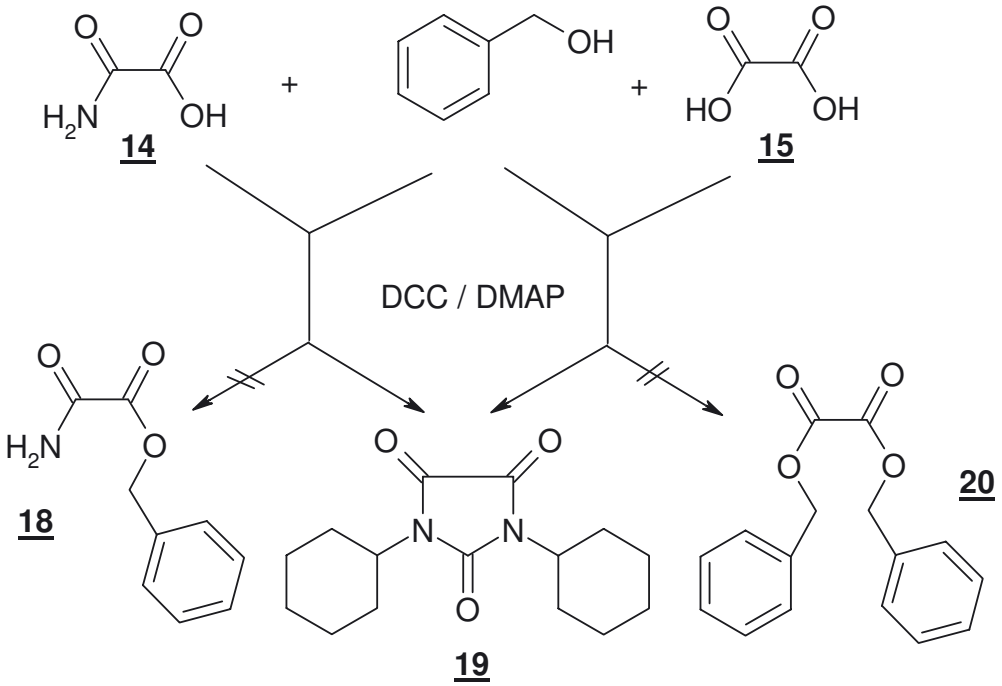


Abbildung 13: Umsetzung von Oxamidsäure (**14**) und Oxalsäure (**15**) mit Benzylalkohol und DCC

Aus der Umsetzung von **9** konnten zwar minimale Mengen des Benzylesters **21** isoliert werden, doch war auch hier **19** das Hauptprodukt (Abbildung 14).

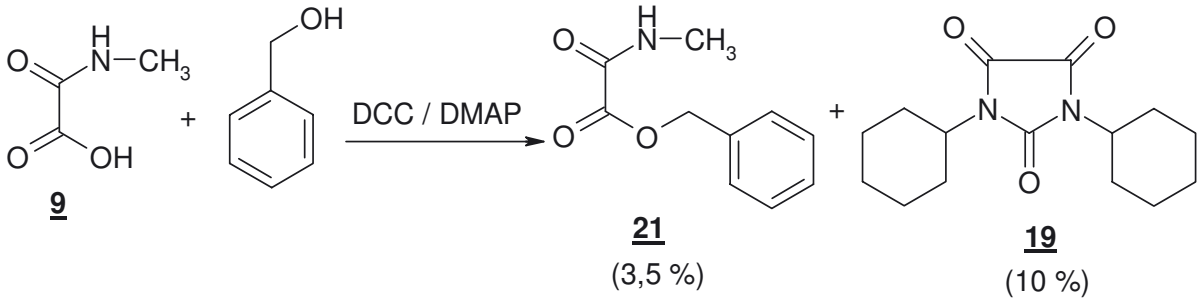


Abbildung 14: Veresterung von Methyloxamidsäure (**9**) mit Hilfe von DCC

Die Struktur des Heterocyclus **19** ergab sich zweifelsfrei aus der Elementaranalyse und den spektralen Daten.

2.2.2.1 Spektrale Daten von 19

Das IR-Spektrum von **19** in KBr (Abbildung 15) zeigt für die CH-Schwingungen der Cyclohexanringe zwei scharfe Absorbtionsbanden bei 2937 und 2856 cm^{-1}. Das Fehlen einer NH-Schwingung im Bereich über 3000 cm^{-1} spricht eindeutig gegen die Bildung des Carbonsäureesters **18**. Dominierend ist die breite Carbonylbande mit einem Maximum bei 1736 cm^{-1}.

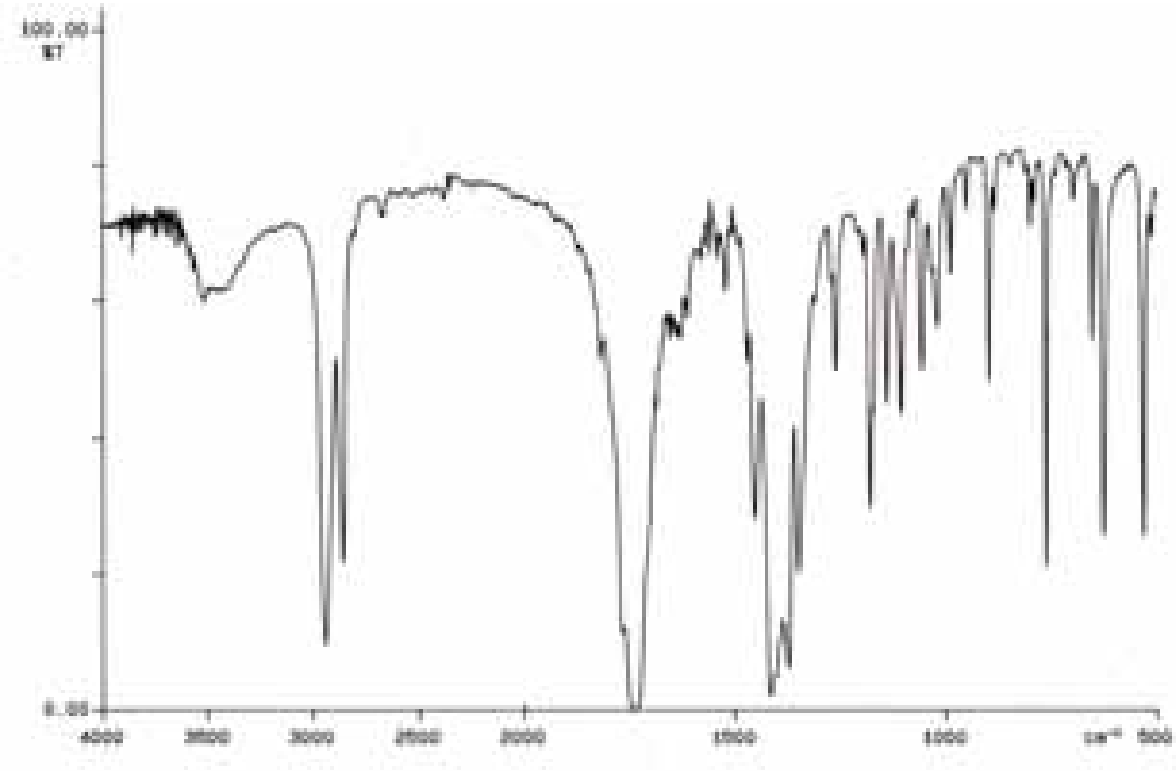


Abbildung 15: IR-Spektrum von **19** in KBr

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (in $CDCl_3$, Abbildung 16) fehlen mit D_2O-austauschbare Signale. Das charakteristische Aufspaltungsmuster des Signals bei δ = 4.0 ppm

(Triplett vom Triplett) rührt von der vicinalen Kopplung der beiden axial ständigen Protonen an C-1 der Cyclohexanringe mit den jeweils beiden axialen bzw. äquatorialen Protonen an C-2 und C-6. Die Kopplungskonstanten betragen $^{3}J1_{a,2a}$ = 12.2 Hz bzw. $^{3}J_{1a,2e}$ = 3.9 Hz. Das Multiplett für die restlichen 20 Protonen der Cyclohexanonringe gliedert sich in drei voneinander abgesetzte Bereiche mit jeweils 4, 10, und 6 Protonen, wobei sowohl der entschirmenden Effekt des Imidazolidintrionringes als auch die axiale bzw. äquatoriale Lage der Protonen für diese Differenzierung verantwortlich sind.

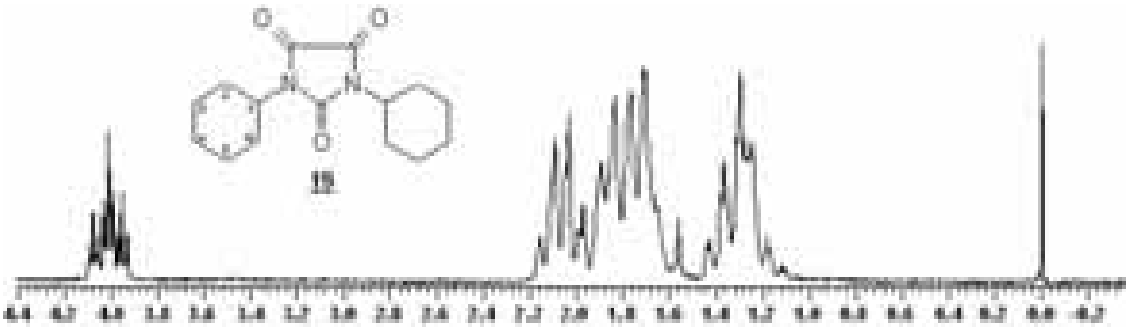


Abbildung 16: ^{1}H-NMR-Spektrum von **19** in $CDCl_3$

Das Massenspektrum von **19** (Abbildung 17) enthält neben dem Molpeak bei m/z = 278 weitere charakteristische Bruchstücke.

Die Bildung der intensiven Fragmente m/z = 197 M/z und m/z = 115 dürfte durch eine Abspaltung der Cyclohexanringe in Form von Cyclohexen zu erklären sein.

Diese Umlagerung erfolgt über einen 6-gliedrigen Übergangszustand, analog einer Mc-Lafferty-Umlagerung (Abbildung 18).

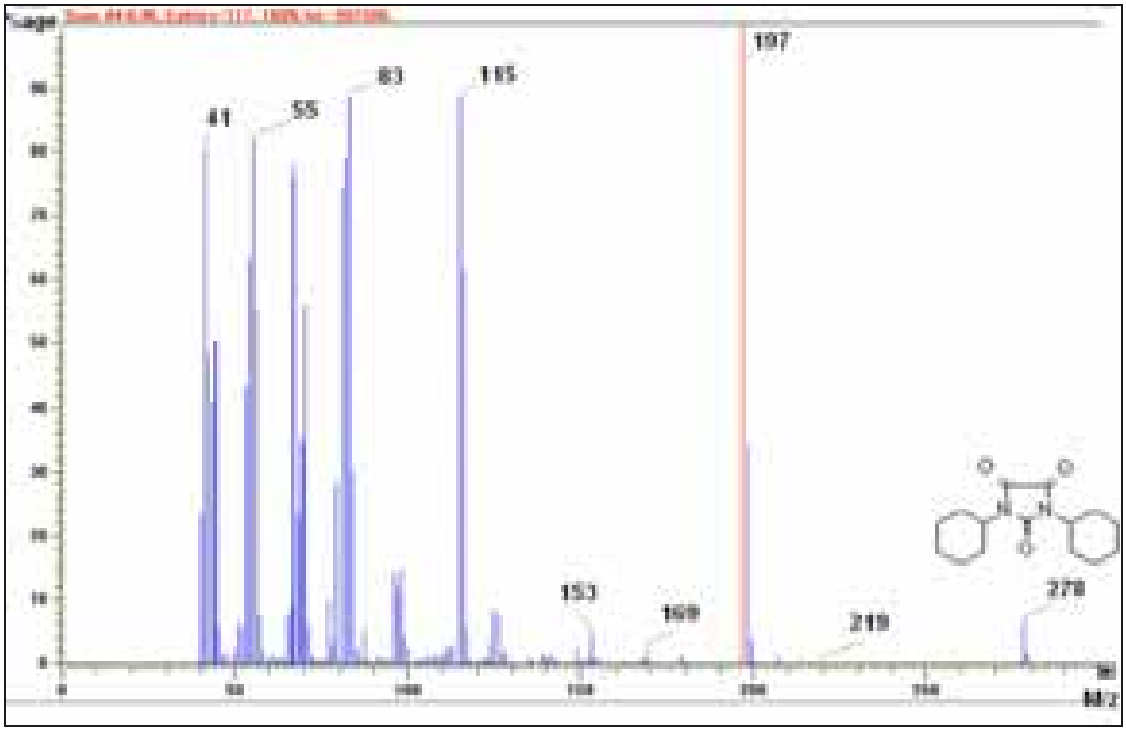


Abbildung 17: Massenspektrum von **19**

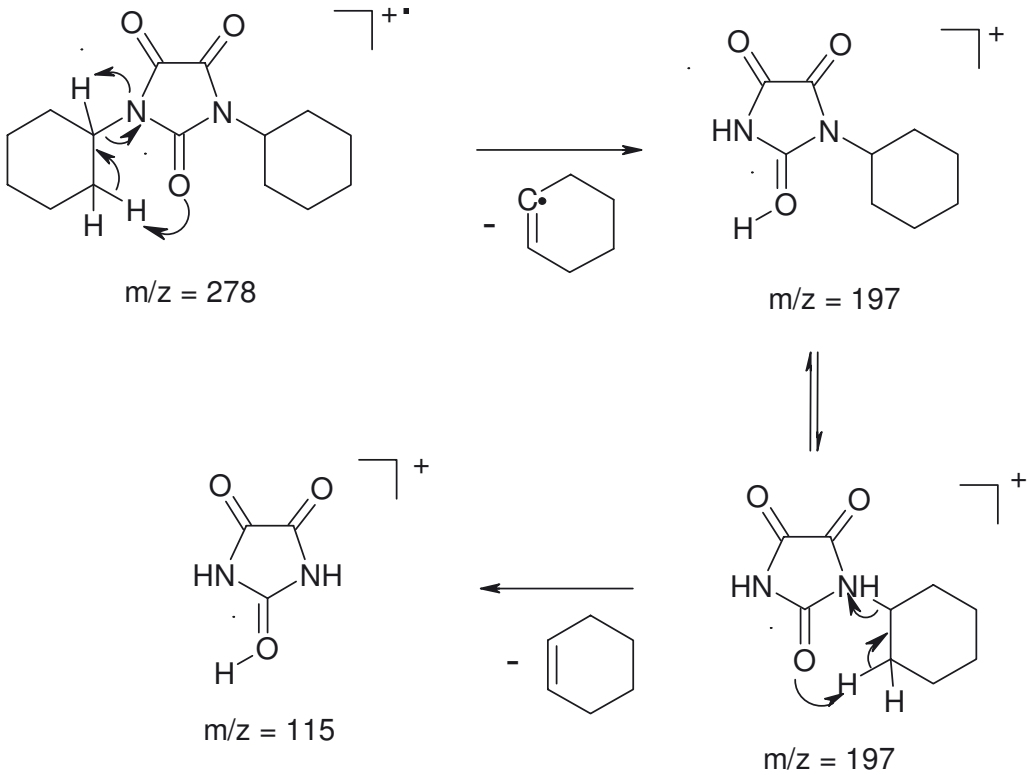


Abbildung 18: Fragmentierungsmuster von **19**

2.2.2.2 Reaktionsmechanismus zur Bildung von 19

Die Entstehung des Imidazolidintrions **19** aus Oxamidsäure (**14**) bzw. Oxalsäure (**15**) und DCC ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Bekannt ist allerdings, dass Malonsäure, sowie C-2 substituierte Malonsäuren mit DCC unter Bildung von Barbitursäure, bzw. Barbituraten reagieren[49]. Der für diese Reaktion vorgeschlagene Mechanismus beschreibt primär die Bildung eines cyclischen Anhydrids, welches anschließend mit DCC in einer 1,4-dipolaren Cycloaddition einen 1,3-Oxazinring ergibt, welcher sich in das entsprechende Barbiturat umlagert. Dieser Mechanismus kommt für die Reaktion von **9**, **14**, bzw. **15** mit DCC nicht in Betracht, da sich aus diesen Säuren kein entsprechendes Anhydrid bilden kann. Vielmehr könnte eine direkte Reaktion der jeweiligen Substanz mit DCU zur Bildung von **19** führen, analog einer bereits beschriebenen Synthese von **19** aus Oxalylchlorid und DCU[50].

Durch weitere Untersuchungen am Beispiel der Oxamidsäure (**14**) konnte gezeigt werden, dass eine Umsetzung der Säure mit DCU allein noch nicht zur Entstehung von **19** führt, sondern erst die Zugabe äquimolarer Mengen DCC. Es erfolgt vermutlich eine Aktivierung von **14** durch DCC und eine anschließende Cyclokondensation mit DCU unter Bildung von **19** (Abbildung 19).

---

[49] G.Refsofszki, M. Huhn, P. Dvortsák, K.Kálóy, *Liebigs Ann. Chem.*, **1976**, 1343 - 1350

[50] M. Ulbricht, G. Tomaschewski, *J. prakt. Chem.*, **1989**, *331*, 873 - 877

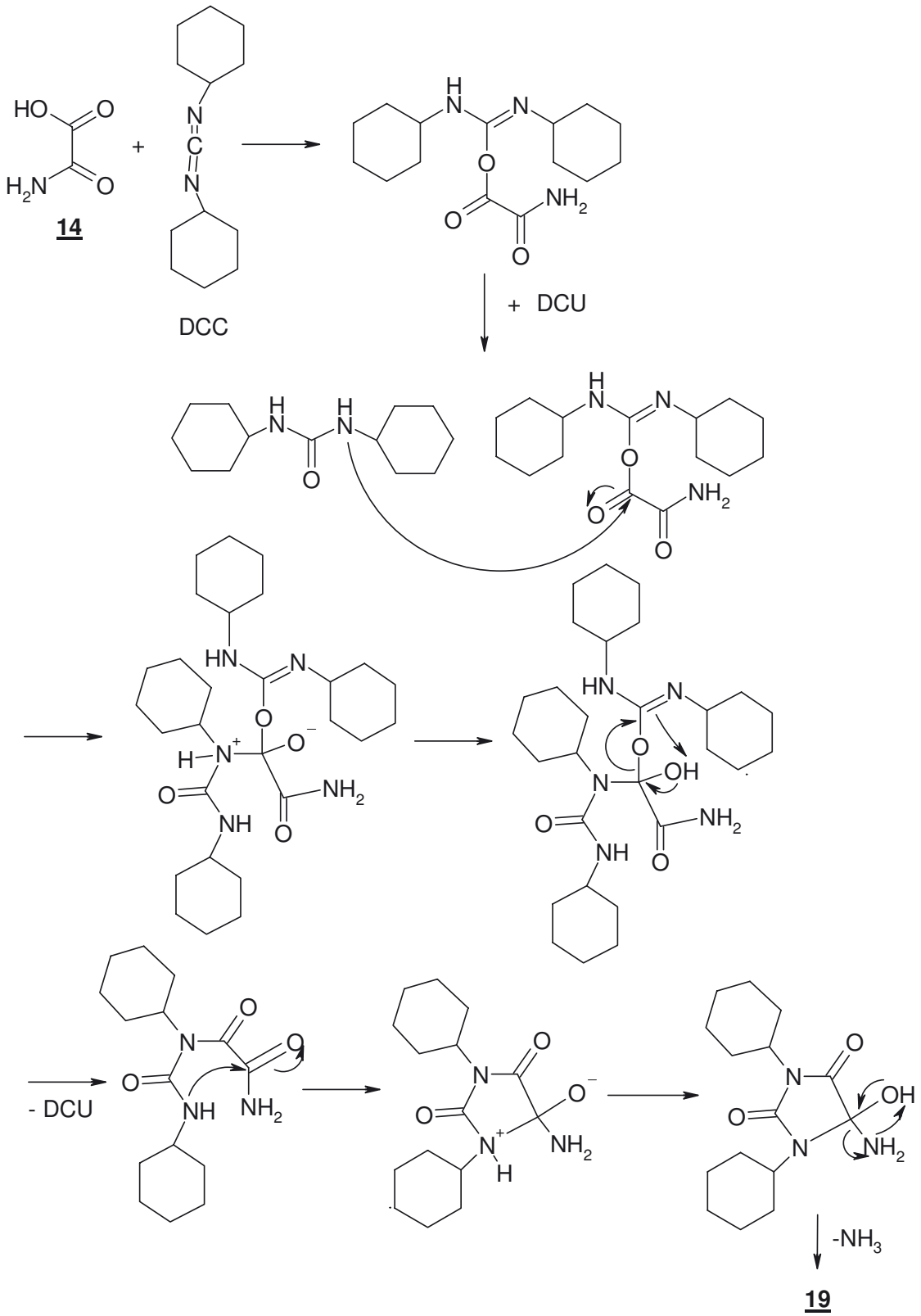


Abbildung 19: Mechanismus der Bildung von **19** aus **14** und DCU unter Einwirkung von DCC

2.2.2.3 Einfluss der Molekülstruktur von 9, 14 und 15 auf die Reaktion mit DCC

Ein Grund für die unerwünschte Cyclokondensation von DCU und Oxalsäure (**15**) sowie ihren Halbamiden **9** und **14** ist in der positiven Partialladung des zweiten Carboxylatkohlenstoffs, bzw. Amidkohlenstoffatoms zu sehen. Diese ermöglicht einen nukleophilen Angriff vom zweiten Stickstoffatom des DCU und dadurch die Bildung des Imidazolidintrions **19**.

Durch Betrachtung der ^{13}C-NMR-Spektren von **9** und **14** wird deutlich, dass die Carboxyl- und die amidischen C-Atome (ähnlich den Kohlenstoffatomen der Oxalsäure (**15**)) über eine nahezu gleich starke Positivierung verfügen (Tabelle 1).

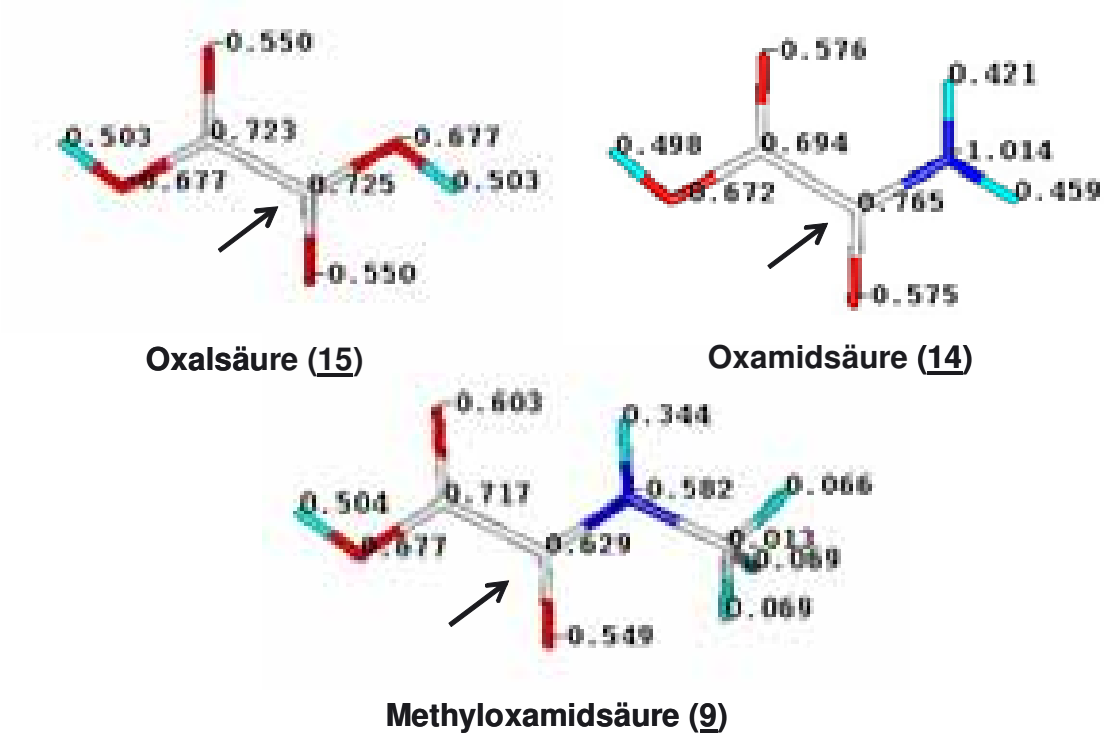
Substanz	Signale im 13C-NMR in ppm	Zuordnung
9	25.76	-NH<u>C</u>H$_3$
	158.79 (Kopplung mit -NH<u>C</u>H$_3$)	-<u>C</u>ONHCH$_3$
	161.96 (keine Kopplung)	-<u>C</u>OOH
14	160.54	Zuordnung nicht eindeutig möglich
	162.51	
15	160.29[51]	-<u>C</u>OOH

Tabelle 1: Signale von **9**, **14** und **15** im ^{13}C-NMR-Spektrum (DMSO-d$_6$), in Klammern die Kopplung die sich aus dem HMBC-Spektrum von **9** ergeben

Von **9** wurde zusätzlich ein HMBC-Spektrum aufgenommen, um eine gesicherte Zuordnung der Signale bei 158.79 und 161.96 ppm vornehmen zu können. Außerdem erfolgte eine „ab-initio"-Berechnung der Ladungsverteilungen von **9**, **14** und **15** mit Hilfe des Programms „Spartan". Die Ladungsverteilung innerhalb dieser drei Verbindungen zeigt Abbildung 20.

[51] L. Lamandé, D. Boyer, A. Munoz, *J. Organomet. Chem.*, **1987**, *329*, 1-30

Vergleich der Partialladungen von Oxalsäure (15), Oxamidsäure (14) und Methyloxamidsäure (9)



Oxalsäure (15) **Oxamidsäure (14)**

Methyloxamidsäure (9)

Abbildung 20: Theoretisch ermittelte Partialladungen von **9**, **14** und **15**

Die theoretisch ermittelten Partialladungen der Carbonylkohlenstoffe stimmen in ihrer Tendenz mit den ^{13}C-NMR-Untersuchungen überein. Die zur Carboxylgruppe benachbarten amidischen Kohlenstoffatome in **9** und **14** sind ähnlich stark positiviert wie das C-Atom der Säurefunktion. Bei **14** verfügt das amidische Kohlenstoffatom theoretisch sogar über eine größere positive Partialladung als der Kohlenstoff der Carbonsäurefunktion. Diese Tatsache würde erklären, weshalb die Reaktion von **14** mit DCC eine größere Ausbeute an **19** liefert, als die Darstellung aus DCC und **9** bzw. **15**.

Nach Beendigung dieser Versuchsreihe wurde deutlich, dass sich die Veresterungen von **9**, **14** und **15** mit Benzylalkohol nicht mit Hilfe der „DCC-Methode“ möglich ist, da die Bildung des Nebenproduktes **19** vorherrscht.

2.2.3 Darstellung von Carbonsäurebenzylestern unter Verwendung von CDI (Carbonyldiimidazol)

Carbonsäuren bilden durch Umsetzung mit CDI energiereiche Carbonsäureimidazolide, welche durch Zugabe eines Alkohols direkt in den entsprechenden Carbonsäureester überführt werden können. Diese Methode

zur Darstellung von Carbonsäureestern verläuft analog der Verwendung von DCC über eine Aktivierung der Carbonsäure, ermöglicht allerdings nicht die Bildung unerwünschter cyclischer Additionsprodukte analog der Reaktion von **14** und DCU (Kapitel 2.2.2).

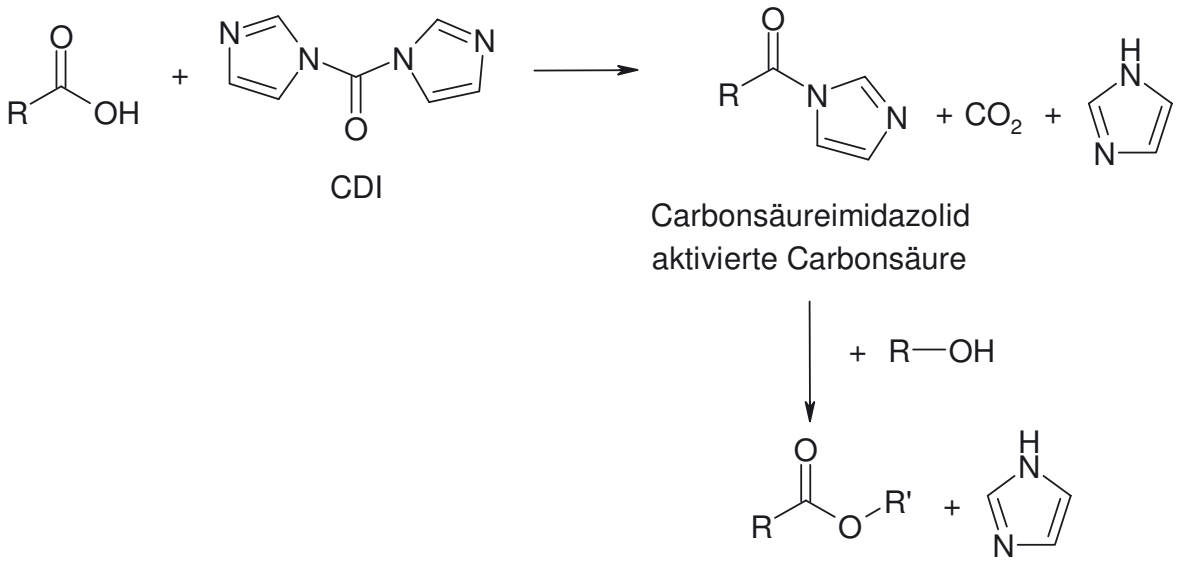


Abbildung 21: Veresterung von Carbonsäuren unter Verwendung von CDI

Da diese Methode bereits zur Synthese von Oxalsäurediamid aus Oxamidsäure (**14**) erfolgreich verwendet wurde[52], sollte sie auf ihre Eignung zur Darstellung von Benzylestern von **9**, **14** und **15** untersucht werden, die über die DCC-Methode nicht zugänglich waren.

Die entsprechende Carbonsäure wurde zunächst mit CDI aktiviert, der Reaktionsansatz anschließend mit Benzylalkohol versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser konnten die gewünschten Ester **18** und **21** in akzeptablen Ausbeuten extrahiert werden. (Abbildung 22).

[52] A. Buschauer, I. Krämer, W. Schunack, *Arch. Pharm.*, **1986**, *319*, 434 - 443

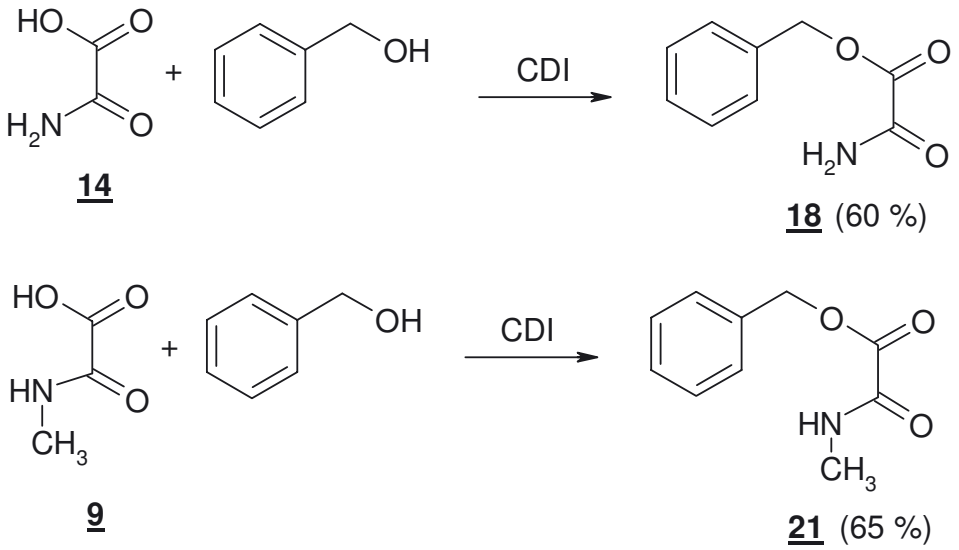


Abbildung 22: Veresterung von **9** und **14** mit Benzylalkohol unter Verwendung von CDI

Oxalsäure (**15**) hingegen lieferte unter diesen Bedingungen zunächst ein instabiles Reaktionsprodukt, das nach längerer Aufbewahrung des Etherextraktes jedoch zugunsten des Dibenzylesters **20** verschwand. Wahrscheinlich handelte es sich bei diesem Zwischenprodukt um das instabile Mono- oder Diimidazolid von **15**, bzw. um den Monobenzylester von **15**. Unter veränderten Reaktionsbedingungen (4h, Siedehitze) entstand direkt der Diester **20** (Abbildung 23), dessen Identität mit Hilfe einer Vergleichssubstanz (aus Oxalylchlorid und Benzylalkohol) bestätigt werden konnte.

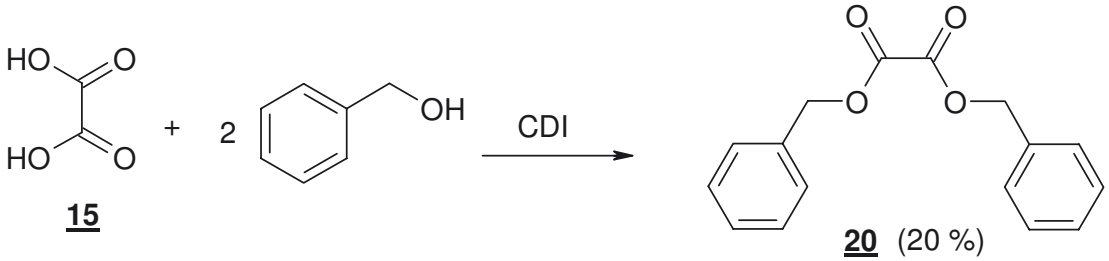


Abbildung 23: Synthese von **20** mit Hilfe von CDI

Die Isolierung von **20** aus dem Reaktionsansatz erwies sich als äußerst aufwendig, da der nicht verbrauchte Benzylalkohol nur durch eine Kugelrohrdestillation entfernt werden konnte.

Die CDI-Methode eignet sich demnach ebenfalls nicht zur quantitativen Veresterung von **9**, **14** und **15** aus biologischem Material.

2.2.4 Darstellung von Carbonsäuremethylestern unter Verwendung von Diazomethan

Die vorausgegangen Untersuchungen zur Darstellung von Phenacyl- bzw. Benzylestern aus Oxalsäure (**15**) und deren Halbamiden **9** und **14** zeigen deutlich, dass diese Säuren anders reagieren als „normale“ Mono- und Dicarbonsäuren. Eine direkte Aktivierung über Kupplungsreagenzien ist nur bedingt möglich und liefert in keinem Fall quantitative Ausbeuten der Derivate.

Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Herstellung eines UV-aktiven Derivats zur DC-Analytik verzichtet. Vielmehr sollte eine Derivatisierungsmethode gewählt werden, die keinerlei Nebenprodukte oder Rückstände an Reagenzien produziert und eine quantitative Umsetzung der Carbonsäure garantiert. Zu diesem Zweck bot sich die Verwendung von Diazomethan zur Herstellung von Methylestern an[53].

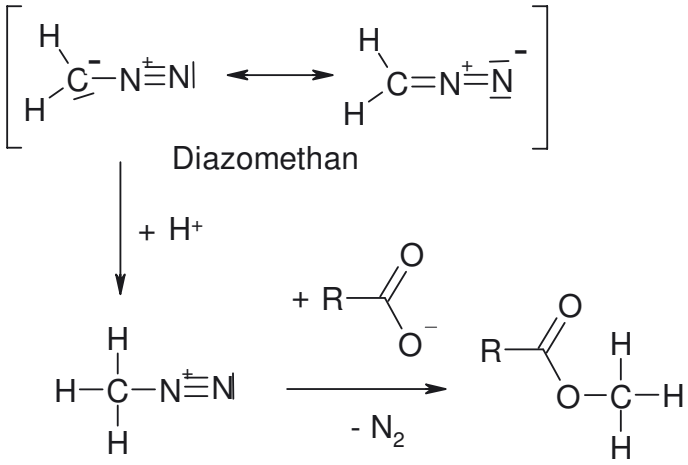


Abbildung 24: Mechanismus der Methylierungsreaktion einer Carbonsäure mit Diazomethan

Die Darstellung von Diazomethan erfolgte durch Umsetzung einer etherischen Lösung von N-Methyl-N-Nitroso-p-toluolsulfonamid (Diazald®) mit Kaliumhydroxid bei 60 °C, wobei das entstandene Diazomethan zusammen mit dem Diethylether ständig abdestilliert wird. Die so hergestellte Diazomethanlösung ist in der Kälte mehrere Tage haltbar[54]. Zur Synthese der Carbonsäuremethylester wurden **9**, **14** bzw. **15** in wenig Methanol gelöst und solange Diazomethanlösung hinzugetropft, bis die Gelbfärbung der Lösung

---

[53] W. Walter, W. Francke, *Beyer Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie*, 23. Auflage, **1998**, S. Hirzel Verlag Stuttgart/Leipzig, 177 - 178

[54] T. J. de Boer, H. J. Backer, *Organic Synthesis Coll. Vol. 4*, **1963**, 250 - 253

konstant bestehen blieb. Anschließend wurde die Lösung mehrere Stunden gerührt und eventuelle Reste von Diazomethan durch Zugabe von wenig Eisessig zerstört. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man den jeweiligen Carbonsäuremethylester **22** - **24** in quantitativer Ausbeute. Die Identität der dargestellten Verbindungen wurde mit Hilfe der spektralen Daten bestätigt.

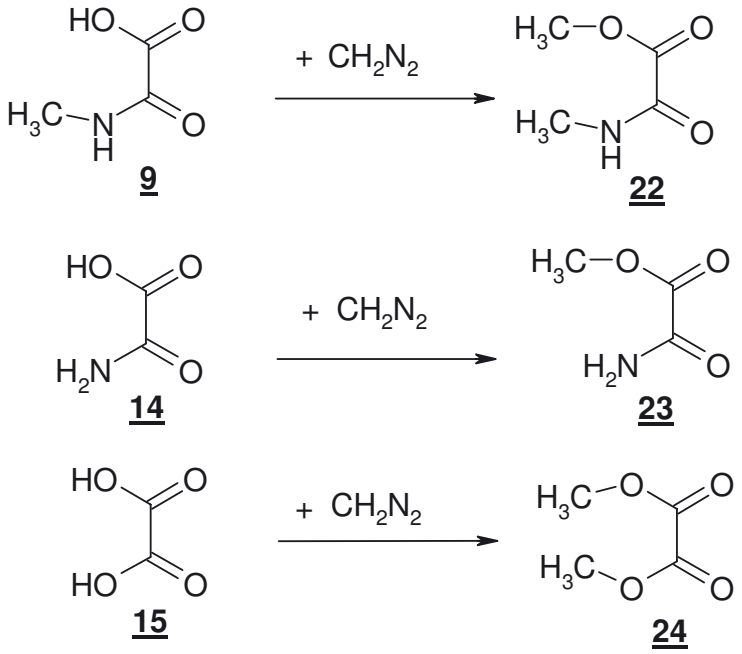


Abbildung 25: Methylierung von **9**, **14** und **15** durch Diazomethan

Insgesamt ist dies eine Derivatisierungsmethode, die sich aufgrund der vollständigen Umsetzung von **9**, **14** und **15** gut zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen eignet. Zwar erfordern die Herstellung und der Umgang mit dem sehr giftigen und explosiven Diazomethan besondere Sicherheitsmaßnahmen (doppelte Schutzverglasung, spezielle Destillationsapparatur), die allerdings einmal etabliert keinen großen Arbeitsaufwand darstellen.

Da die Methylester **22** – **24** UV-inaktiv sind, lassen sie sich nur mit Hilfe der Gaschromatographie qualitativ und quantitativ analysieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Umsetzung mit Diazomethan eine geeignete Methode zur Derivatisierung der Substanzen **9**, **14** und **15** darstellt. Aus diesem Grund wurde sie im weiteren Verlauf der Arbeit zur gaschromatographischen Bestimmung von **9** aus biologischem Probenmaterial verwendet.

2.3 Quantitative Extraktion der Methyloxamidsäure (9) aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie

Nachdem mit der Diazomethan-Reaktion eine geeignete Derivatisierungsmethode für **9** gefunden war, musste eine quantitative Extraktion aus biologischem Material entwickelt werden. Eine direkte Umsetzung des biologischen Probenmaterials mit Diazomethan ist nicht sinnvoll, da hierbei eine unnötig große Menge an Methylierungsreagenz verbraucht wird und ein komplexes Gemisch von unerwünschten Nebenprodukten entsteht.

2.3.1 Einfluss der Acidität von 9 auf die Extrahierbarkeit aus wässriger Lösung

Oxalsäure (**15**) und ihre Halbamide Oxamidsäure (**14**) und Methyloxamidsäure (**9**) weisen neben hervorragender Wasserlöslichkeit eine starke Acidität auf. Die pKs-Werte liegen im Bereich von ca. 2 und unterscheiden sich somit deutlich von den entsprechenden Werten für kurzkettige Monocarbonsäuren (Tabelle 2). In neutralem, wässrigem Probenmaterial (Urin, Plasma, Allantoisflüssigkeit aus bebrüteten Hühnereiern) liegen diese Substanzen demnach praktisch vollständig dissoziiert vor.

	pK_{s1}-Wert	**pK_{s2}-Wert**
Oxalsäure (**15**)	1.23[55]	4.19[55]
Oxamidsäure (**14**)	1.60[56]	-
Methyloxamidsäure (**9**)	2.37[56]	-

Tabelle 2: pK_s-Werte von **9**, **14** und **15**

Bei pH = 1 liegt **9** zwar praktisch als ungeladene Carbonsäure vor, allerdings ist eine quantitative Flüssig-flüssig-Extraktion aus wässrigem Probenmaterial aufgrund der sehr guten Wasserlöslichkeit der Substanz nicht möglich. So kann **9** erst nach vollständiger Trocknung der sauren Wasserphase mit Hilfe polarer organischer Lösungsmittel aus dem wasserfreien Rückstand gewonnen

[55] E. Ehlers, *Chemie II*, **1997**, *5. Auflage*, Gustav Fischer Verlag, 802

[56] Berechnet von Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris V 4.67, Chemical Abstracts

werden. Aufgrund des großen Arbeitsaufwands, der für eine solche Isolierung erforderlich war, wurde mit der Ionenaustauschchromatographie eine Extraktionsmethode gewählt, mit der die Methyloxamidsäure (**9**) quantitativ aus wässriger Lösung isoliert werden kann.

2.3.2 Anwendung der Ionenaustauschchromatographie in der Harnanalytik

Bereits im Rahmen mehrerer Dissertationen wurde die Ionenaustauschchromatographie zur quantitativen Extraktion von Carbonsäureanionen aus dem Urin verwendet (z. B. Dissertationen von A. Pickert[57] und C. Först[58]). Abbildung 26 zeigt die verwendete Aufarbeitungsmethode.

---

[57] A. Pickert, *Untersuchung der organischen Säuren in Serum und Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Azidosen*, Dissertation **1987**, Tübingen

[58] C. Först, *Basisprofile organischer Säuren im Urin – Gaschromatographisch-massenspektroskopische Analysen, Vergleiche bei normaler und diabetischer Stoffwechsellage*, Dissertation **1985**, Heidelberg

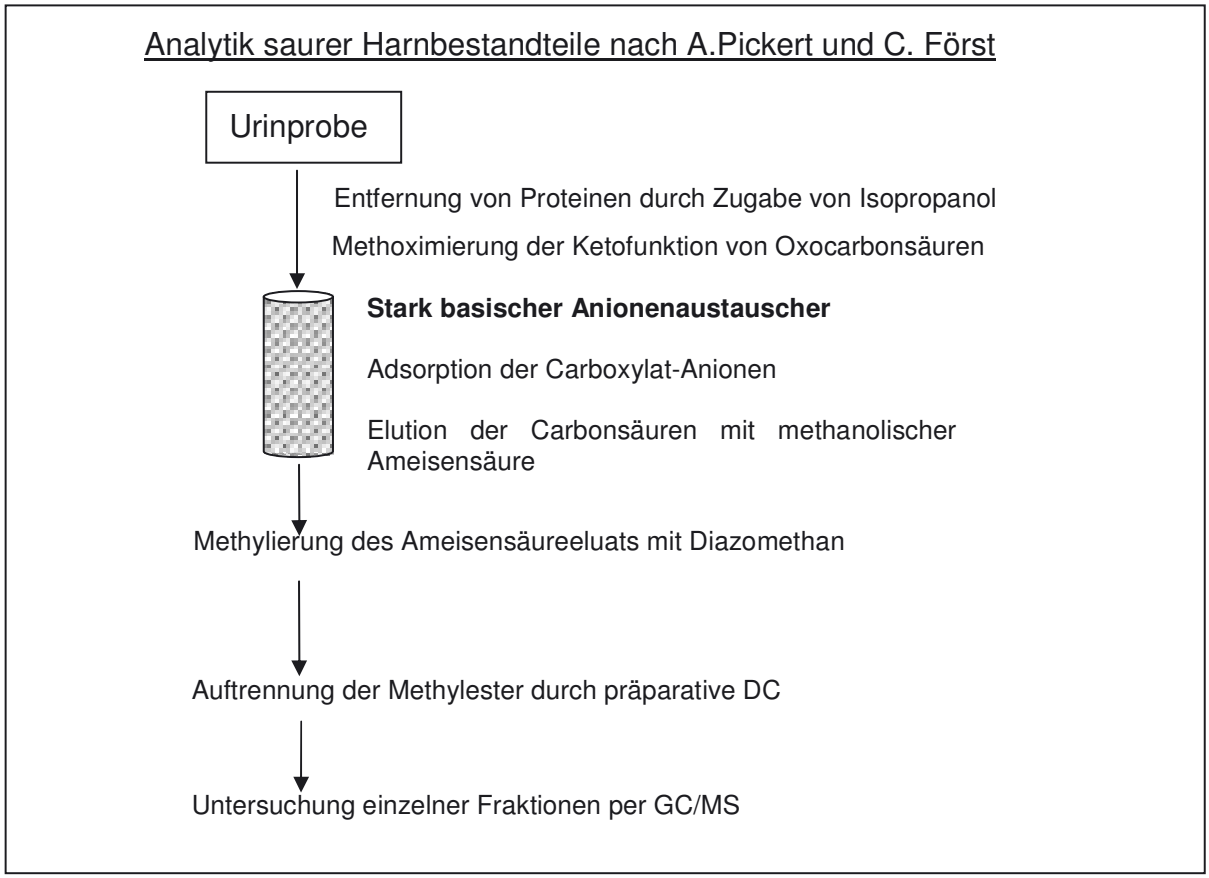


Abbildung 26: Verfahren zur Analytik organischer Säuren aus dem Urin nach Pickert und Först

Dieses Verfahren zur Extraktion von Säuren aus dem Urin beruht auf Untersuchungen von Spiteller und Spiteller, die auf diese Weise bereits 1979 die Zusammensetzung saurer Harnbestandteile aufklären konnten[59].

Der vorbereitete Urin wird über eine Chromatographiesäule gegeben, die mit einem stark basischem Anionenaustauscher (Amberlyst A-26®, funktionelle Gruppe: $-CH_2-N^+(CH_3)_3$) gefüllt ist. Alle ungeladenen sowie kationisch geladenen Urinbestandteile werden nicht durch das Austauscherharz zurückgehalten, während die quartären Ammoniumgruppen alle anionischen Strukturen fixieren. Anschließend erfolgt eine Elution der gebundenen Anionen mit einem Überschuss an methanolischer Ameisensäure, wodurch die freien Säuren gebildet werden. Die auf diese Weise quantitativ extrahierten sauren Substanzen werden anschließend mit Diazomethan umgesetzt. Die entstandenen Methylester werden unter Zuhilfenahme einer präparativen Dünnschichtchromatographie in mehrere Fraktionen unterteilt, die einzelnen

[59] M. Spiteller, G.Spiteller, *J. Chromatogr.*, **1979**, *164*, 253 - 317

Fraktionen mit Hilfe der Kapillargaschromatographie aufgetrennt und die Methylester anschließend mit Hilfe der Massenspektroskopie analysiert. Nach dieser Methode konnten über 150 verschiedene Säuren im Urin gesunder und diabetischer Probanden identifiziert werden.

Überraschenderweise befand sich die Oxalsäure (**15**) nicht unter den detektierten Säuren, obwohl bekannt ist, dass **15** im Humanstoffwechsel beim Abbau von Glycin und Ascorbinsäure entsteht und anschließend als Oxalat im Urin erscheint (Abbildung 27 und Abbildung 28)

2.3.2.1 Entstehung von 15 im Humanstoffwechsel

Glycin wird durch die D-Aminosäure-Oxidase zur Glyoxylsäure oxidiert, welche durch oxidative Decarboxylierung aktivierte Ameisensäure liefert. Bei hohen Konzentrationen von Glyoxylsäure entsteht allerdings **15**, welches als Oxalat im Urin erscheint[60].

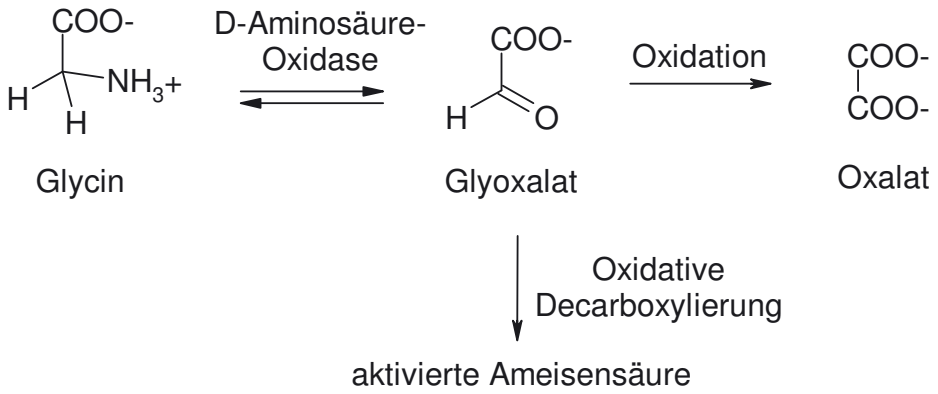


Abbildung 27: Abbau von Glycin im menschlichen Stoffwechsel

Eine weitere Oxalsäurequelle stellt der Abbau von Ascorbinsäure dar. Diese wird über eine reversibel zur Dehydroascorbinsäure oxidiert, welche nach Verseifung des Lactonringes zu **15** und L-Threonsäure abgebaut wird[61]. Hierbei ist **15** mit 40 % einer verabreichten Dosis der Hauptmetabolit der Ascorbinsäure[62] .

---

[60] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, **1994,** *14. Auflage*, Georg Thieme Verlag, 185 - 187

[61] K. Eger, R. Troschütz, H.J. Roth, *Arzneistoffanalyse*, **1999**, *4. Auflage*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 223 - 230

[62] F. von Bruchhausen (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, **1992**, *5. Auflage*, , Springer Verlag, Band 7, 299 - 303

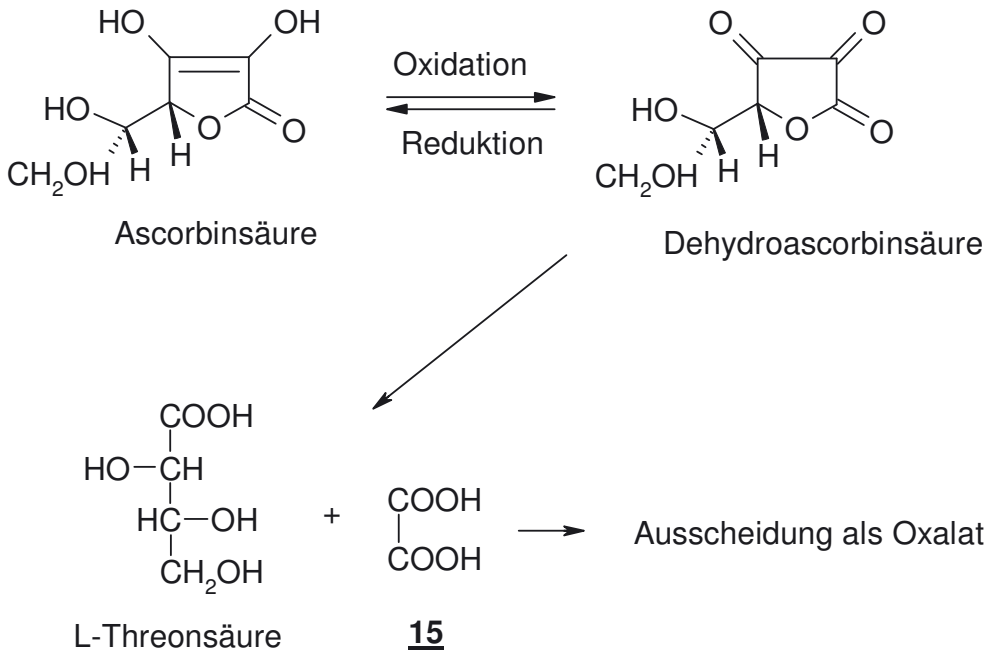


Abbildung 28: Abbau von Ascorbinsäure im menschlichen Stoffwechsel

Zusätzlich ist eine direkte Aufnahme von Oxalsäure (**15**) mit der Nahrung möglich. So enthält beispielsweise Spinat 6 – 8 % Oxalsäure[63]. Insgesamt liegt die durchschnittliche Oxalatausscheidung im menschlichen Urin zwischen 10 und 55 mg/24 Stunden[64].

Ursache für das Fehlen von **15** in den extrahierten Säurefraktionen der bisherigen Untersuchungen[57,58] könnte die hohe Acidität dieser Dicarbonsäure gegenüber anderen Mono- und Dicarbonsäuren sein. Aus dem Urin wird Oxalat als Dianion durch den stark basischen Anionenaustauscher Amberlyst A-26 fixiert, allerdings ist die Ameisensäure (pK_s = 3.77) offensichtlich zu wenig sauer, um die fixierten Oxalationen zu protonieren und damit aus ihrer Bindung zum Ionenaustauscher zu lösen. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb nach dem Verfahren von Spiteller und Spiteller[59] **15** nicht isoliert und identifiziert werden konnte.

Da die Methyloxamidsäure (**9**) als Halbamid von **15** ebenfalls zu den stark sauren Bestandteilen des Urins gehört (pK_s = 2.37), ist eine Desorption mit

---

[63] F. von Bruchhausen (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, **1992**, *5. Auflage*, , Springer Verlag, Band 3, 899 - 901

[64] G. Löffler, P, . E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, **1997**, Springer Verlag, 1051

diesem Verfahren ebenfalls nicht möglich. Es war demnach notwendig, zusätzlich zur Ameisensäure eine noch stärkere Säure einzusetzen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf ein neues Verfahren zur Analytik von **9** basierend auf der Methode von Spiteller und Spiteller entwickelt.

2.3.3 Entwicklung einer optimierten Methode zur Isolierung von 9 aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie

Es wurde eine Säure benötigt, die als Elutionsmittel gezielt Urinbestandteile mit einem pK_s-Wert unter 3.8 freisetzt. Zu diesem Zweck wurde die Trifluoressigsäure (pK_s-Wert = 0.23) ausgewählt. Dadurch sollte eine vollständige Entfernung von **9** vom Ionenaustauscherharz gewährleistet werden. Außerdem bleiben sehr schwache anorganische Basen wie beispielsweise Chlorid und Sulfat durch dieses Elutionsmittel unprotoniert und dadurch am Ionenaustauscher fixiert. Trifluoressigsäuremethylester (Siedepunkt 41 – 43°C), welcher sich nach Behandlung des Eluats mit Diazomethan in großen Mengen bildet, kann durch eine nachfolgende Aufarbeitung am Rotationsverdampfer leicht vollständig entfernt werden.

Nachfolgend werden exemplarisch zwei Modellversuche beschrieben, die zur Optimierung der Trennmethode durchgeführt wurden.

2.3.3.1 Modellversuch zur Verwendung von Trifluoressigsäure als Elutionsmittel

Das theoretisch abgeleitete Verfahren wurde nicht direkt an einer Original-Urinprobe getestet, sondern zunächst mit einem Gemisch zweier Modellcarbonsäuren durchgeführt. Als solche wurden die 2,6-Dihydroxybenzoesäure (pK_s-Wert = 1.30) und die Benzoesäure (pK_s-Wert = 4.21) eingesetzt. Beide Substanzen erlauben nach ihrer Elution von der Ionenaustauschersäule eine direkte dünnschichtchromatographische Identifizierung und ersparen somit eine Derivatisierung zum jeweiligen Methylester sowie eine anschließende gaschromatographische Untersuchung. Die Aufarbeitung der Probe zeigt Abbildung 29.

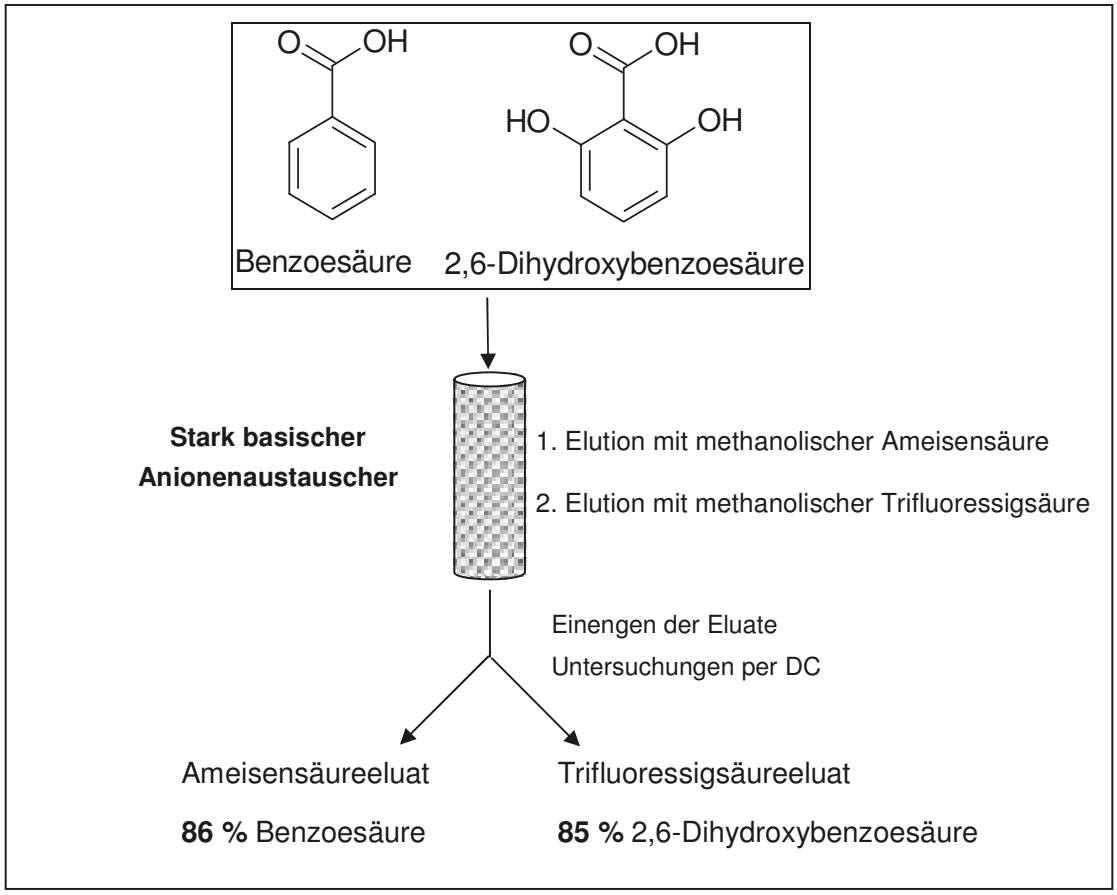


Abbildung 29: Modellversuch zur Verwendung von Trifluoressigsäure zur Elution stark saurer Substanzen

Es konnte gezeigt werden, dass die konsekutive Elution mit Ameisensäure und Trifluoressigsäure eine vollständige Trennung der beiden unterschiedlich starken Säuren ermöglicht. Dagegen betrug die Widerfindungsrate in beiden Fällen nur ca. 85 %. Die Ursache für die unvollständige Elution der Modellsubstanzen war zunächst unklar, so dass in weiteren Versuchen die verwendete Menge an Elutionsmittel variiert wurde. Hieraus ergab sich, dass die zur Elution verwendeten Säuren mindestens in einem 10fachen Überschuss gegenüber der zu eluierenden Säure eingesetzt werden müssen, um eine quantitative Isolierung sicherzustellen. Diese Ergebnisse wurden anschließend durch weitere Analysen von Gemischen unterschiedlich starker Säuren bestätigt.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung der genannten Elutionsmittel eine Abtrennung der Methyloxamidsäure (**9**) von schwächer aciden Verbindungen ermöglicht und

daher für die gezielte Isolierung dieser Säure aus wässrigem, auch biologischem Probenmaterial geeignet ist.

2.3.3.2 Modellversuch zur Abtrennung von Aminosäuren durch Verwendung eines Kationenaustauschers

Neben den Oxalsäurederivate zählen zahlreiche Carbonsäuren mit einem pK_s < 3.8 zu den natürlichen Bestandteilen des Urins von Mensch und Ratte. Aus diesem Grund ist bei der Aufarbeitung des Probenmaterials neben **9** eine große Anzahl weiterer saurer Bestandteile im Trifluoressigsäureextrakt zu erwarten.

Hierzu zählen vorwiegend die α-Aminosäuren, deren Acidität mit der von **9** vergleichbar ist. Deshalb wäre eine Abtrennung dieser Verbindungen vor Gewinnung des Trifluoressigsäureextraktes wünschenswert. Um zu überprüfen, ob dies mit Hilfe eines Kationenaustauschers möglich ist, wurde ein Gemisch aus Phenylalanin und Oxamidsäure (**14**) folgendermaßen aufgearbeitet.

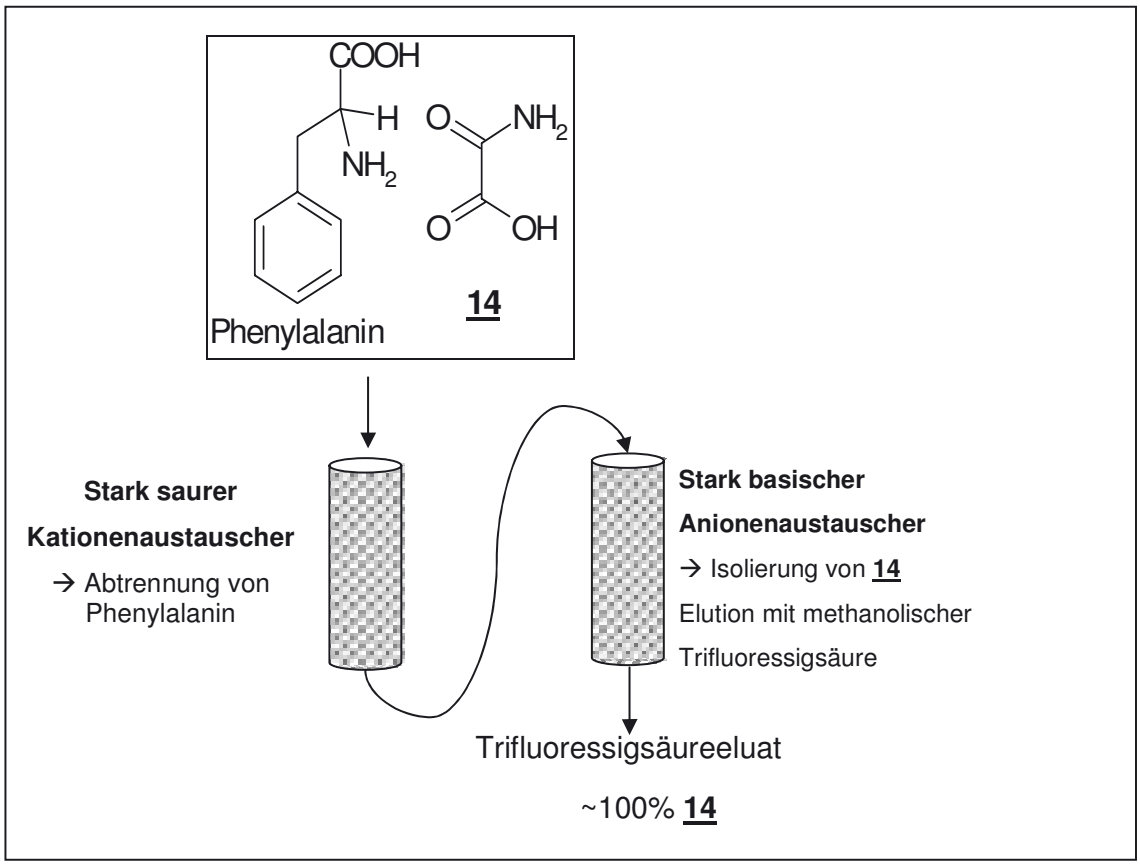


Abbildung 30: Isolierung und Trennung von Phenylalanin und **14** durch Ionenaustauschchromatographie

Nach der Fixierung von Phenylalanin am stark sauren Kationenaustauscher wird **14** zunächst am stark basischen Anionenaustauscher absorbiert und

anschließend mit Trifluoressigsäure quantitativ desorbiert. Auf diese Weise können Aminosäuren, aus einem komplexen Substanzgemisch, wie z. B. einer Urinprobe entfernt werden.

2.3.4 Kombinierte Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von 9 aus biologischem Material

Aus diesen Modellversuchen wurde folgende Aufarbeitungsmethode zur quantitativen Isolierung von **9** aus biologischem Material (Abbildung 31) abgeleitet:

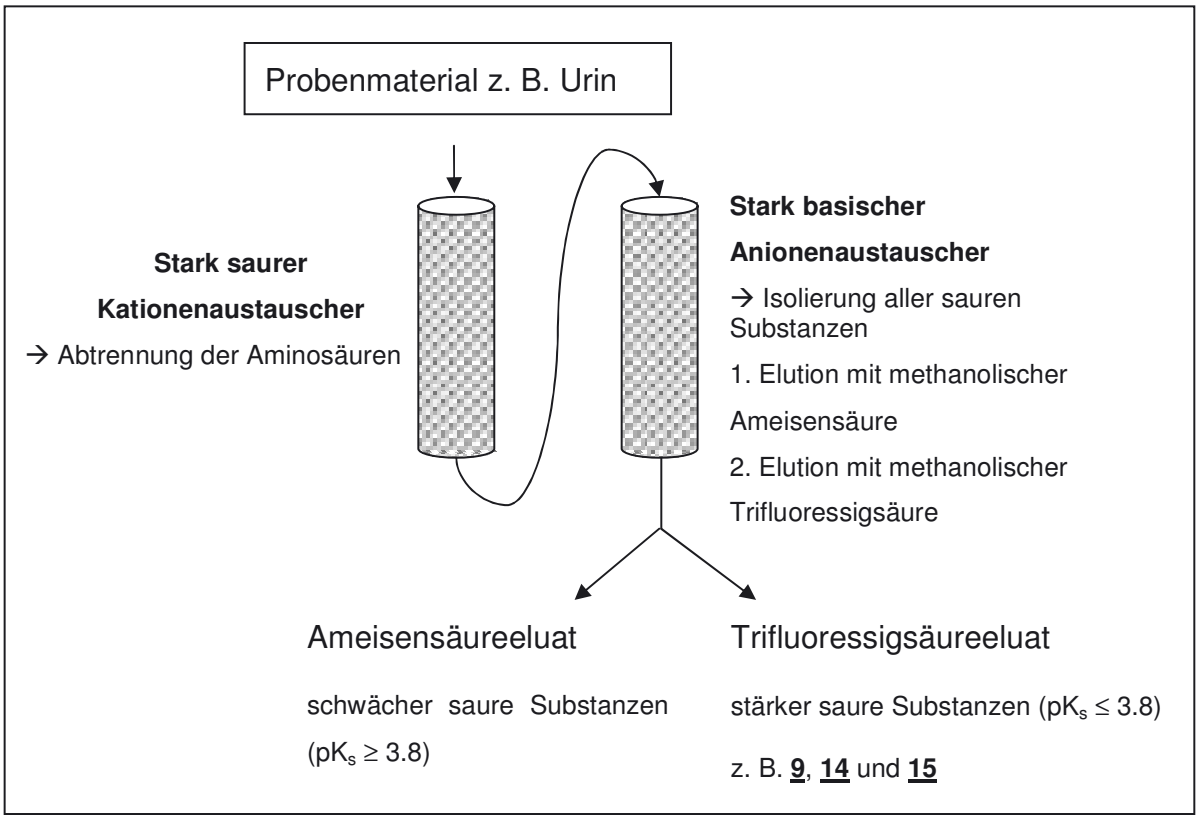


Abbildung 31: Isolierung von **9** aus biologischem Material

Zuerst werden alle Substanzen mit basischen Strukturelementen, insbesondere die Aminosäuren, durch einen Kationenaustauscher abgetrennt. Anschließend werden die sauren Substanzen am Anionenaustauscher absorbiert und mittels Ameisen- bzw. Trifluoressigsäure in zwei getrennte Fraktionen eluiert. Diese Fraktionen können mit Diazomethan verestert und gaschromatographisch aufgetrennt werden. Eine präparative Dünnschichtchromatographie der einzelnen Säurefraktionen ist nicht notwendig, da durch das Fehlen der

Aminosäuren und die Unterteilung der Carbonsäuren aufgrund ihrer Säurestärke bereits eine ausreichende Differenzierung erreicht wird.

2.4 Gaschromatographische Auftrennung der Säureextrakte

Die Analytik der methylierten Ameisensäure- bzw. Trifluoressigsäureextrakte erfolgte durch Einsatz der Kapillargaschromatographie. Bei GC-System 1 erfolgte die Detektion der Substanzen durch Flammenionisation. Eine weitere Analyse der Proben mit einer GC-MS-Kopplung (GC-System 2) ermöglichte die Aufklärung einer großen Anzahl der enthaltenen Verbindungen. Als Trennsäule wurde eine Permabond OV-17 Säule verwendet, die durch ihre mittlere Polarität eine gute Trennung der hydrophilen Carbonsäureester ermöglicht. Außerdem kam im GC-System 2 eine HP-5 MS Säule zum Einsatz.

2.4.1 Trifluoressigsäureextrakt einer Urinprobe

Zunächst wurde der Urin gesunder Probanden ohne vorherige Einnahme von **1** aufgearbeitet. Dieser Urin wird im Folgenden als „Blindprobe“ bezeichnet. Auf diese Weise sollte das natürliche Säureprofil des Urins analysiert werden. Abbildung 32 zeigt die Zusammensetzung des Trifluoressigsäureextrakts, analysiert mit GC-System 2. Exemplarisch sind sechs der aufgeklärten Methylester gekennzeichnet. Bei diesen Verbindungen handelt es sich hauptsächlich um methylierte Produkte des endogenen Stoffwechsels (siehe Tabelle 3), deren freie Säuren über einen pK_s-Wert ≤ 3.8 (Verbindungen a – d) verfügen. Das Auftreten von methylierten Harnsäure- und Koffeinderivaten in dieser Fraktion (Verbindungen e und f) ist nicht über die Säurestärke der jeweiligen Ausgangsverbindung zu erklären, da beispielsweise Harnsäure lediglich einen pK_s-Wert = 5.6 besitzt und somit ausschließlich im Ameisensäureextrakt zu erwarten wäre. Wahrscheinlich werden diese Strukturen zusätzlich in den Trifluoressigsäureextrakt „verschleppt“, wo sie nach der Behandlung mit Diazomethan beispielsweise als Verbindungen e und f auftreten.

Peak	Substanz
a	Oxalsäuredimethylester (**24**)
b	Phosphorsäuretrimethylester
c	Citronensäuretrimethylester
d	Hippursäuremethylester
e	Methyliertes Koffeinderivat
f	1,3,7,9-Tetramethylharnsäure

Tabelle 3: Endogene Verbindungen identifiziert aus dem Trifluoressigsäureextrakt einer Blindprobe (methyliert durch Umsetzung mit Diazomethan)

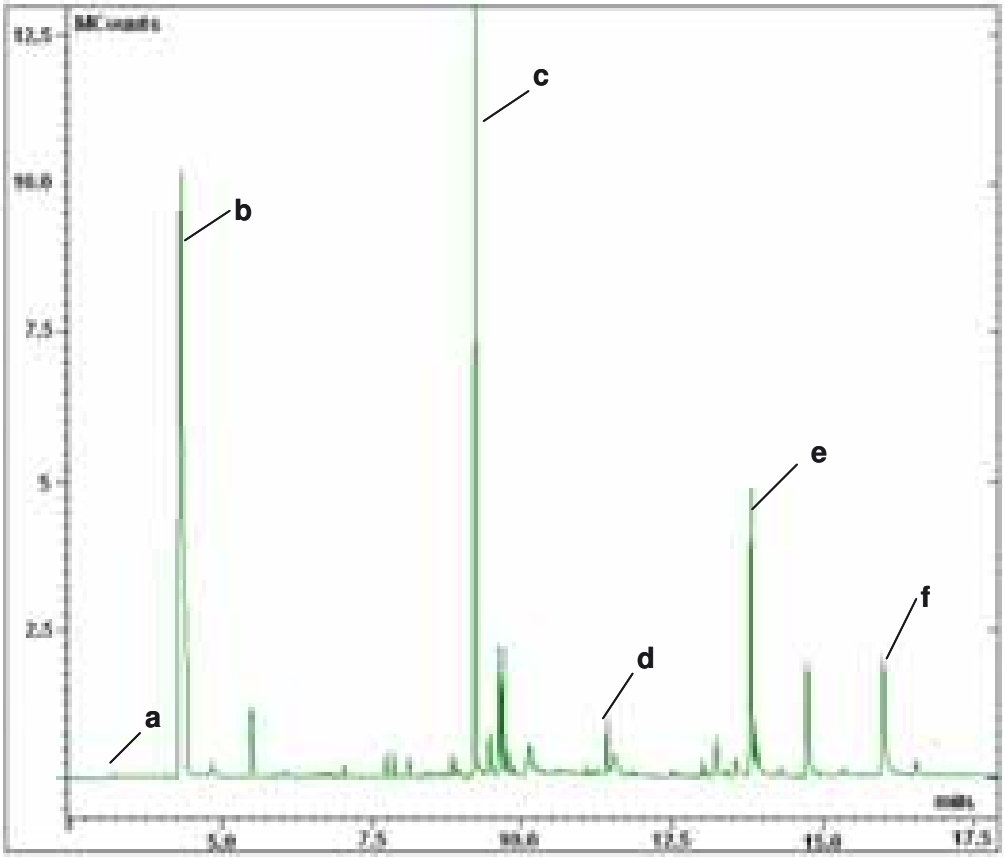


Abbildung 32: Gaschromatische Auftrennung des Trifluoressigsäureextrakts einer Urinprobe

2.4.1.1 Analytik des Oxalsäuredimethylesters (24)

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen[57,58] konnte durch die Elution mit Trifluoressigsäure die Oxalsäure (**15**) aus der Blindprobe identifiziert werden. Die anschließende gaschromatographischen Untersuchung des entsprechenden Methylesters **24** erforderte eine optimale Abstimmung der instrumentellen Parameter:

1. Die hohe Flüchtigkeit von **24** bedingt zu Beginn des Temperaturprogramms eine niedrige Ofentemperatur (40 - 50°C, für einige Minuten).
2. Die Detektion sollte möglichst nach 3 min beginnen („solvent delay time“), da die Retentionszeiten von **24** in den verwendeten GC-Systemen zwischen 3.5 und 4.5 min liegen.
3. Die Injektortemperatur darf 180 °C nicht überschreiten, da sich die Methylester **22** – **24** bei höheren Temperaturen zersetzen und nicht mehr quantitativ auf die Trennsäule gelangen.

2.4.2 Trifluoressigsäureextrakt einer Blindprobe nach Zumischen von Methyloxamidsäure (9)

Durch Zugabe von **9** zu einer Urinprobe und anschließende Aufarbeitung des Probenmaterials sollte die Analytik für **9** aus diesem komplex zusammengesetzten Untergrund überprüft werden. Abbildung 33 und Abbildung 34 zeigen einen gut aufgelösten Peak für den Methylester von **9** (**22**) bei einer Retentionszeit von 5.2 Minuten (GC-System 2), sowie das zugehörige Massenspektrum, in dem mit m/z = 118 das [M+1]-Signal als Peak höchster Masse registriert wird.

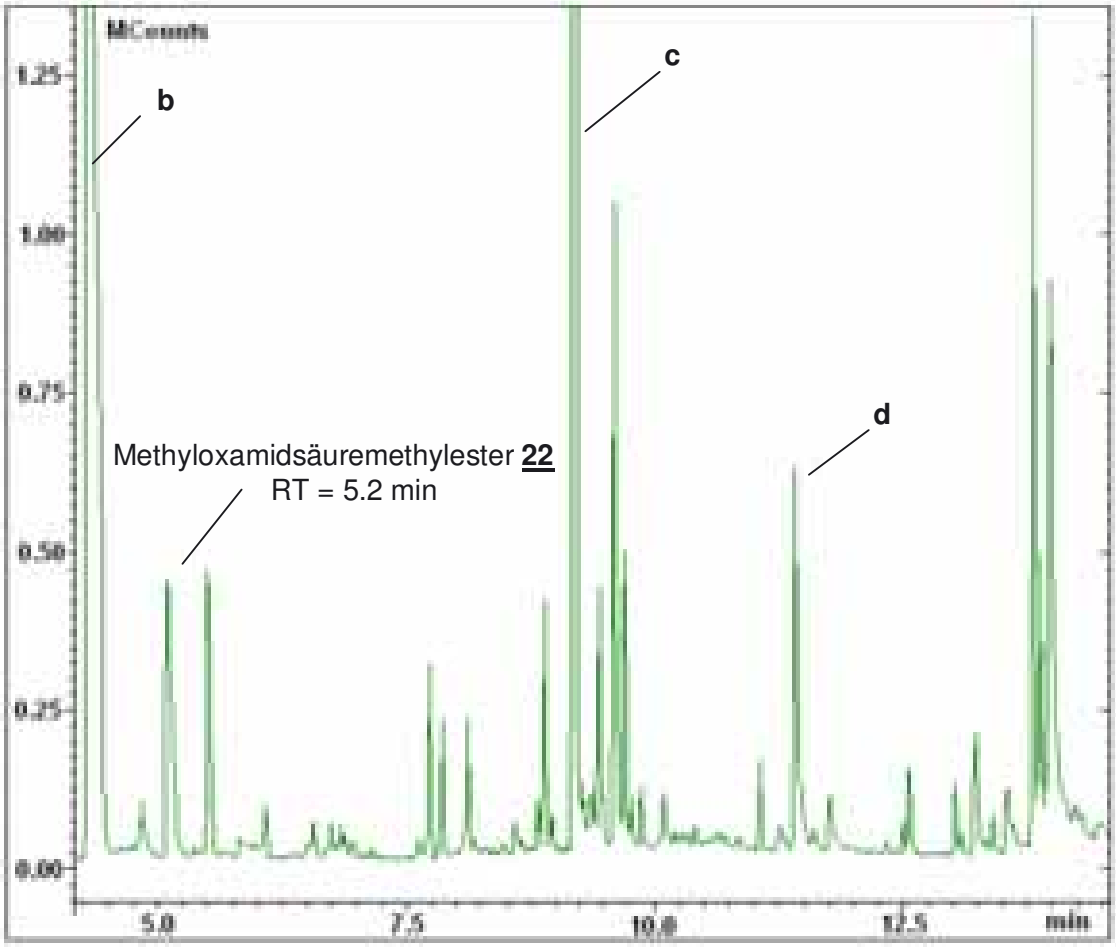


Abbildung 33: Identifizierung von **22** in einer Blindprobe mit Hilfe der GC-MS nach Zumischen von **9**

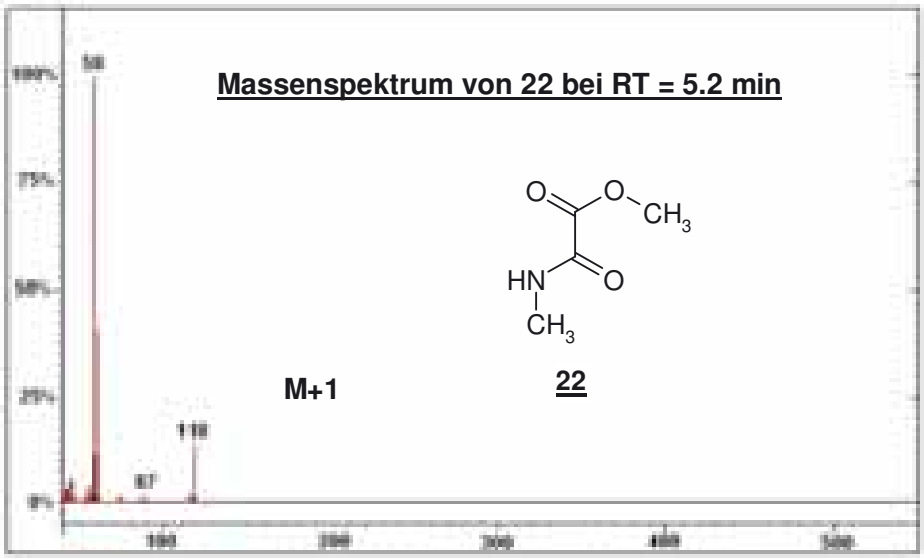


Abbildung 34: Massenspektrum bei 5.2 min

Abbildung 35 zeigt das Fragmentierungsmuster des Methyloxamidsäuremethylesters (**22**). Durch Spaltung der C-C-Bindung der Oxalsäurestruktur kommt es zur Bildung der charakteristischen Fragmenten m/z = 58, 59, 60.

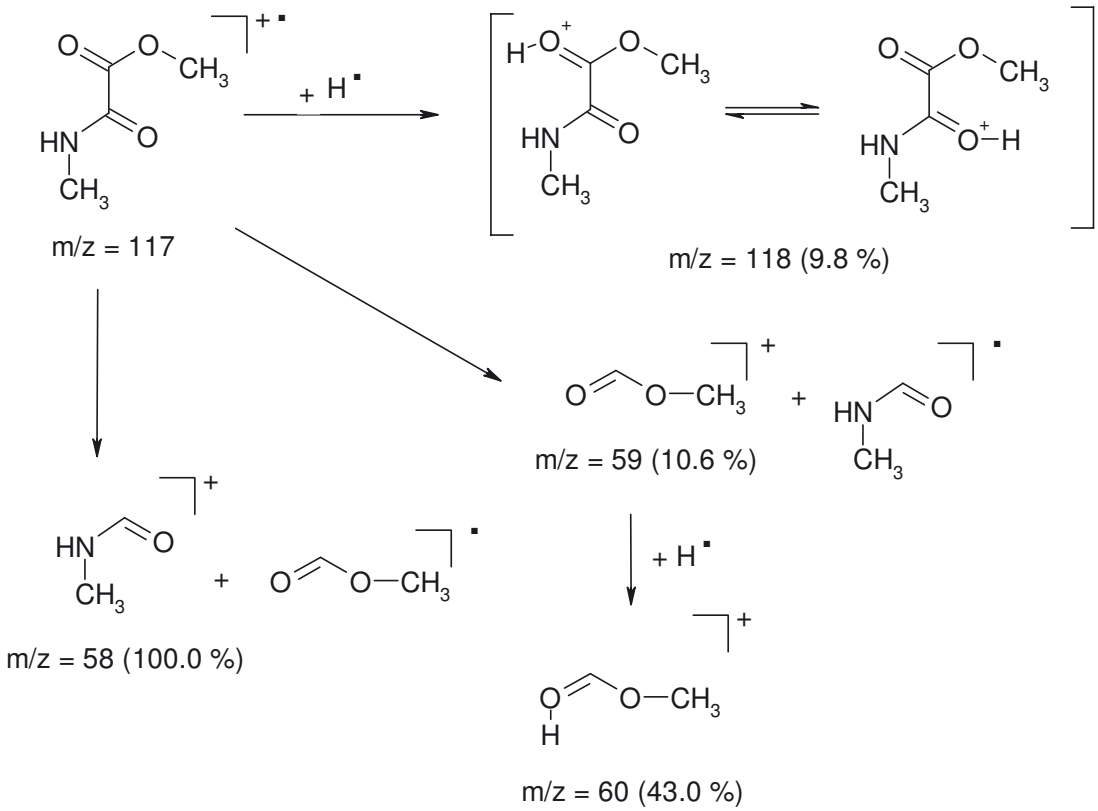


Abbildung 35: Fragmentierungsmuster von **22**

Nachteilig zu bewerten war eine Widerfindungsrate für **9** von nur 85 %. Wahrscheinlich war die bisher verwendete Menge an Elutionsmittel nicht ausreichend für die Isolierung aller Urinbestandteile, sondern lediglich geeignet zur Elution der Substanzmengen in weniger komplexen Modellversuchen. Deshalb wurde die Stoffmenge an Ameisensäure und Trifluoressigsäure im Verhältnis zum eingesetzten Probenvolumen erhöht und das benötigte Probenvolumen reduziert. Dadurch konnten nach Aufarbeitung einer weiteren mit **9** versetzten Urinprobe 100 % der Substanz im Trifluoressigsäureextrakt wieder gefunden werden.

Daraus ergab sich die in Abbildung 36 dargestellte verbesserte Methode zur Isolierung und Identifizierung von **9** (AAV 2, Kapitel 7.5), nach der alle nachfolgenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Durch Anwendung dieses Verfahrens ist eine optimale Analytik von **9** aus biologischem Probenmaterial gewährleistet.

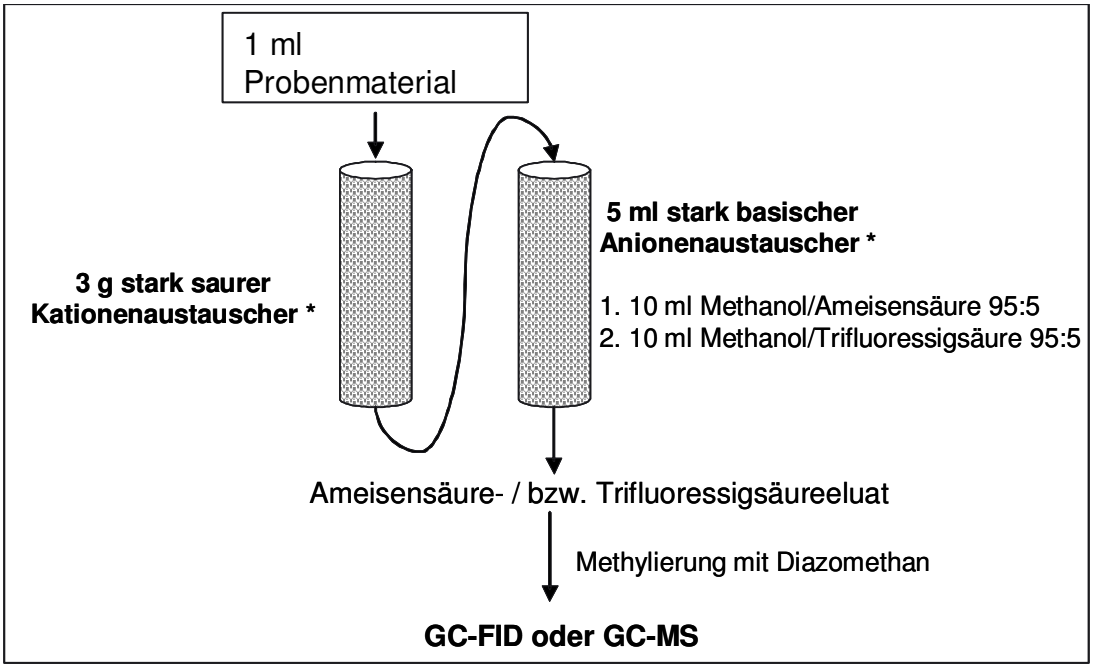


Abbildung 36: Analytik für **9** aus biologischem Probenmaterial (* Mengenangaben (g/ml) laut Hersteller)

3 METABOLISIERUNG DER METHYLOXAMIDSÄURE (9) IN DER RATTE

3.1 Bisheriger Erkenntnisstand zur Biotransformation der Methyloxamidsäure (9)

Die Methyloxamidsäure (**9**) konnte bis dato nicht als Metabolit des menschlichen Stoffwechsels identifiziert werden. Aus diesem Grund sind bis zur Anfertigung dieser Arbeit keine Studien zur Metabolisierung oder Toxizität von **9** im menschlichen Organismus durchgeführt worden. Es existieren lediglich Untersuchungen, die **9** als Metaboliten des Insektizids „Oxamyl“ (N-Methyl-N’,N’-dimethyl-N[(Methylcarbamoyl)oxy]-1-thiooxamimidat) bei Pflanzen und Nutztieren beschreiben. Diese Angaben beschränken sich neben in-vitro-Untersuchungen an Rattenleberzellen[65] sowie Mikroorganismen aus dem Verdauungstrakt von Wiederkäuern[66], auf zwei in-vivo-Studien. In einer dieser Studien wurde das Insektizid Ziegen verabreicht[67], in der anderen Untersuchung wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet[68]. Es fehlen also Untersuchungen zum Schicksal von **9** im Humanstoffwechsel und deshalb ist es bisher nicht bekannt, ob **9** als mögliches Abbauprodukt von Metamizol (**1**) im Humanstoffwechsel unverändert mit dem Urin ausgeschieden wird oder aber in nachfolgenden Stoffwechselreaktionen einer weiteren Metabolisierung unterliegt. Aus diesem Grund sollten im nächsten Schritt dieser Arbeit Erkenntnisse zur Metabolisierung der Methyloxamidsäure (**9**) gewonnen werden.

Da die Toxizität der Substanz bisher nicht beschrieben wurde, konnte eine Studie zur Metabolisierung von **9** nur in einem zu diesem Zweck genehmigten Tierexperiment durchgeführt werden, bei dem die Substanz peroral an Ratten verabreicht wurde. Obwohl Ratten einige Unterschiede gegenüber dem Humanstoffwechsel aufweisen, stellen sie ein akzeptiertes Modell zur Simulation der Biotransformation beim Menschen dar. Anschließend sollte der gesammelte Rattenurin auf die ausgeschiedene Menge an **9** untersucht werden.

---

[65] J. Jr. Harvey, J. C. Y. Han, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, *26*, 902 - 910

[66] I. J. Belasco, J. Jr. Harvey, *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, *28*, 689 - 692

[67] Y. Li, A. C. Barefoot, R. W. Reiser, A. F. Fogiel, P. J. Sabourin, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 962 - 966

[68] K.-M. Chang, C. O. Knowles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1979**, *8*, 499 - 508

3.2 Aufbau und Durchführung der Metabolisierungsstudie an der Ratte

Verwendet wurden Ratten der Rasse Wistar, die zu diesem Zweck in Stoffwechselkäfigen gehalten wurden. Da Methyloxamidsäure (**9**) ausgeprägte hydrophile Eigenschaften aufweist, wurde vermutet, dass sie ebenso wie Oxalsäure (**15**) vollständig über den Urin der Versuchstiere ausgeschieden wird und nicht in den Faeces erscheint. Die Haltung der Versuchstiere in Stoffwechselkäfigen ermöglichte eine nahezu vollständige Gewinnung des ausgeschiedenen Urins, sodass eine quantitative Aussage zu dieser Frage erwartet werden konnte.

Die pro Versuchstier zu verabreichende Menge an Methyloxamidsäure **9** wurde wie folgt ermittelt:

Setzt man den vollständigen Abbau von 1 g Metamizol-Natrium (**1**) (Mr = 333 g/mol) bei einem Probanden von ca. 70 kg Körpergewicht voraus, so entstehen daraus ca. 5 mg/kg von **9**, die eliminiert werden müssen.

Bei einem Gewicht der Versuchstiere von ca. 200 g ergab sich so eine Menge von einem Milligramm Methyloxamidsäure (**9**) pro Versuchstier. Sechs Ratten wurden in eine gleich große Verumgruppe und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Tiere der Verumgruppe erhielten eine wässrige Lösung von **9** per Schlundsonde appliziert, die Tiere der Kontrollgruppe hingegen nur Wasser.

Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von 48 Stunden in getrennten Stoffwechselkäfigen gehalten. Alle zwölf Stunden wurde der ausgeschieden Urin aus den Auffanggefäßen gewonnen und anschließend bei –20 °C in Polyethylengefäßen bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

3.2.1 Qualitative Analytik des Rattenurins

Die Extraktion erfolgte nach AAV 2 (Kapitel 7.5). Durch GC-MS-Analyse des methylierten Ameisensäure- bzw. Trifluoressigsäureextrakts (GC-System 2) konnte **22** als Methylester von **9** in mehreren Urinproben der Verumgruppe nachgewiesen werden (Tabelle 4). Abbildung 37 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem GC des Trifluoressigsäureextrakts zwölf Stunden nach Gabe von **9**. Durch das Massenspektrum des Peaks bei 5.2 min (Abbildung 34, S. 54) konnte **22** als der Methylester von **9** eindeutig identifiziert werden.

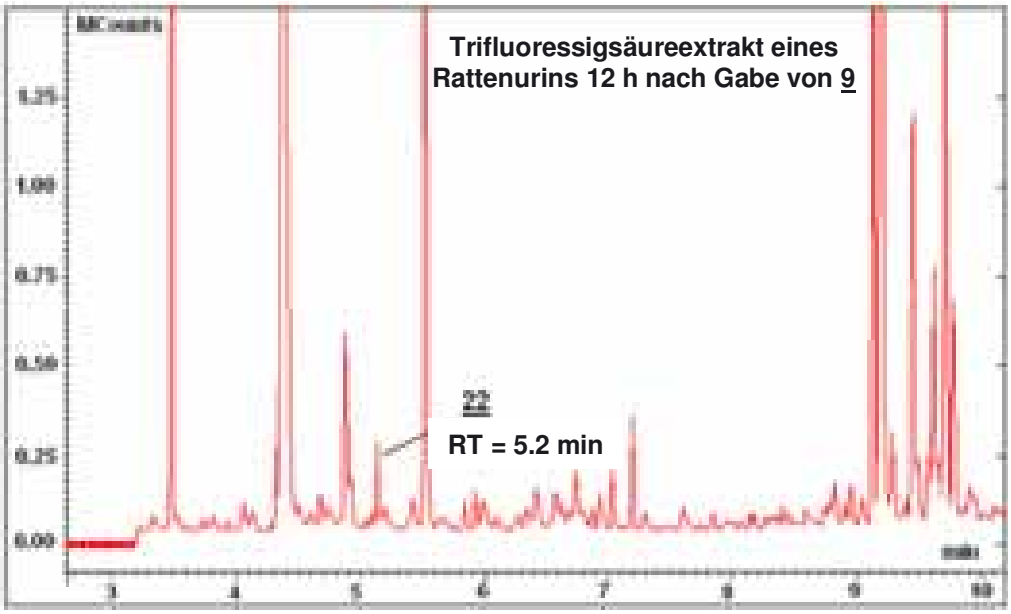


Abbildung 37: Ausschnitt aus dem GC des Trifluoressigsäureextrakts aus Rattenurin, 12 h nach Gabe von **9**

Erwartungsgemäß konnte in keiner Urinprobe der Kontrollgruppe die Methyloxamidsäure (**9**) nachgewiesen werden.

		Verumgruppe			Kontrollgruppe
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	
Zeitpunkt der Urinentnahme	12 h	+	+	+	-
	24 h	+	+	+	-
	36 h	-	-	(+)	-
	48 h	-	-	(+)	-

+ = **9** enthalten, **(+)** = **9** in Spuren enthalten, **-** = **9** nicht enthalten

Tabelle 4: Verteilung von **9** im Urin der Versuchstiere

Die Methyloxamidsäure (**9**) wird demzufolge nach peroraler Gabe vorwiegend innerhalb von 24 Stunden mit dem Urin eliminiert. Dieser qualitative Befund sollte anschließend auch quantitativ abgesichert werden.

3.2.2 Quantitative Analytik des Rattenurins

Die quantitative Untersuchung des Urins wurde mit einer GC-FID-Analyse (GC-System 1) vorgenommen. Untersucht wurden ausschließlich die Trifluoressigsäureextrakte aus dem Urin der Versuchstiere, da im Rahmen der

qualitativen GC-MS-Analyse nur sehr geringe Mengen an **22** (0 – 2 %) in den Ameisensäureextrakten identifiziert werden konnten.

3.2.2.1 Erstellung einer Eichgeraden von 22

Zuerst wurde der in den methylierten Extrakten zu erwartende Konzentrationsbereich von **22** ermittelt:

Unter der Annahme, dass die gesamte Menge an verabreichtem **9** in der Urinprobe nach 12 h erscheint, ergibt sich bei einem Volumen der Probe von ca. 15 ml eine maximale Konzentration an **22** von 75 ng/µl. Dementsprechend wurden fünf methanolische Vergleichslösungen des Methyloxamidsäure-methylesters (**22**) hergestellt und jede Probe dreimal mit GC-System 1 analysiert. Hierbei zeigte sich erneut, dass nur eine erniedrigte Injektortemperatur (vgl. Untersuchung von Oxalsäuredimethylester (**24**), Kapitel 2.4.1.1, S. 53) eine quantitative Bestimmung des Methylesters **22** gewährleistet.

Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen der verwendeten Lösungen sowie die gemittelte Peakfläche nach jeweils drei Injektionen.

Konzentration der Vergleichslösung von **22** in ng/µl	Mittelwert der Peakfläche nach drei Messungen
25	133153
40	285393
50	393049
75	557737
100	758229

Tabelle 5: Gemittelte Peakfläche der Vergleichslösungen von **22**

Diese Mittelwerte wurden gegen die Konzentration der Vergleichslösungen aufgetragen und mit Hilfe einer linearen Regression die folgende Eichgerade erstellt (Abbildung 38).

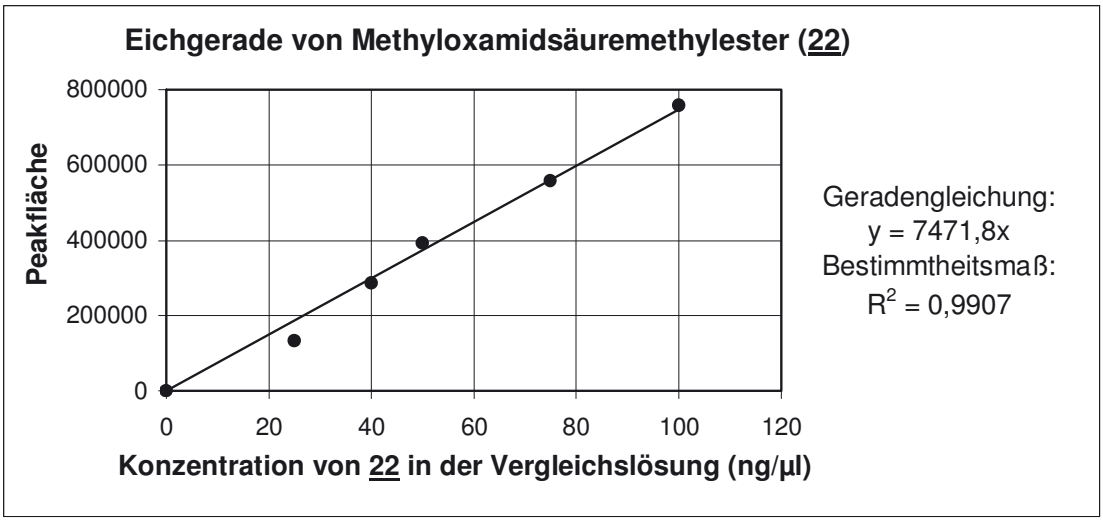


Abbildung 38: Eichgerade von **22**

Das Bestimmtheitsmaß der ermittelten Eichgerade von R^2 = 0.9907 belegt die sehr gute Korrelation der gemessenen Peakflächen mit den theoretischen Werten der Eichgeraden.

3.2.2.2 Ermittlung der Konzentration von 22 im Rattenurin

Die getrennt gesammelten Urinproben der drei Versuchstiere (12 h bzw. 24 h nach Applikation von **9**) wurden nach der beschriebenen Aufarbeitung mit dem GC-System 1 analysiert (jeweils n=3). Die 36 h bzw. 48 h Stunden-Proben wurden wegen des geringen Gehaltes an **9** nicht weiter untersucht. Aus dem Mittelwert der Peakflächen wurde mit Hilfe der Geradengleichung der Eichgeraden die Konzentration an **22** in der jeweiligen Probe berechnet.

Ergebnis:

Tabelle 6 zeigt die berechneten Konzentrationen von **22** in den Trifluoressigsäureextrakten. Mit Hilfe des Volumens der einzelnen Proben konnte die enthaltene Menge an **22** und dadurch die prozentuale Widerfindungsrate für **9** berechnet werden.

	Urin nach 12 Stunden		
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Mittelwert der gemessenen Peakfläche	441129	232053	423551
Konzentration von **22** in ng/µl	59,04	31,06	56,69
Volumen Urinprobe in ml	14 ml	14 ml	14,2 ml
Wiederfindungsrate von **9** in %	**82,7**	**43,5**	**80,5**

	Urin nach 24 Stunden		
	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3
Mittelwert der gemessenen Peakfläche	50351	63856	29827
Konzentration von **22** in ng/µl	6,74	8,55	3,99
Volumen Urinprobe in ml	15,8 ml	18,5 ml	18 ml
Wiederfindungsrate von **9** in %	**10,6**	**15,8**	**7,2**

Tabelle 6: Wiederfindungsrate von **9** in den Trifluoressigsäureextrakten des Rattenurins

Bei Ratte 1 und Ratte 3 erscheinen rund 90 % der verabreichten Menge an Methyloxamidsäure (**9**) innerhalb von 24 Stunden im Urin. Da jedoch immer ein Rest des Probenmaterials am Gitter und am „Abflusssystem“ der Stoffwechselkäfige zurückbleibt, kann von einer praktisch vollständigen Ausscheidung von **9** im Urin der Ratten ausgegangen werden.

Dagegen erscheinen bei Ratte 2 innerhalb dieses Zeitraums nur ca. 60 % von **9** im Urin. Eine wiederholte Aufarbeitung des Probenmaterials bestätigte dieses Ergebnis. Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren konnten diese Zahlen nicht weiterführend interpretiert werden und wurden deshalb bei der Beurteilung der quantitativen Analytik des Rattenurins nicht berücksichtigt.

3.3 Interpretation des Rattenexperiments für die Analytik von 9 im Humanurin

Die Ergebnisse der Tierversuche zeigen, dass **9** nach oraler Applikation unverändert und praktisch vollständig im Urin der Ratten erscheint. Überträgt man diese Ergebnisse auf den Humanstoffwechsel, so ist der Rückschluss erlaubt, dass **9** mit der entwickelten Methode im Urin nachgewiesen werden kann, falls sie bei der Biotransformation von Metamizol (**1**) tatsächlich entsteht.

4 METABOLISIERUNG VON METAMIZOL (1) IM BEBRÜTETEN HÜHNEREI

4.1 Das bebrütete Hühnerei als Modell zur Untersuchung von Stoffwechselreaktionen

Um die Toxizität, Teratogenität und Metabolisierung von Arzneistoffen zu untersuchen, werden heute neben Tierversuchen zahlreiche alternative Verfahren angewendet (z. B. isolierte Leberzellen, Enzymassays, etc.).

Der Vogelembryo wird bereits seit über 100 Jahren als teratologisches Modell in Medizin und Biologie verwendet[69]. Auf diese Weise wurde 1962 die teratogene Wirkung von Thalidomid bestätigt[70]. Als ein weiteres Beispiel ist die Untersuchung von Aciclovir zu nennen, welche ebenfalls eine teratogene Wirkung der Substanz auf den Vogelembryo belegte[71]. Mittlerweile existiert ein standardisiertes Test-Verfahren, genannt HET (Hühnerei-Test), welches je nach Ansatz Informationen zur Teratogenität, Retardierung und Toxizität einer Substanz liefert[72]. Anwendung fand dieses Verfahren beispielsweise in der Bestimmung der Toxizität von Gingko biloba-Extrakten mit unterschiedlichem Gehalt an Gingkolsäuren[73].

Die lokale Reizwirkung von Substanzen kann mittlerweile ebenfalls am bebrüteten Hühnerei getestet werden. Hier wird der HET-CAM-Test (Hühnerei-Test an der Chorioallantois-Membran (Abbildung 41) mittlerweile als wichtige Alternative zum Draize-Test (Bestimmung der Reizwirkung einer Substanz am Kaninchenauge) eingesetzt[74].

Die Tauglichkeit des bebrüteten Hühnereis als Modell für die Metabolisierung von Arzneistoffen ist dagegen erst in den letzten 10 – 15 Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

4.1.1 Biotransformation im Hühnerembryo

Im Gegensatz zum Säugetier fehlt dem Hühnerembryo während der Embryogenese die Verbindung zum Muttertier. Deshalb besitzt er nach wenigen Tagen eigene Mechanismen zur Metabolisierung von endogenen Substanzen.

---

[69] L. Gerlach, *Anat. Anz.*, **1887**, 2, 583 - 609

[70] F. Kemper, *Arzneim.-Forsch.*, **1963**, *13*, 191 - 194

[71] B. Heinrich-Hirsch, D. Neubert, *Arch. Toxicol.*, **1991**, *65*, 402 - 408

[72] N.-P. Lüpke, *Ärztl. Kosmetolog.*, **1987**, *17*, 13 - 30

[73] G. Baron-Ruppert, N.-P., Lüpke, *Phytomedicine*, **2001**, *8*, 133 - 138

Bereits am 1. Bruttag erfolgt die Anlage der Leber, die bis zum 8. Bruttag weitestgehend abgeschlossen ist[75]. Hier konnten bereits mehrere Cytochrom-P-450-abhängige Enzymfamilien identifiziert werden, die eine Metabolisierung von Arzneistoffen ermöglichen (CYP 1A-Unterfamilie, CYP 2-Familie, Übersicht der Literatur[76]). Die embryonalen Nierenexkrete werden in eine Art Harnsack, den so genannten Allantoissack geleitet[77] (Abbildung 41). Dieser wird bis zum 14. Bruttag mit einem Exkretionsmedium, der Allantoisflüssigkeit (AF) gefüllt, in der sich ein großer Teil der Stoffwechselprodukte des Embryos befinden. Durch eine Extraktion der AF aus dem Hühnerei nach Beendigung der Inkubation kann das Metabolitenspektrum eines Fremdstoffs analysiert werden. Auf diese Weise können neben *in-vitro*-Untersuchungen an isolierten Leberpräparaten und Hepatozyten des Embryos, auch *in-ovo*-Untersuchungen (auch als *ex-vivo*-Untersuchungen bezeichnet) zum Metabolismus von Xenobiotika durchgeführt werden.

Die Vorteile des bebrüteten Hühnereis als Metabolisierungsmodell gegenüber dem „klassischen Tierversuch“ können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Fertile Eier sind preiswert erhältlich und lassen sich ohne großen Aufwand bebrüten.
2. Das Ei ist ein abgeschlossenes biologisches System. Es steht lediglich durch Gas- und Feuchtigkeitsaustausch mit der Außenwelt in Verbindung.
3. Nicht gasförmige Stoffwechselprodukte werden im Ei angereichert, was besonders für Metabolisierungsuntersuchungen von Vorteil ist.
4. Die Schmerz- und Empfindungswahrnehmung der Hühnerembryos erfolgt frühestens nach elf Tagen Brutdauer (Gesamtbrutdauer 21 Tage).

---

[74] B. Rusche [Hrsg.], *Tierversuche - Alternativen*, **1989**, Akademie für Tierschutz <Neubiberg>

[75] M. R. Juchau, Q. P. Lee, A. G. Fantel, *Drug Metab. Rev.*, **1992**, *24*, 195 - 238

[76] M. Neugebauer, *Biotransformation von Arzneistoffen im bebrüteten Hühnerei - Eine Alternative zum Tierversuch,* Habilitation, **1997**, Bonn

[77] K.-H. Scharf, W. Weber, *Fortpflanzung und Entwicklung*, **1990**, Schroedel Schulbuch Verlag, Hannover, 49

5. Versuche mit bebrüteten Hühnereiern werden in Deutschland nicht als Tierversuche angesehen und bedürfen deshalb keiner Genehmigung. In Großbritannien sind solche Versuche ab dem zwölften Tag genehmigungspflichtig.
6. Die im bebrüteten Hühnerei gefundenen Metaboliten entsprechen häufig den in anderen Spezies nachgewiesenen Stoffwechselprodukten.

Die Tauglichkeit dieses Stoffwechselmodells für die Untersuchung der Metabolisierung von Arzneistoffen wurde in den letzten Jahren in mehreren Arbeiten überprüft. So applizierte Kiep Natriumsalicylat ins Hühnerei, um Toxizität und Metabolisierung der Substanz zu überprüfen[78]. Das Metabolitenspektrum entsprach qualitativ im wesentlich dem der Säugetierspezies. Die Konjugation der Metaboliten unterschied sich allerdings von der Konjugatbildung beim Menschen. So kommt es beim Hühnerembryo beispielsweise zur Konjugation aromatischer Säuren mit Ornithin.

Neugebauer identifizierte die Metaboliten verschiedener Arzneistoffe aus bebrüteten Hühnereiern[76]. Die verwendeten Arzneistoffe wurden aufgrund ihrer oxidativen Metabolisierung untersucht und die gebildeten Metaboliten mit den in der Literatur beschriebenen Metabolisierungswegen anderer Spezies verglichen. Für Antipyrin konnte auf diese Weise ein bis dahin unbekannter Metabolit aus dem Hühnerei isoliert und danach ebenfalls beim Menschen identifiziert werden. Neugebauer kam zu dem Ergebnis, dass das embryonierte Hühnerei ein geeignetes Modell zur Aufklärung von Metabolisierungsreaktionen darstellt, mit dem auch komplexe Biotransformationsreaktionen simuliert werden können.

Nachteilig ist die schwierige Bilanzierung der Metabolisierungsreaktionen. Zwar akkumulieren die Metaboliten im Ei, allerdings ist eine quantitative Bestimmung aufgrund der Verteilung des Arzneistoffs und der gebildeten Abbauprodukte in verschiedene Kompartimente sehr aufwändig. Außerdem gibt es bislang kein standardisiertes Verfahren zur Bearbeitung der bebrüteten Eier, welches eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus mehreren Untersuchungen gewährleisten würde. Die Injektion des Arzneistoffs kann zwar in nahezu alle Kompartimente

---

[78] L. Kiep, H. Bekemeier, *Pharmazie*, **1986**, *41*, 868 - 872

des Hühnereis erfolgen, allerdings differieren die Ergebnisse in Abhängigkeit von Ort und Zeitpunkt der Applikation[78].

4.2 Literaturbefund zum Metabolismus von Metamizol (1) im bebrüteten Hühnerei

Kiep et al. untersuchten 2002 die Metabolisierung von **1** im bebrüteten Hühnerei und stellten fest, dass dieses Modell für die Simulation der Biotransformation von **1** im Humanstoffwechsel geeignet ist[79]. Abbildung 39 zeigt die Metaboliten, die im Hühnerei nach Inokulation von **1** mit Hilfe der GC-MS identifiziert werden konnten. Genau wie beim Menschen entstehen im Hühnerei die Stoffwechselprodukte **2**, **3**, **5** und **6** (Kapitel 1.4.1, S.17). Im Gegensatz zum Humanstoffwechsel konnte 4-Aminoantipyrin (**3**) nicht in freier Form isoliert werden, da es durch eine sehr rasche Acetylierung zur Bildung von 4-Acetylaminoantipyrin (**5**) kommt. Zusätzlich konnten die Verbindungen **I** – **IV** nachgewiesen werden. Verbindung **I** ist bereits bekannt als Metabolit des 4-Dimethylaminoantipyrins[34] und wurde nur einmal als Metabolit von **1** beschrieben[43]. Darüber hinaus wurde Verbindung **II** erstmalig als Metabolit von **1** identifiziert. Ob diese Verbindung allerdings auch im Humanstoffwechsel als Metabolit von **1** entsteht, ist bisher nicht geklärt. Durch Applikation von Verbindung **I** an bebrütete Hühnereier konnte Kiep zeigen, dass **II** vermutlich durch eine Hydroxylierung der Acetamidofunktion direkt aus **I** entsteht. Die Verbindungen **III** und **IV** hingegen erwiesen sich lediglich als „Artefakte“ von **II**.

[79] L. Kiep, S. Maderner, K. Seifert, *Pharmazie*, **2002**, *57*, 829 - 833

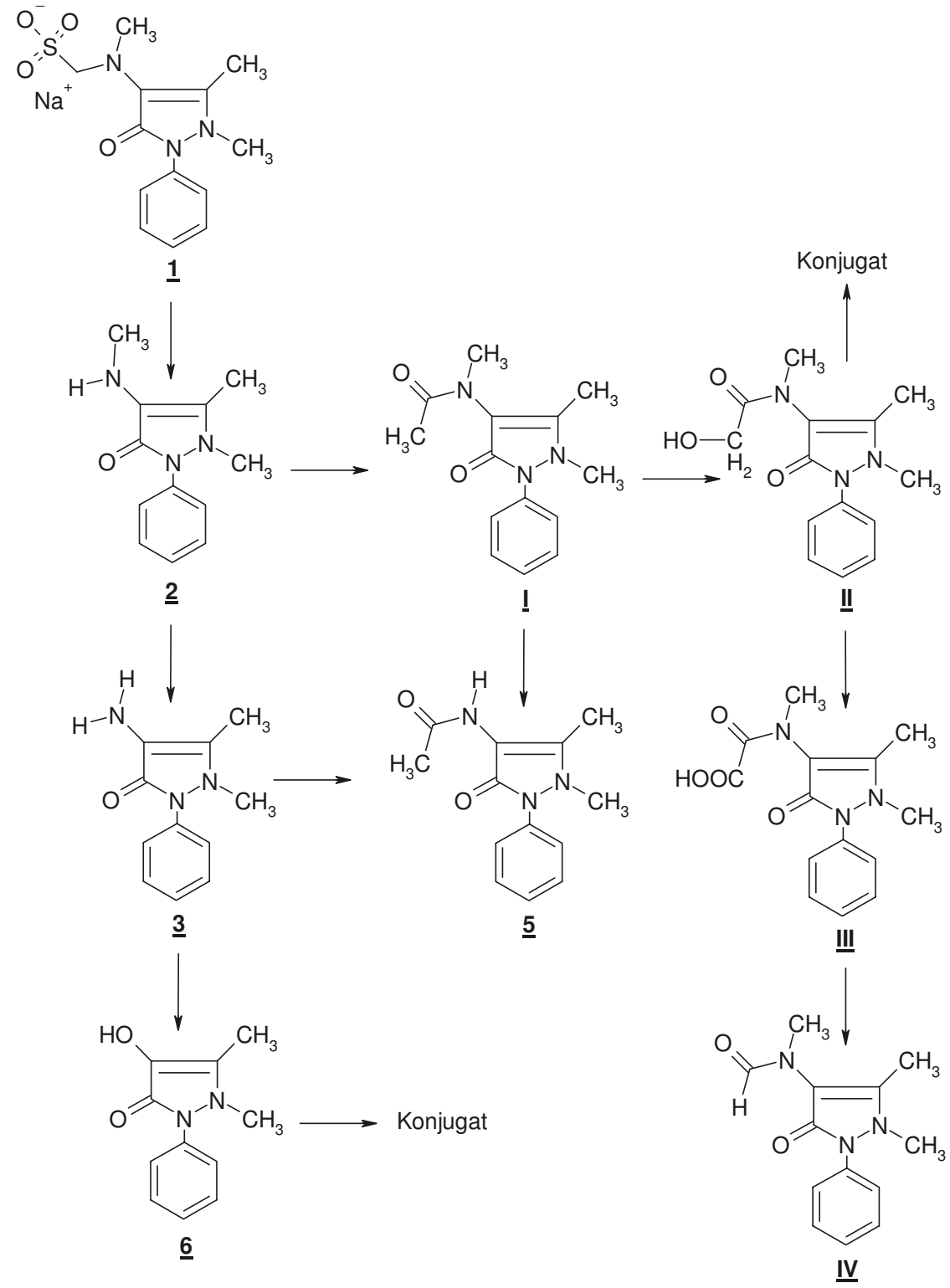


Abbildung 39: Metabolisierung von **1** im bebrüteten Hühnerei nach Kiep et al.[79]

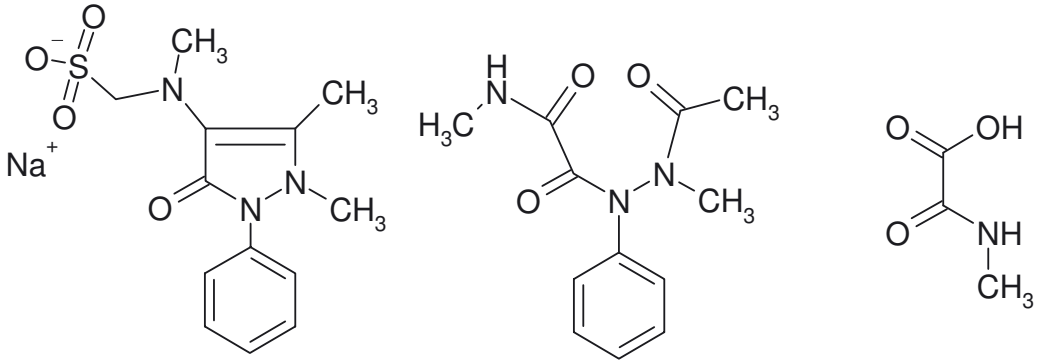
Insgesamt unterschied sich das Spektrum der identifizierten Metaboliten nicht wesentlich von denen des Humanstoffwechsels.

Kiep bewertete deshalb das bebrütete Hühnerei als ein geeignetes Modell zur Simulation der Biotransformation im Humanstoffwechsel. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass auch alle in dieser Untersuchung identifizierten Metaboliten einen intakten Pyrazolinonring aufweisen. Wiederum konnten keine Verbindungen mit geöffnetem Heterocyclus nachgewiesen werden.

4.3 Eigene Untersuchungen zum Metabolismus von 1 am bebrüteten Hühnerei

4.3.1 Zielsetzung

Wegen der weitgehenden Übereinstimmung der Metabolisierung von Metamizol (**1**) im Humanstoffwechsel und im bebrüteten Hühnerei, war es von großem Interesse, ob die Methyloxamidsäure (**9**) als Metabolit von **1** in diesem *ex-vivo*-Modell gebildet wird. Da das Hühnerei die Inokulation größerer Mengen Metamizol (**1**) (bis zu 32 mg pro Ei[79]) ohne Schaden übersteht, lassen sich höhere Konzentrationen der Metaboliten in der Allantoisflüssigkeit (AF) im Vergleich zum Humanurin erzielen. Neben **1** sollte auch das Oxamazid **7** inokuliert werden, um so die Entstehung von **9** aus dieser Vorstufe zu überprüfen. Zusätzlich erfolgte die direkte Applikation von **9** in die Hühnereier, um zu testen, ob die Substanz nach der Bebrütung noch identifiziert werden kann oder ob sie weiter abgebaut wird (Abbildung 40). Der Nachweis der Metaboliten sollte aus der AF des Hühnerembryos erfolgen. Diese kann problemlos aus dem Ei gewonnen und mit der gleichen Methode wie eine Urinprobe aufgearbeitet werden (Kapitel 2.3.4, S. 50). Zusätzlich zur Analytik von **9** sollte eine Flüssig-flüssig-Extraktion der AF zur Isolierung lipophiler Metaboliten durchgeführt werden.



1 **7** **9**

Abbildung 40: Substanzen, deren Metabolismus im bebrüteten Hühnerei untersucht wurde

4.3.2 Versuchsdurchführung

4.3.2.1 Inokulationsbedingungen und Bebrütung der Hühnereier

Die fertilen Bruteier wurden am Ablagetag vom Zuchtbetrieb erworben und bis zur Bebrütung zwischen 10 und 15 °C gelagert. Es wurden ausschließlich weiße Eier (Hühnerrasse Shaver Star-Cross) verwendet, um ein Durchleuten (Schieren) der Embryonen zu ermöglichen und damit ihren Entwicklungsfortschritt beobachten zu können. Die Inokulation der Substanzen erfolgte vor Brutbeginn, da zu diesem Zeitpunkt die Empfindlichkeit des Hühnereis gegenüber Fremdstoffen geringer ist, als beispielsweise am 6. Bruttag[71,72,76]. Die Applikation erfolgte ins Eiklar, da hydrophile Verbindungen sich hier gleichmäßig verteilen und anschließend in den Embryo gelangen. Zu diesem Zweck wurde ein Loch mit ca. 2 mm Durchmesser seitlich des spitzen Eipols gebohrt. Anschließend erfolgte die Applikation der Substanzen (5 oder 10 mg von **1**, **7** oder **9**, gelöst in Wasser für Injektionszwecke) jeweils in ein Kollektiv von elf Eiern. Zusätzlich wurde ein Kontrollkollektiv von elf Eiern ohne Applikation einer Substanz inkubiert. Das Bohrloch wurde umgehend mit Spachtelmasse verschlossen. Die Eier wurden bei einer Temperatur von 38.0 °C (± 0.5 °C) und einer Luftfeuchtigkeit von 64 % (± 5 %) in einer Bebrütungsanlage bebrütet und alle drei Stunden gewendet. Abbildung 41 zeigt einen schematischen Längsschnitt durch ein bebrütetes Hühnerei nach ca. 11 Bruttagen.

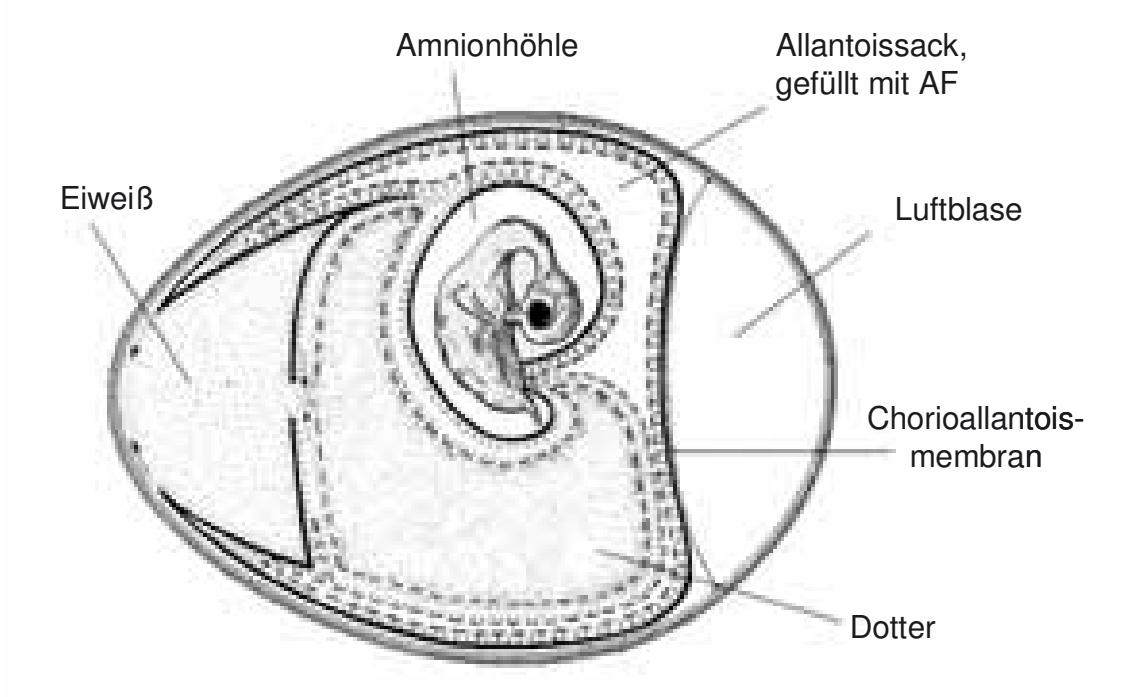


Abbildung 41: Schematischer Längsschnitt durch das Hühnerei zwischen dem 10. und 12.Bruttag[80], modifiziert

[80] A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, *Virologische Arbeitsmethoden*, **1974**, *Band I* Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 381

Am 5. und 11. Bruttag und vor Entnahme der Allantoisflüssigkeit erfolgte eine Schierkontrolle der Eier, bei der nicht befruchtete, abgestorbene, bzw. nicht entwickelte Exemplare aussortiert wurden. Die Brutdauer betrug für jede Substanz jeweils 11 und 15 Tage. Daraus ergaben sich die in Tabelle 7 dargestellten 14 Chargen an Versuchseiern

Substanz	Substanzmenge in mg	Brutdauer in Tagen	Chargennummer
1	5	11	1
		15	2
	10	11	3
		15	4
7	5	11	5
		15	6
	10	11	7
		15	8
9	5	11	9
		15	10
	10	11	11
		15	12
Blindversuch	-	11	13
		15	14

Tabelle 7: Einteilung der präparierten Hühnereier nach Substanzmenge und Brutdauer

Nach Beendigung der Brutdauer wurden die Eier für 30 min bei -20 °C tiefgefroren. Danach wurden sie am stumpfen Eipol über der Luftblase geöffnet und die Eihaut mit wenig Wasser befeuchtet. Dadurch ließ sich diese anschließend mit einer Pinzette entfernen. Die Chorioallantois-Membran wurde mit einer Injektionsspritze durchstochen und die darunter liegende AF abgesaugt. Diese wurde anschließend zentrifugiert und bis zur Aufarbeitung bei – 20 °C tiefgefroren.

Bei der Durchführung der Versuche wurden folgende Daten protokolliert:

1. Einzelgewicht der Bruteier vor Brutbeginn
2. Applizierte Substanz und Dosis
3. Einmal täglich: Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Brutschrank
4. Ergebnis der Schierkontrolle am 5. und 11. Bruttag
5. Volumen der extrahierten AF pro Ei
6. Mittelwert der AF-Volumina pro Charge

4.3.2.2 Aufarbeitung der Allantoisflüssigkeit

1. Extraktion und Derivatisierung der Säurefraktion (Isolierung von 9)

Jeweils 1.0 ml der AF wurde mit der Extraktionsmethode für **9** mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (AAV 2, S.136) aufgearbeitet. Zusätzlich wurden 10 ml AF von Charge 1 (5 mg **1**, 11 Bruttage) mit HCl hydrolysiert, um mögliche Konjugate zu spalten. Anschließend erfolgte auch hier eine Aufarbeitung des Probenmaterials nach AAV 2.

2. Flüssig-flüssig-Extraktion der lipophilen Metaboliten

Die Aufarbeitung erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Tarbah et al[81] (AAV 3, S.136). 0.7 ml der AF wurden jeweils bei pH = 8 – 9 und pH = 3 – 4 mit Dichlormethan/Diethylether 7:3 extrahiert. Diese Extraktion wurde ebenfalls aus der hydrolysierten AF von Charge 1 vorgenommen.

4.3.2.3 Gaschromatographische Untersuchung der Extrakte

Alle Extrakte wurden mit Hilfe der GC-MS untersucht (GC-Systeme 2 und 3).

[81] F. A. Tarbah, Th. Daldrup, *Medicina Legalis Baltica*, **1997**, *8*, 123 - 127

4.3.3 Ergebnisse

4.3.3.1 Einfluss von 1, 7 und 9 auf die Entwicklung der Hühnerembryonen

Tabelle 8 zeigt die Anzahl der extrahierbaren Eier nach Beendigung der Brutdauer, sowie das Gesamtvolumen der extrahierten AF pro Charge.

Substanz	Chargennummer	Anzahl der extrahierbaren Eier	Σ AF in ml
1	1	6	47,8
	2	7	75,5
	3	2	7,8
	4	3	34,9
7	5	1	3,6
	6	1	12,2
	7	2	5,5
	8	0	-
9	9	11	114,3
	10	10	100,0
	11	7	68,8
	12	10	99.4
Blindversuch	13	10	90,4
	14	10	88,2

Tabelle 8: Anzahl der extrahierbaren Hühnereier incl. des Volumens der entnommenen AF

Die Kontrollchargen (Charge 13 und 14) zeigten eine normale Entwicklung der Hühnerembryonen. Hier konnten nach Beendigung des Versuchs jeweils 10 der 11 Eier extrahiert werden.

Nach Applikation des Oxalsäurehydrazids **7** (Chargen 5 – 8) waren bis zum 5. Bruttag bereits 80 % der Eier nicht entwickelt, bzw. abgestorben. Nach

Beendigung der Bebrütung standen lediglich 0 – 2 Eier aus diesen Kollektiven für eine Extraktion der AF zur Verfügung. Diese Tatsache lässt auf eine toxische Wirkung von **7** auf den Hühnerembryo schließen. Eine genauere Untersuchung der Toxizität, beispielsweise die Bestimmung des LD_{50}-Wertes wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

Die Applikation von Metamizol (**1**) (Chargen 1 – 4) erzeugte ebenfalls eine größere Unverträglichkeit der Substanz als erwartet. Laut Kiep können bis zu 32 mg **1** pro Ei appliziert werden, ohne dass die Überlebensfähigkeit der Hühnerembryonen beeinträchtigt wird[79]. In unseren Versuchen hingegen bewirkten bereits 5 mg eine Sterberate der Hühnerembryonen von 37 bzw. 45 %. Nach der Applikation von 10 mg lag der Anteil der extrahierbaren Eier sogar nur bei 18 bzw. 27 %. Anders als in dieser Arbeit applizierte Kiep die Substanz erst am 6. Bruttag ins Hühnerei und wählte als Applikationsort den Eidotter. Aufgrund der unterschiedlichen Inokulationsbedingungen ist ein Vergleich der Daten zur Toxizität von **1** nicht möglich, da die Toxizität einer Substanz je nach Ort und Zeitpunkt der Inokulation stark variiert.

Die Applikation der Methyloxamidsäure (**9**) (Chargen 9 – 12) schien keinen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung der Hühnerembryonen zu haben.

4.3.3.2 Analytik der Methyloxamidsäure (9)

Die GC-MS Untersuchung (GC-System 2) der methylierten Trifluoressigsäure-extrakte lieferte folgende Ergebnisse:

Substanz	Chargen	9 enthalten?
1	1, 2 (5 mg)	**(+)**
	3, 4 (10 mg)	**+**
7	5 - 7	**+**
9	9 - 12	**+**
Blindversuche	13, 14	**-**

+ = **9** enthalten, **(+)** = **9** in Spuren enthalten, **-** = **9** nicht enthalten

Tabelle 9: Verteilung von **9** in den bebrüteten Hühnereiern

1. Nach Inokulation von Methyloxamidsäure (9)

Erwartungsgemäß konnte die Methyloxamidsäure (**9**) aus der AF der vorbehandelten Eier extrahiert und qualitativ als Methylester **22** im Trifluoressigsäureextrakt detektiert werden (Abbildung 42 und Abbildung 43), wohingegen dieser in den Extrakten der Kontrollchargen 13 und 14 nicht enthalten war.

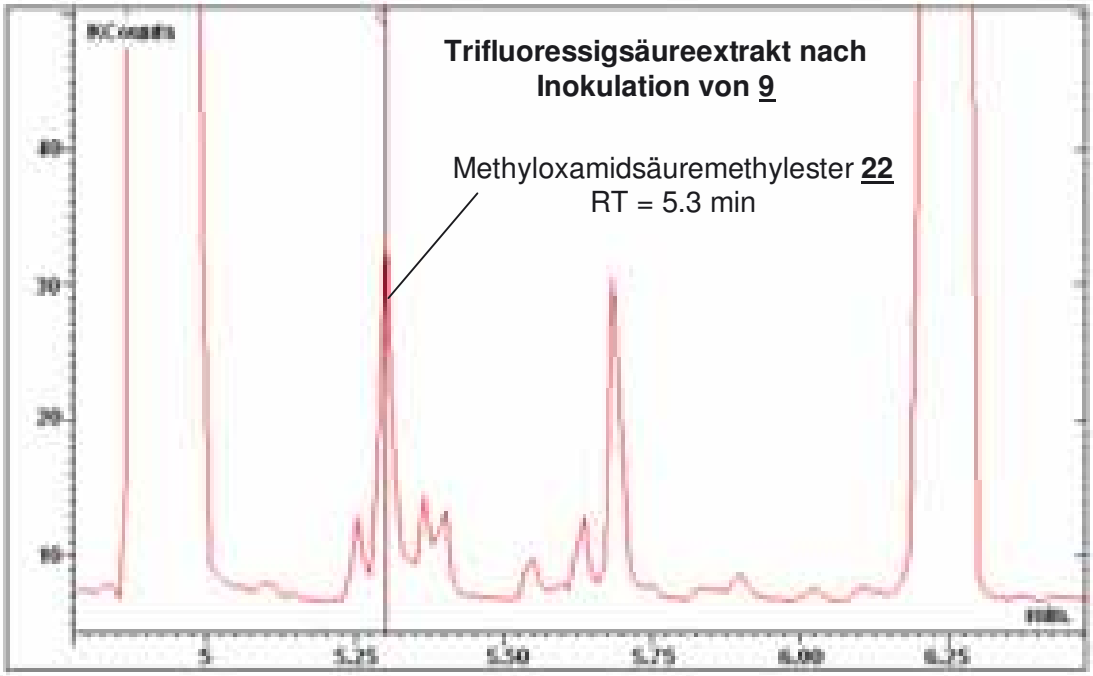


Abbildung 42: Ausschnitt aus dem GC des Trifluoressigsäureextrakts extrahiert aus Charge 11 (10 mg **9**, Brutdauer 11 Tage)

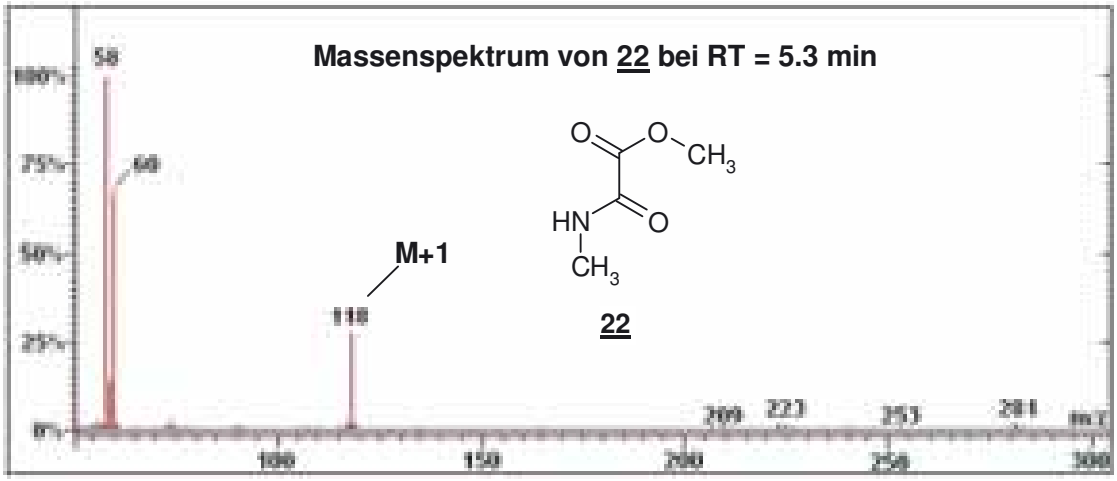


Abbildung 43: Massenspektrum bei 5.3 min

2. Nach Inokulation von Oxalsäurehydrazid 7

Nach Applikation des Oxalsäurehydrazids **7** erschien **22** ebenfalls im methylierten Trifluoressigsäureextrakt der Chargen 5 - 7, wodurch die Entstehung der Methyloxamidsäure (**9**) aus dieser Vorstufe *ex-vivo* bestätigt werden konnte. In Abbildung 44 ist neben der vollständigen Ionenspur des methylierten Trifluoressigsäureextrakts die Ionenspur zwischen m/z 58 und 118 dargestellt, um **22** aus dem Untergrund der Säurefraktion hervorzuheben.

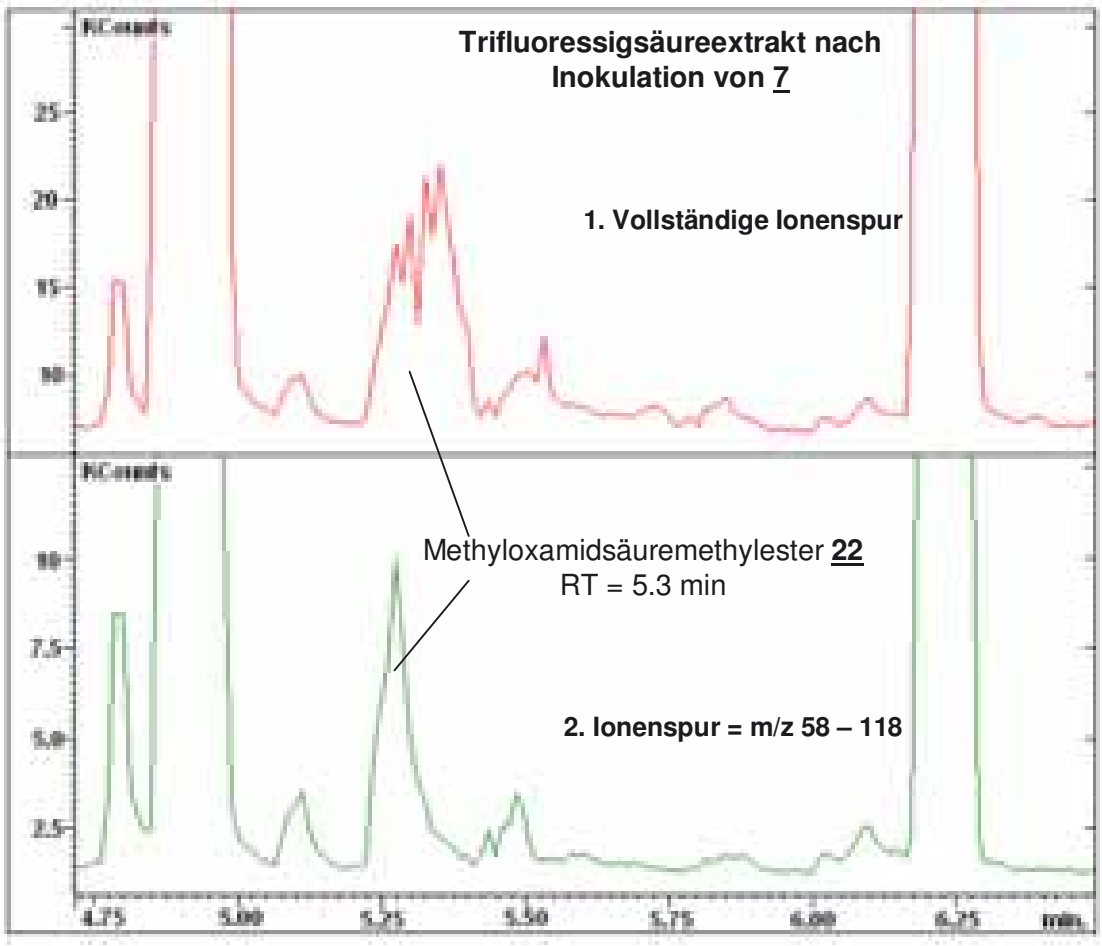


Abbildung 44: Ausschnitt aus dem GC des Trifluoressigsäureextrakts extrahiert aus Charge 7 (10 mg **7**, Brutdauer 11 Tage),1. Vollständige Ionenspur, 2. Ionenspur = m/z 58 – 118

3. Nach Inokulation von Metamizol (1)

Nach Applikation von 10 mg Metamizol (**1**) konnte **22** eindeutig nachgewiesen werden (Chargen 3 und 4). Abbildung 45 zeigt einen Ausschnitt aus dem Chromatogramm des Trifluoressigsäureextrakts von Charge 4. Durch Betrachtung der Ionenspur bei m/z 58 (Basepeak von **22**) ist der Methylester hier deutlich zu erkennen.

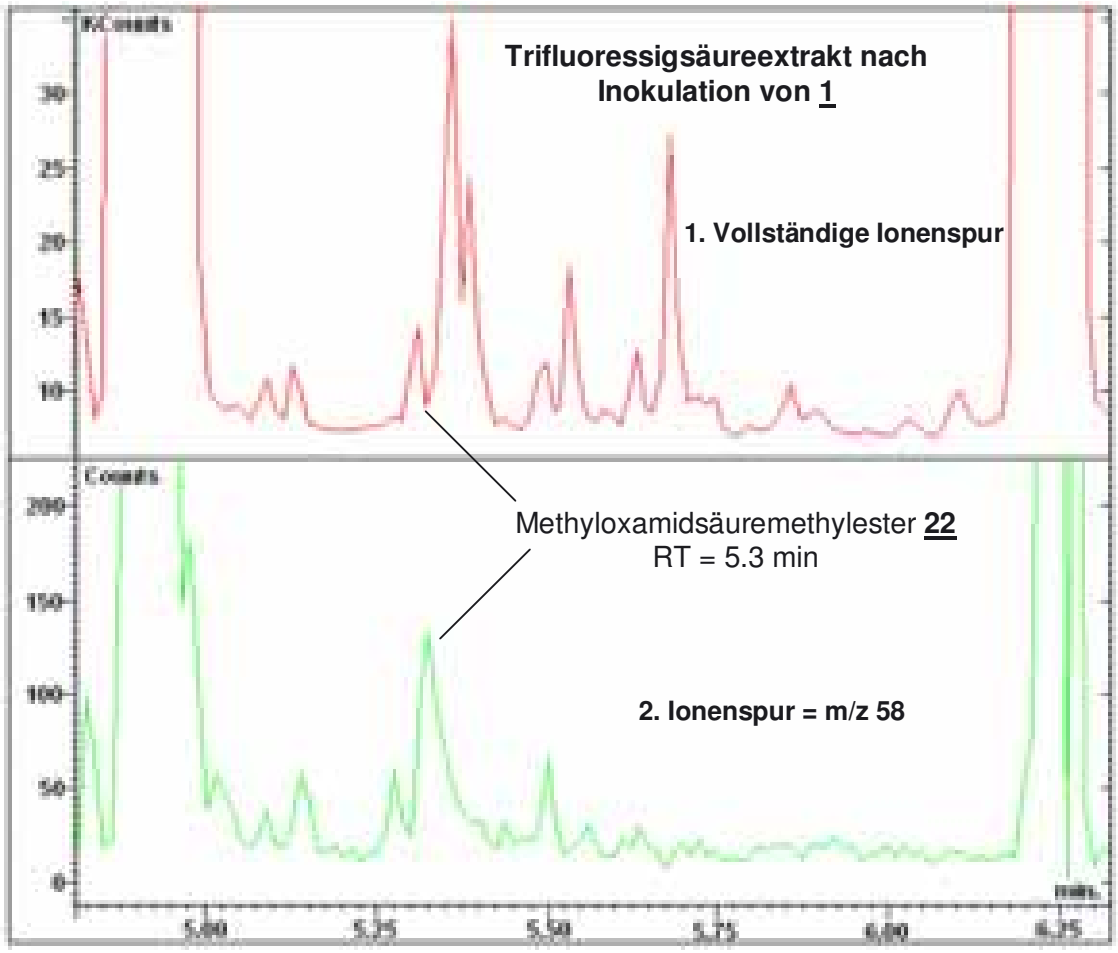


Abbildung 45: Ausschnitt aus dem GC des Trifluoressigsäureextrakts extrahiert aus Charge 4 (10 mg **1**, Brutdauer 15 Tage),1. Vollständige Ionenspur, 2. Ionenspur = m/z 58

Das zugehörige Massenspektrum (Abbildung 46) zeigt eine Überlagerung von **22** durch die natürlichen Bestandteile der Allantoisflüssigkeit (z. B. Fragmente 209, 223, 253, 281, siehe auch Abbildung 43). Trotzdem ist das typische Fragmentierungsmuster der Substanz (m/z 58, 59, 60) im Vergleich zum Blindversuch (Abbildung 47) unverkennbar enthalten. Der [M+1]-Peak bei m/z 118 ist aufgrund seiner geringen Intensität (ca. 10% des Fragments m/z = 58, siehe Massenspektrum von **22**, Abbildung 34) nicht zu erkennen.

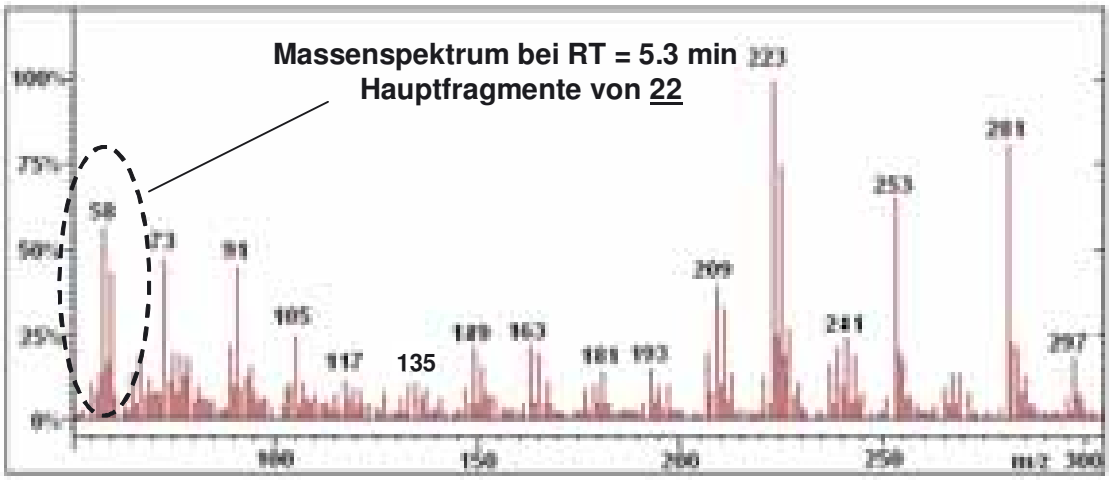


Abbildung 46: Massenspektrum bei 5.3 min, Charge 4 (10 mg 1, Brutdauer 15 Tage)

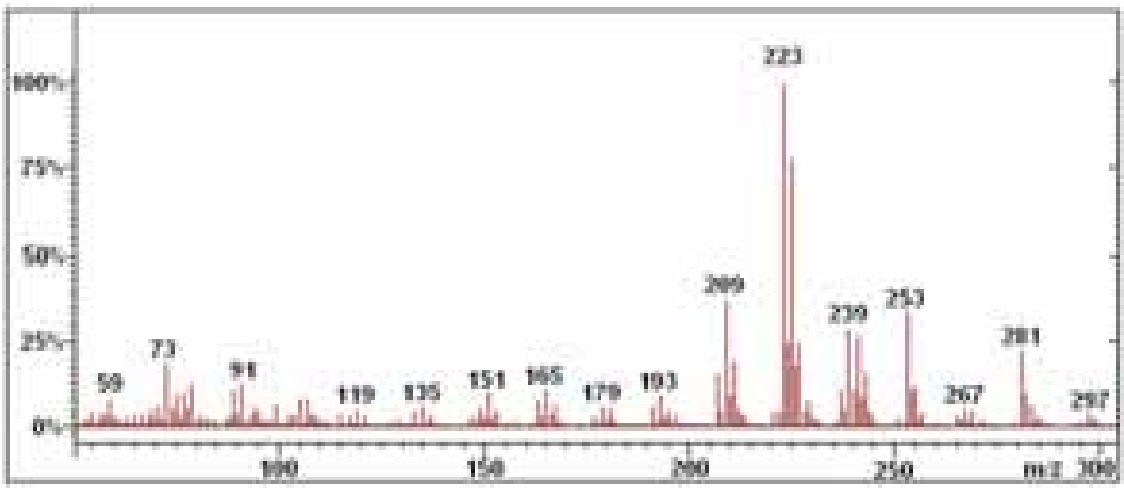


Abbildung 47: Massenspektrum bei 5.3 min, Charge 14 (Blindversuch, Brutdauer 15 Tage)

4.3.3.3 Analytik der lipophilen Metaboliten durch Flüssig-flüssig-Extraktion

1. Nach Inokulation von 7

In den mit 7 inokulierten Eiern war neben der bereits identifizierten Methyloxamidsäure (9) das zweite Hydrolysebruchstück der Oxalsäurehydrazidstruktur, das Acetohydrazid 8 zu erwarten. Bereits die GC-MS-Analyse der methanolischen Referenzlösung von 7 (GC-System 3) zeigte, dass der Gehalt an 7 bereits innerhalb weniger Tage stark abnimmt, während die Konzentration an 8 ansteigt (Abbildung 48 und Abbildung 49). Die Oxalsäurehydrazidstruktur von 7 wird demnach bereits in methanolischer Lösung innerhalb weniger Tage zu 8 und 9 gespalten. Diese Beobachtung bestätigt die bereits bekannte Hydrolyseinstabilität von 7[39].

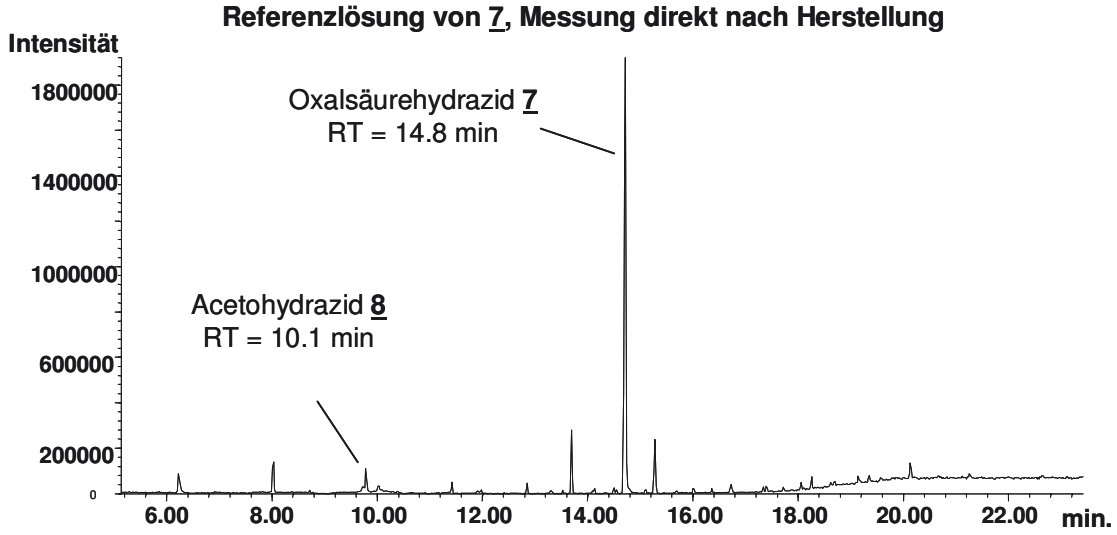


Abbildung 48: GC-MS einer methanolischen Referenzlösung von 7 (100ng/µl), direkt nach Herstellung

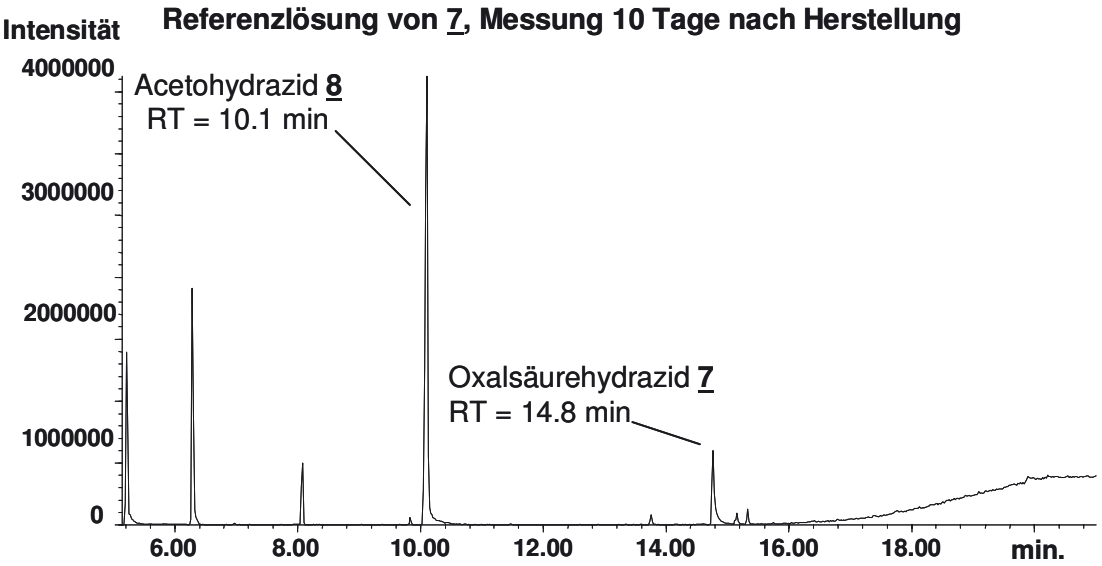


Abbildung 49: GC-MS einer methanolischen Lösung von 7 (100 ng/µl), 10 Tage nach Herstellung

Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass das Oxalsäurehydrazid 7 nach Beendigung der Brutdauer vollständig zu den Hydrolyseprodukten 8 und 9 abgebaut worden war. Die Untersuchungen der basischen Dichlormethan/Diethylether-Extrakte der AF (Charge 5 – 7) bestätigten diese Annahme. Die inokulierte Ausgangsverbindung 7 konnte in keiner der untersuchten Chargen nachgewiesen werden, wohingegen das Acetohydrazid 8 in allen Chargen eindeutig identifiziert werden konnte (Abbildung 50). Es kommt

demnach im bebrüteten Hühnerei zu einem vollständigen Abbau der Oxalsäurehydrazidstruktur unter Entstehung von **8** und **9**.

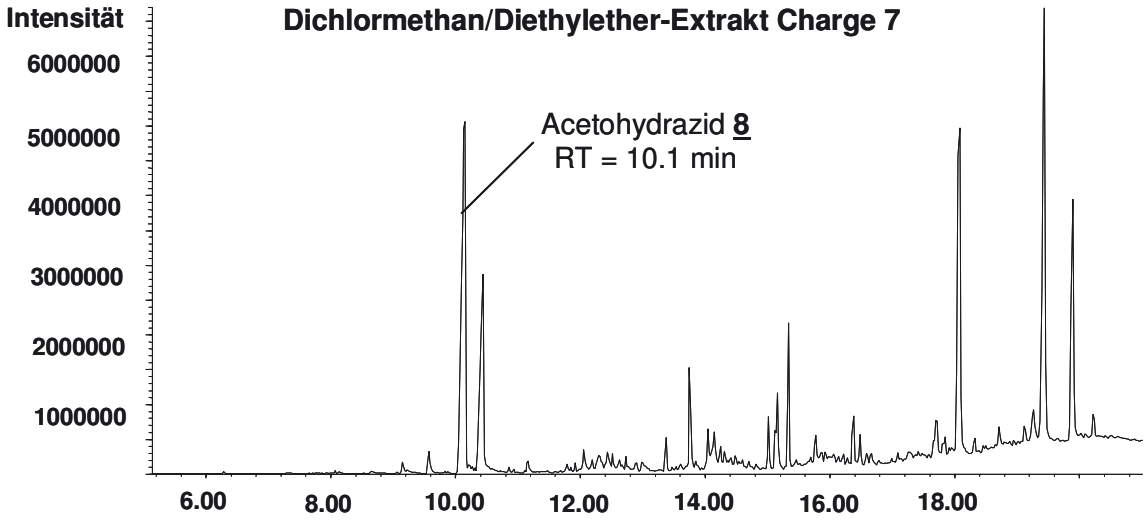


Abbildung 50: GC-MS des Dichlormethan/Diethylether-Extrakts von Charge 7 (10 mg **7**, Brutdauer 11 Tage)

Abbildung 51 zeigt das zugehörige Massenspektrum bei RT = 10.1 min, welches identisch mit dem der authentischen Vergleichssubstanz ist und damit die Struktur von **8** eindeutig belegt (Fragmentierungsmuster siehe[82]).

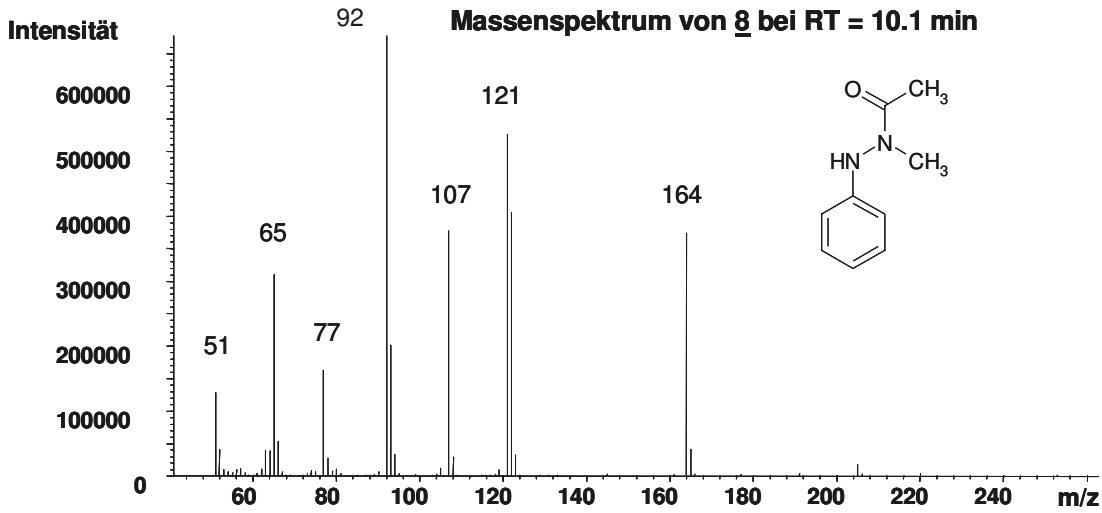


Abbildung 51: Massenspektrum von **8** bei 10.1 min

[82] H.-J. Duchstein, G. Ruch-Zaske, G. Holzmann, E. Wollenberg, H. Weber, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **1988**, *321*, 25 - 27

2. Nach Inokulation von Metamizol (1)

Nachdem mit der Identifizierung der Methyloxamidsäure (9) als Metabolit von 1 bereits der Nachweis für die oxidative Ringöffnung des Pyrazolinonringes im bebrüteten Hühnerei erbracht worden war, sollten die weiteren potentiellen Metaboliten 7 und 8 durch eine Flüssig-flüssig-Extraktion isoliert werden. Abbildung 52 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem GC-MS des basischen Extrakts der AF (Charge 3). Die Anwesenheit des Acetohydrazids 8 konnte durch das zugehörige Massenspektrum und die Referenzsubstanz in allen behandelten Chargen zweifelsfrei nachgewiesen werden.

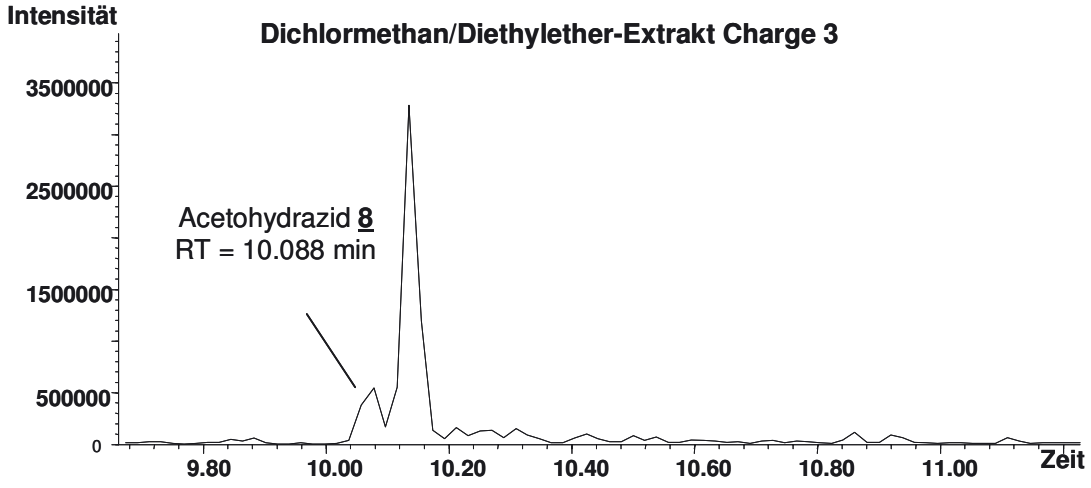


Abbildung 52: Ausschnitt aus dem GC-MS des Dichlormethan/Diethylether-Extrakts von Charge 3 (10 mg 1, Brutdauer 11 Tage)

Außerdem gelang es, in Charge 4 Spuren des Oxalsäurehydrazids 7 nachzuweisen. Abbildung 53 und Abbildung 54 zeigen mehrere charakteristische Ionenspuren von 7 bei einer Retentionszeit von 14.8 min, sowie das Massenspektrum der Referenzsubstanz (Fragmentierungsmuster siehe[82]).

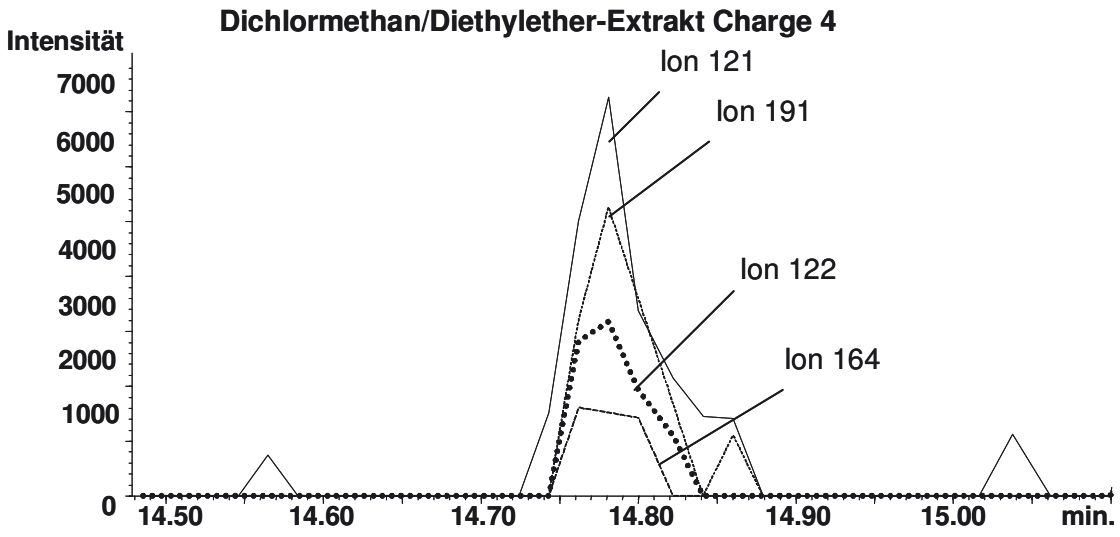


Abbildung 53: Nachweis von 7 über charakteristische Ionenspuren im GC-MS von Charge 4 (10 mg 1, 15 Bruttage)

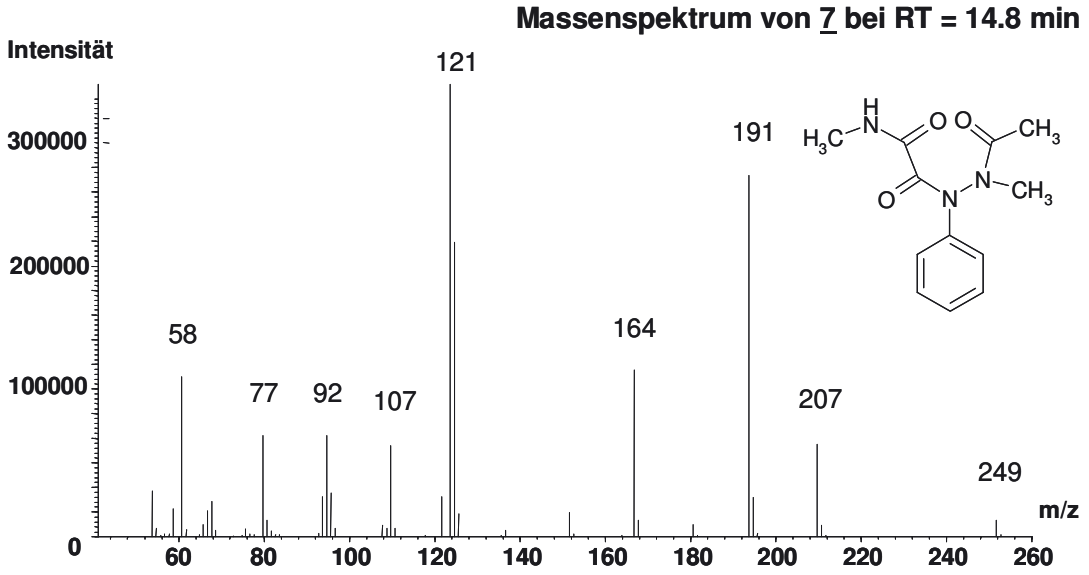


Abbildung 54: Massenspektrum von 7 bei 14.8 min

Man erkennt deutlich, dass die Hauptfragmente von 7 (m/z 121, 122, 164 und 191) bei RT = 14.8 min detektiert werden konnten.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die vorstehenden Untersuchungen zur Biotransformation von Metamizol (**1**) und seinen Abbauprodukten **7** und **9** im bebrüteten Hühnerei konnte erstmals eine oxidative Öffnung des Pyrazolinonringes auch in biologischer Umgebung eindeutig belegt werden. Als Folgeprodukte der Ringöffnung von Methylaminoantipyrin (**2**) wurden außer Methyloxamidsäure (**9**) auch das bisher als instabil eingestufte Acetohydrazid **8**[41,42] sowie das primäre Ringöffnungsprodukt **7** aus der AF der mit Metamizol (**1**) inokulierten bebrüteten Hühnereier nachgewiesen. Kiep konnte mit seinen Untersuchungen zeigen, dass es eine weitgehende Übereinstimmung bei der Metabolisierung von **1** im bebrüteten Hühnerei mit der Metabolisierung im Humanstoffwechsel gibt[79]. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt der Arbeit die Biotransformation von **1** beim Menschen mit den entwickelten Methoden im Hinblick auf ringoffene Metaboliten untersucht werden.

5 METABOLISIERUNG VON METAMIZOL (1) IM HUMANSTOFFWECHSEL

5.1 Zielsetzung

In den vorausgegangenen Untersuchungen zur Biotransformation von Metamizol (**1**) konnte gezeigt werden, dass es im bebrüteten Hühnerei neben der Bildung der bereits bekannten Metaboliten zu einer oxidative Ringöffnung der Pyrazolinonrings unter Bildung der Metaboliten **7**, **8** und **9** kommt. Im nächsten Schritt der Arbeit sollte überprüft werden, ob sich diese Ergebnisse auf die Metabolisierung von **1** im Humanstoffwechsel übertragen lassen. Deshalb wurde nach peroraler Einnahme von **1** die bereits etablierte Analytik für diese Metaboliten aus dem 48-Stunden-Sammelurin der Probanden vorgenommen, da innerhalb dieses Zeitraums > 90 % des applizierten Arzneistoffs in welcher Form auch immer im Urin erscheinen[33] (siehe auch Kapitel 1.4.1, S.16).

5.2 Versuchsdurchführung

5.2.1 Applikation von 1, Gewinnung des Probenmaterials

Die Untersuchungen wurden an zwei Probanden vorgenommen, die jeweils eine perorale Einmaldosis von 1g Metamizol (**1**) erhielten (entspricht einer gebräuchlichen Einmaldosis des Arzneistoffs, Tagesdosis bis zu 6 g). Anschließend wurde der Probandenurin über einen Gesamtzeitraum von 48 Stunden, unterteilt in zwei Fraktionen von jeweils 24 Stunden, gesammelt. Zusätzlich wurde vor Versuchsbeginn eine Blindprobe des Urins beider Versuchspersonen gewonnen. Die folgende Tabelle zeigt die Benennung der einzelnen Urinfraktionen.

	Proband 1	**Proband 2**
0 – 24 Stunden Sammelurin	24P1	24P2
24 – 48 Stunden Sammelurin	48P1	48P2
Blindprobe	BP1	BP2

Tabelle 10: Benennung der Urinfraktionen

5.2.2 Aufarbeitung der Urinproben

Extraktion und Derivatisierung der Säurefraktion (Isolierung von 9)

Jeweils 1.0 ml Urin wurde mit der Extraktionsmethode für **9** mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (AAV 2, S.136) aufgearbeitet. Zusätzlich wurden 100 ml der Fraktion 24P1 einer Konjugatspaltung mit 1%-Schwefelsäure unterworfen. Anschließend erfolgte auch hier eine Aufarbeitung des Probenmaterials nach AAV 2.

Flüssig-flüssig-Extraktion der lipophilen Metaboliten

Die Aufarbeitung erfolgte nach AAV 3, S.136. 0.7 ml der AF wurden jeweils bei pH = 8 – 9 und pH = 3 – 4 mit Dichlormethan/Diethylether 7:3 extrahiert.

Gaschromatographische Untersuchung der Extrakte

Alle Extrakte wurden mit Hilfe der GC-MS untersucht (GC-Systeme 2 und 3). Die Retentionszeiten der Substanzen liegen im GC-System 3 bedingt durch Kürzung der GC-Kapillarsäule um ca. 30 cm 0.3 min unterhalb der bisherigen Retentionszeiten.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Analytik der lipophilen Metaboliten durch Flüssig-flüssig-Extraktion

Mit Hilfe der charakteristischen Ionenspuren der unabhängig hergestellten Vergleichslösungen gelang es, das Oxalsäurehydrazids **7** und das Acetohydrazids **8** eindeutig bis zu 48 h Stunden nach Einnahme von **1** in mehreren Urinfraktionen zu identifizieren.

Identifizierung von 7

In Abbildung 55 wird am Beispiel der Fraktion 48P2 die Identifizierung von 7 anhand der typischen Ionenspuren der Substanz bei einer Retentionszeit von 14.4 min gezeigt. Abbildung 56 stellt das zugehörige Massenspektrum mit den typischen Fragmenten der Oxalsäurehydrazidstruktur dar.

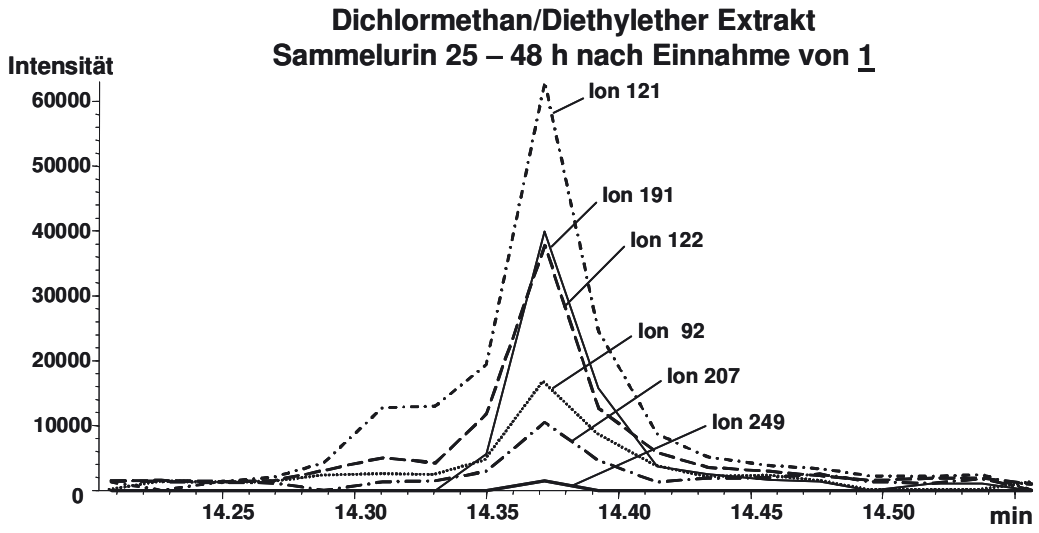


Abbildung 55: Charakteristische Ionenspuren von 7 in Fraktion 48P2 bei RT = 14.4 min)

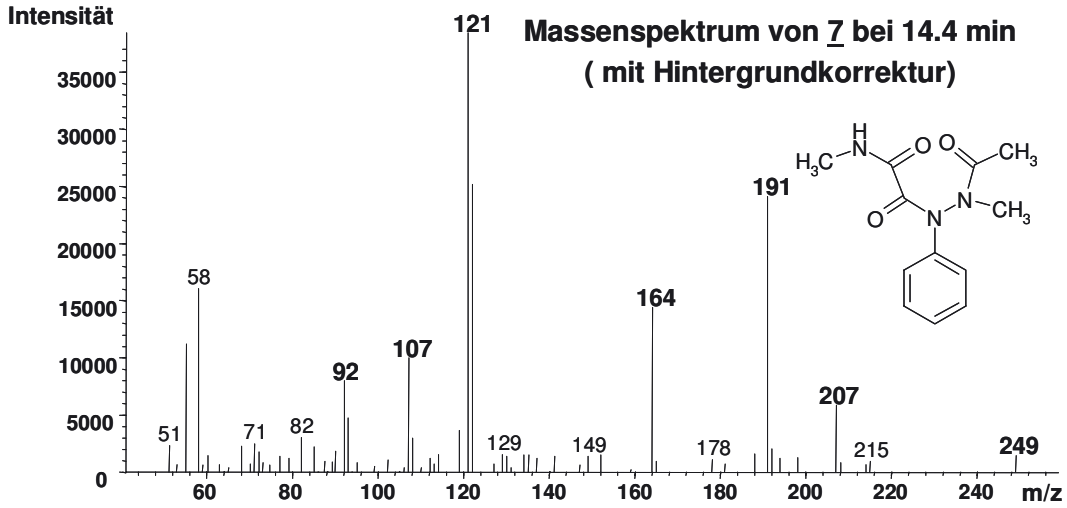


Abbildung 56: Massenspektrum bei 14.4 min

Identifizierung von 8

Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die charakteristischen Ionenspuren von **8** im organischen Extrakt des 24-Stunden-Sammelurins (24P1) bei einer Retentionszeit von 9.7 min, sowie das zugehörige Massenspektrum welches die Identität von **8** eindeutig belegt (vgl. Abbildung 51, S.86).

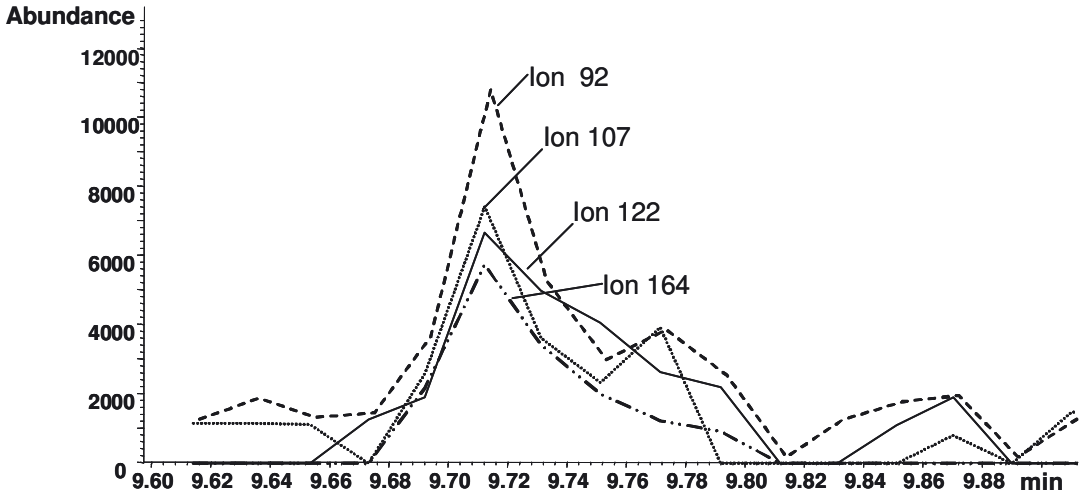


Abbildung 57: Charakteristische Ionenspuren von **7** im Dichlormethan/Diethylether-Extrakt von 24P1

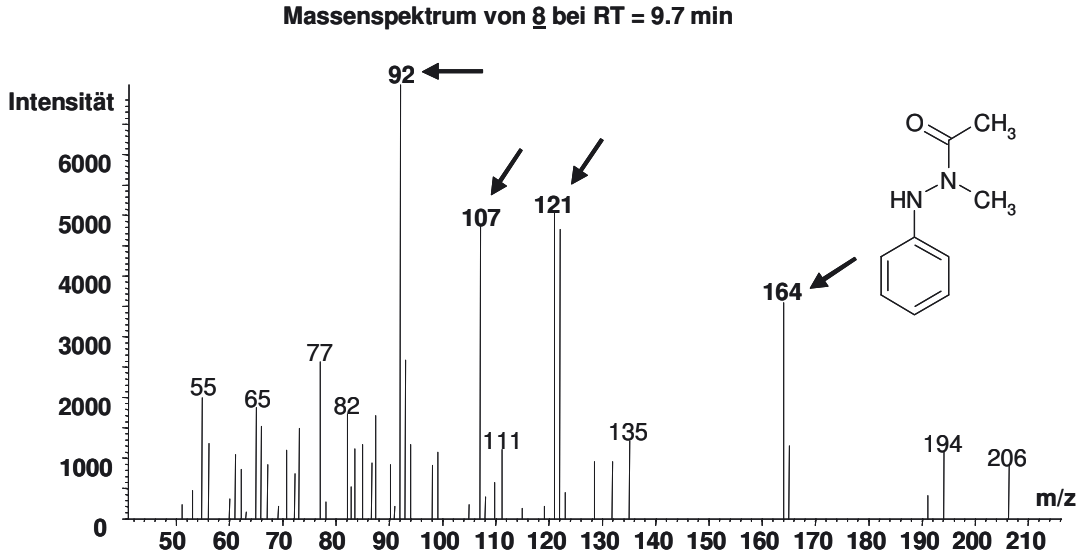


Abbildung 58: Massenspektrum bei 9.7 min, hervorgehoben: charakteristische Fragmente von **7**

Eine quantitative Analytik von **7** und **8** war allerdings nicht möglich, da es sich lediglich um Spuren dieser Verbindungen handelte

5.3.2 Analytik der Methyloxamidsäure (9)

Die Auswertung der GC-MS-Spektren der Trifluoressigsäureextrakte lieferte ähnliche Ergebnisse wie bei der Analytik von **9** aus bebrüteten Hühnereiern nach Inokulation von **1** (Kapitel 4.3.3.2). Bei der erwarteten Retentionszeit von 5.3 min traten die charakteristischen Fragmente der Methyloxamidsäure (**9**) bei m/z = 58, 59, und 60 auf.

5.3.3 Untersuchung der Gaschromatogramme auf weitere potentielle Ringöffnungsprodukte des Metamizols (1)

Durch die vorstehenden Untersuchungen wurde endgültig der Nachweis erbracht, dass nach der Biotransformation von **1** beim Menschen tatsächlich ringoffene Metaboliten im Urin auftreten. Auffällig war allerdings die geringe Menge dieser Metaboliten im Vergleich zu den bekannten Produkten mit intaktem Pyrazolinonring.

Deshalb erfolgte eine weitere Analyse der vorhandenen GC-MS-Daten, um eventuell andere bis dahin nicht identifizierte Metaboliten mit geöffnetem Pyrazolinonring zu detektieren. Dieses „Screening“ erfolgte mit Hilfe der typischen Fragmente der Phenylhydrazin- bzw. Phenylhydrazidstruktur (m/z = 92, 107, 121 und 149).

Auf diese Weise gelang es, im Trifluoressigsäureextrakt des hydrolysierten 24-Stunden-Sammel-Urins bei einer Retentionszeit von 12.6 min eine neue Substanz **25** zu identifizieren, die in den Blindproben nicht auftrat (Abbildung 59). Im nicht hydrolysierten Urin war diese Substanz nur in Spuren vorhanden und konnte erst nach 50facher Aufkonzentrierung der Probenlösung detektiert werden.

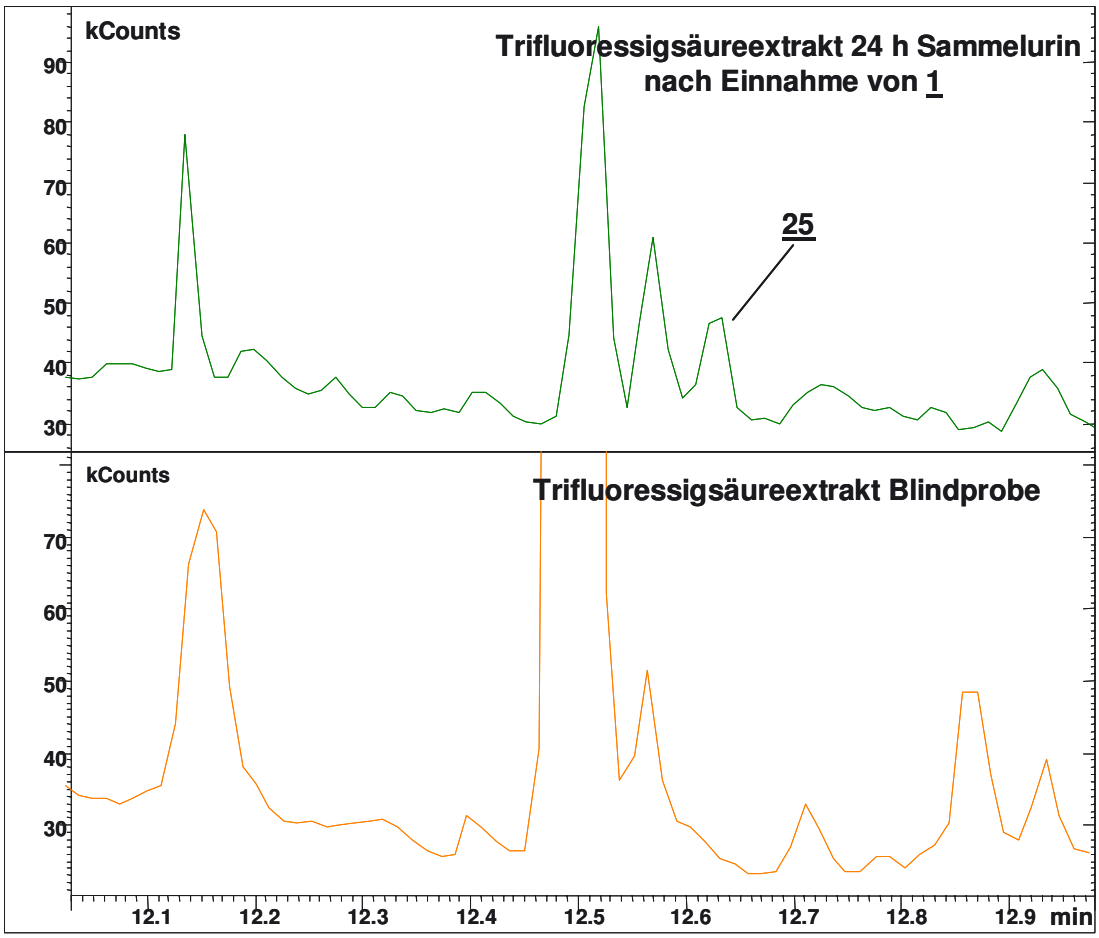


Abbildung 59: Unbekannte Substanz (**25**) im Trifluoressigsäureextrakt von Fraktion 24P1, im Vergleich Ausschnitt aus dem Trifluoressigsäureextrakt der Blindprobe BP1

Wie Abbildung 60 zeigt, enthält das zugehörige Massenspektrum die charakteristischen Fragmente einer Methylphenylhydrazid-Partialstruktur.

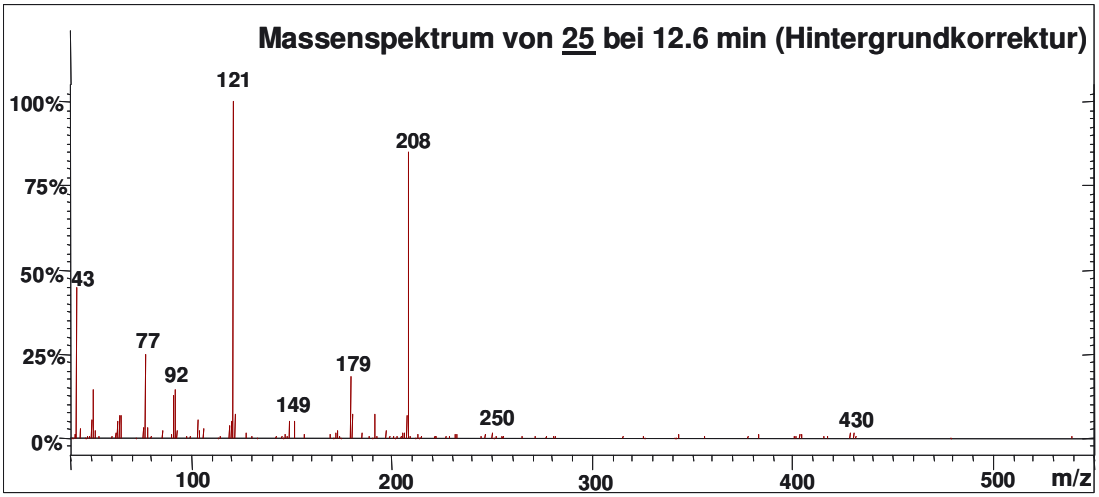
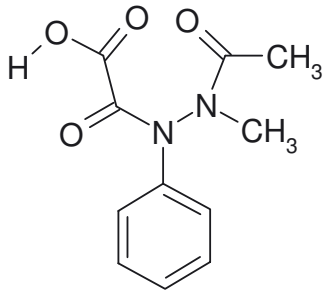


Abbildung 60: Massenspektrum der unbekannten Substanz **25** bei RT = 12.6 min

Da **25** im Trifluoressigsäureextrakt der hydrolysierten Urinprobe detektiert wurde, muss es sich bedingt durch die Aufarbeitung (AAV 2, S. 136) um den Methylester einer unbekannten Säure mit einem pKs < 3.8 handeln, die ursprünglich konjugiert im Urin vorliegt.

In den Dissertationen von Bresser[40] und Traber[42] wurde neben dem Oxamazid **7** auch die Säure **26** (Abbildung 61) als Ringöffnungsprodukt von **1** beschrieben, welches u. A. bei der Oxidation des Arzneistoffs mit Wasserstoffperoxid/Meerrettich-Peroxidase (HRP) entsteht. Sie bildet sich bevorzugt dann in größerer Ausbeute, wenn die stationäre Konzentration von Wasserstoffperoxid gering bleibt. Bei einem größeren Überschuss von Wasserstoffperoxid steht dagegen die Bildung des Oxamazids **7** im Vordergrund. Das Oxalsäurehydrazid **26** war bisher nicht als potentieller Metabolit von **1** in Betracht gezogen worden, da es nie gelungen war, sie aus dem organischen Extrakt einer Urinprobe nachzuweisen, wo sie in der Säurefraktion erwartet werden konnte.



26

Abbildung 61: Verbindung **26**, Entstehung durch oxidative Ringöffnung von **1** mit H_2O_2/HRP

5.3.3.1 Synthese von 25 aus 1, bzw. 6

Um zu überprüfen, ob es sich bei **25** tatsächlich um den Methylester von **26** handelt, wurde **26** durch Umsetzung von **1** mit H_2O_2/HRP hergestellt. Analog erfolgte die oxidative Ringöffnung des 4-Hydroxyantipyrins (**6**), da hier höhere Ausbeuten an **26** erzielt werden konnten. Anschließend wurde **26** durch Umsetzung mit Diazomethan zum Methylester umgesetzt (AAV 1, S.136).

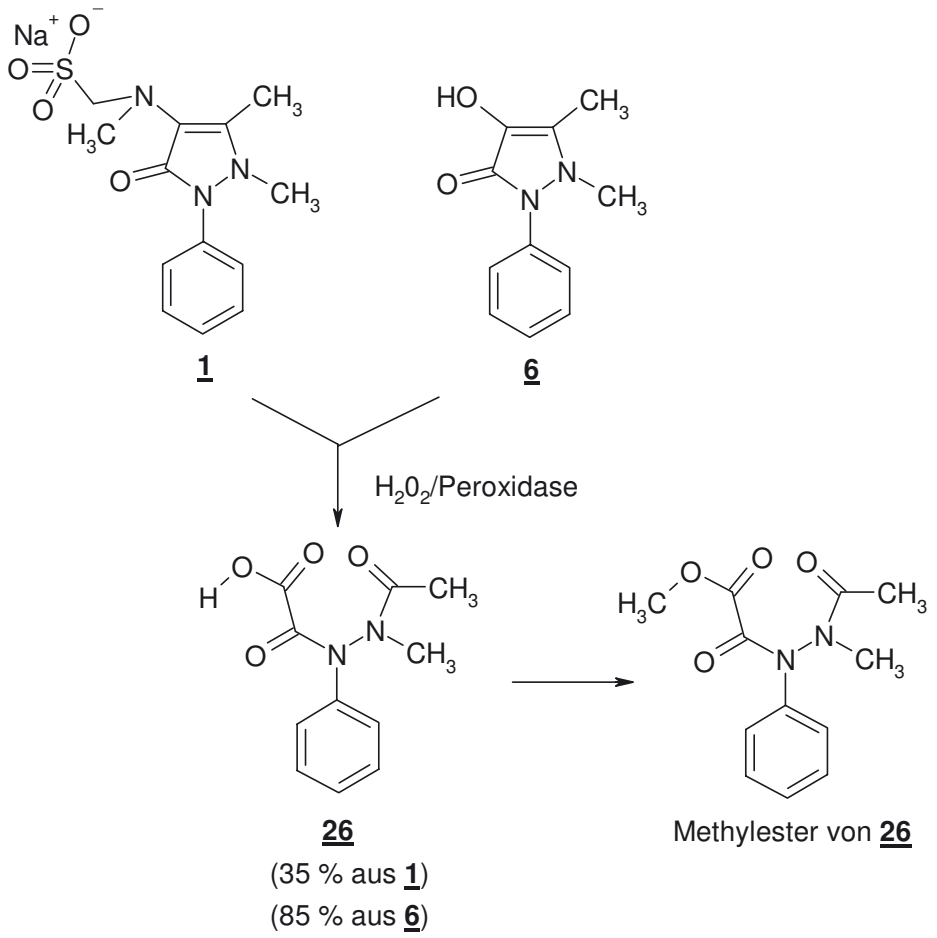


Abbildung 62: Herstellung von **25** aus **1** bzw. **6**

Der Methylester erwies sich im Gegensatz zur freien Säure allerdings als äußerst hydrolyseempfindlich, so dass bereits ein großer Teil des Esters während der Umsetzung mit Diazomethan und der anschließenden Aufarbeitung zum Acetohydrazid **8** und zum Oxalsäuremonomethylester hydrolysiert (Abbildung 63).

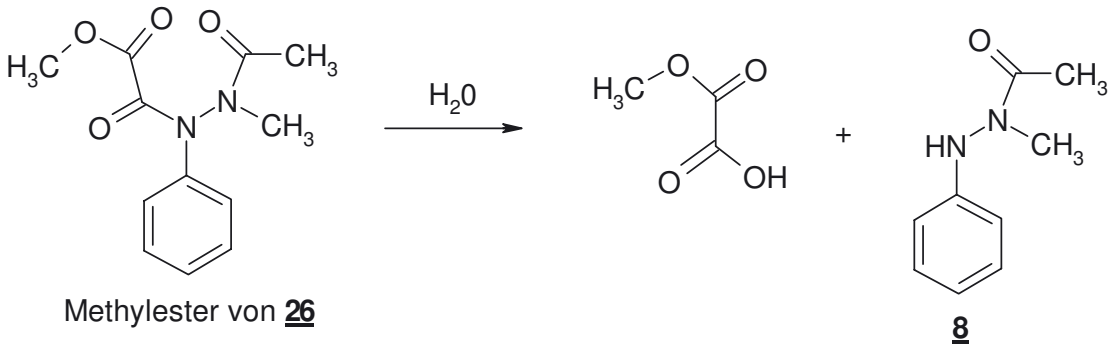


Abbildung 63: Hydrolyse des Methylesters von **26**

Deshalb muss der Reaktionsansatz nach Beendigung der Methylierung säulenchromatographisch aufgearbeitet werden, um **8** abzutrennen. Dadurch reduziert sich die Ausbeute des Methylesters auf nur 15 % der eingesetzten Menge **26**.

Abbildung 64 zeigt das Massenspektrum der synthetisierten Vergleichssubstanz.

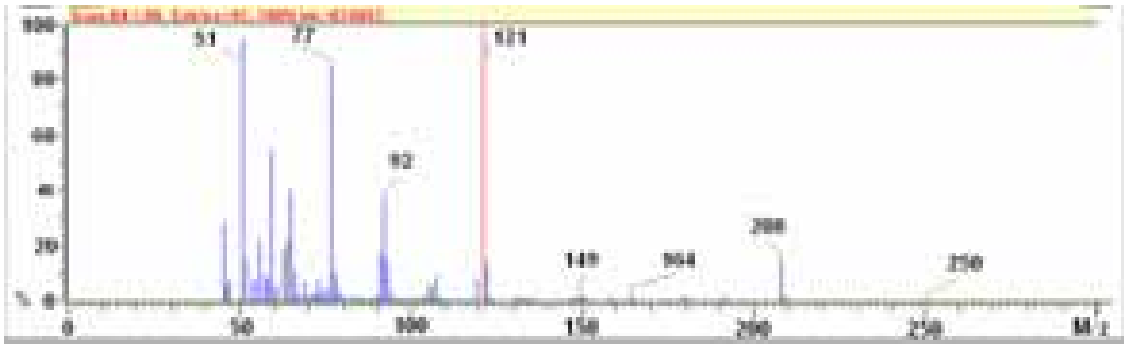


Abbildung 64: Massenspektrum des Methylesters von **26**

Durch Vergleich mit dem Massenspektrum der unbekannten Substanz **25** (Abbildung 60, S.99) aus dem Trifluoressigsäureextrakt der hydrolysierten Urinprobe konnte die Identität beider Verbindungen belegt werden.

Das Fragmentierungsmuster mit der Entstehung der charakteristischen Bruchstücke der Oxalsäurephenylhydrazidstruktur ist in Abbildung 65 dargestellt.

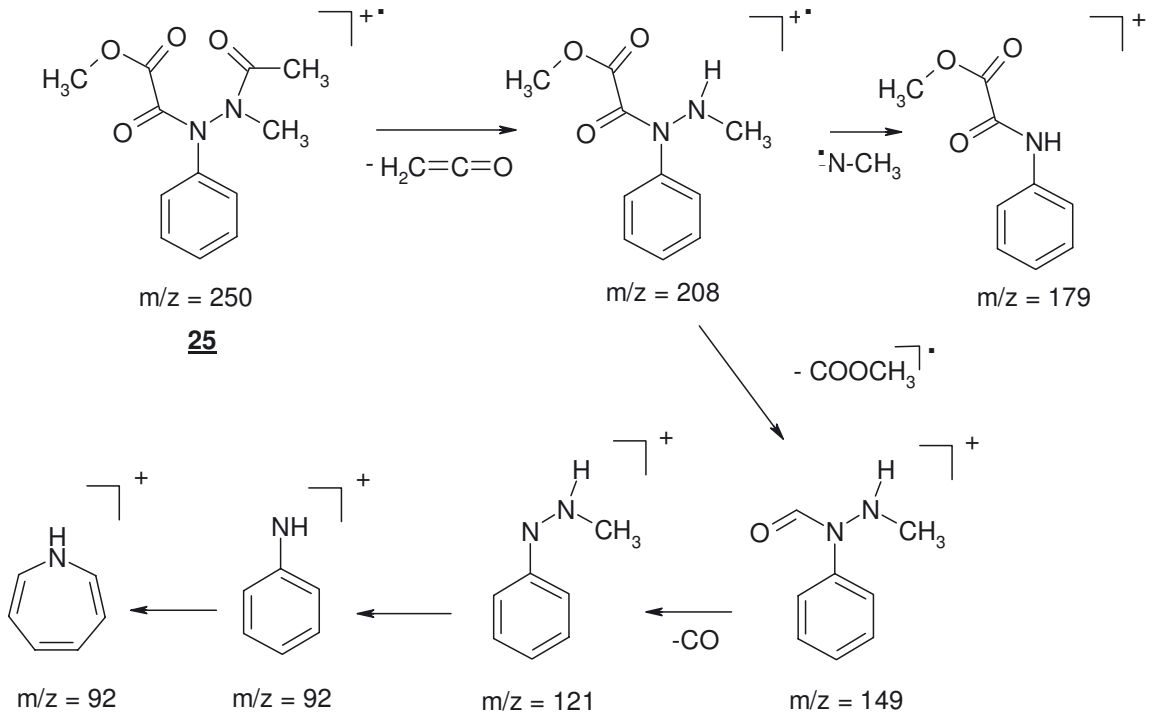


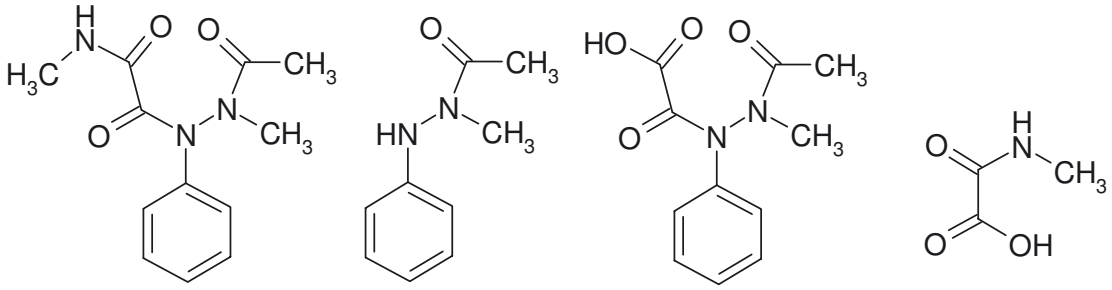
Abbildung 65: Fragmentierung von **25**

Mit der beschriebenen Analytik war es anschließend möglich, den Methylester **25** auch nach der Aufarbeitung der hydrolysierten AF aus bebrüteten Hühnereiern nach Applikation von **1** aus dem Trifluoressigsäureextrakt nachzuweisen.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit der vorgestellten Analytik konnten erstmals verschiedene ringoffene Metaboliten von **1** aus dem Urin von Probanden isoliert und mit Hilfe authentischer Vergleichssubstanzen mittels GC-MS identifiziert werden.

Dabei handelt es sich um den qualitativen Nachweis der Hydrazide **7**, **8** und **26**, sowie der Methyloxamidsäure (**9**) (Abbildung 66).



7 **8** **26** **9**

Abbildung 66: Aus dem Humanurin nachgewiesene Metaboliten von **1**

Auf eine quantitative Bestimmung dieser neuen Metaboliten per GC-MS wurde wegen der vielfältigen Problematik (komplexe Zusammensetzung der Extrakte, Überlagerung der nachzuweisenden Substanzen durch endogene Verbindungen, geringe Konzentrationen der neuen Metaboliten) verzichtet.

Die erstmalige Identifizierung von **26** eröffnet jedoch die Aussicht auf die Entwicklung einer HPLC-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieses Metaboliten. Damit sollte es möglich sein, die bislang immer noch unbefriedigende Bilanz der Biotransformation von Metamizol (**1**) entscheidend zu verbessern.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

6.1 Zusammenfassung

Obwohl der Arzneistoff Metamizol (**1**) bereits seit über 80 Jahren einen festen Platz in der analgetischen Therapie einnimmt, besteht bis heute eine beachtliche Diskrepanz zwischen einer verabreichten Menge der Substanz und der Summe der identifizierten Metaboliten. Bisher konnten lediglich 15 - 40 % einer applizierten Dosis in Form der Metaboliten **2** – **6** im Humanurin identifiziert werden (Abbildung 3, S.17), obwohl innerhalb von 3 Tagen nach Applikation von ^{14}C-markiertem Arzneistoff praktisch die gesamte Dosis als Strahlung im Urin erscheint[33]. Die Erkenntnisse über eine mögliche oxidativen Ringöffnung beschränkten sich bisher auf *in-vitro*-Untersuchungen unter zellähnlichen Bedingungen. Hierbei kommt es zu einer Ringöffnung zwischen Position 4 und 5 des Pyrazolinonringes. Nach anschließender Hydrolyse des gebildeten Semioxamazids **7** wurden das Acetohydrazid **8** und die Methyloxamidsäure (**9**) als mögliche Metaboliten postuliert[39] (Abbildung 67). Da sich **8** als besonders instabil gegenüber aktiven Sauerstoffspezies erwies[41], schien ein *in-vivo*-Beweis für die oxidative Ringöffnung nur über einen direkten Nachweis der Methyloxamidsäure (**9**) möglich zu sein, über deren Metabolisierung jedoch keine Erkenntnisse vorlagen.

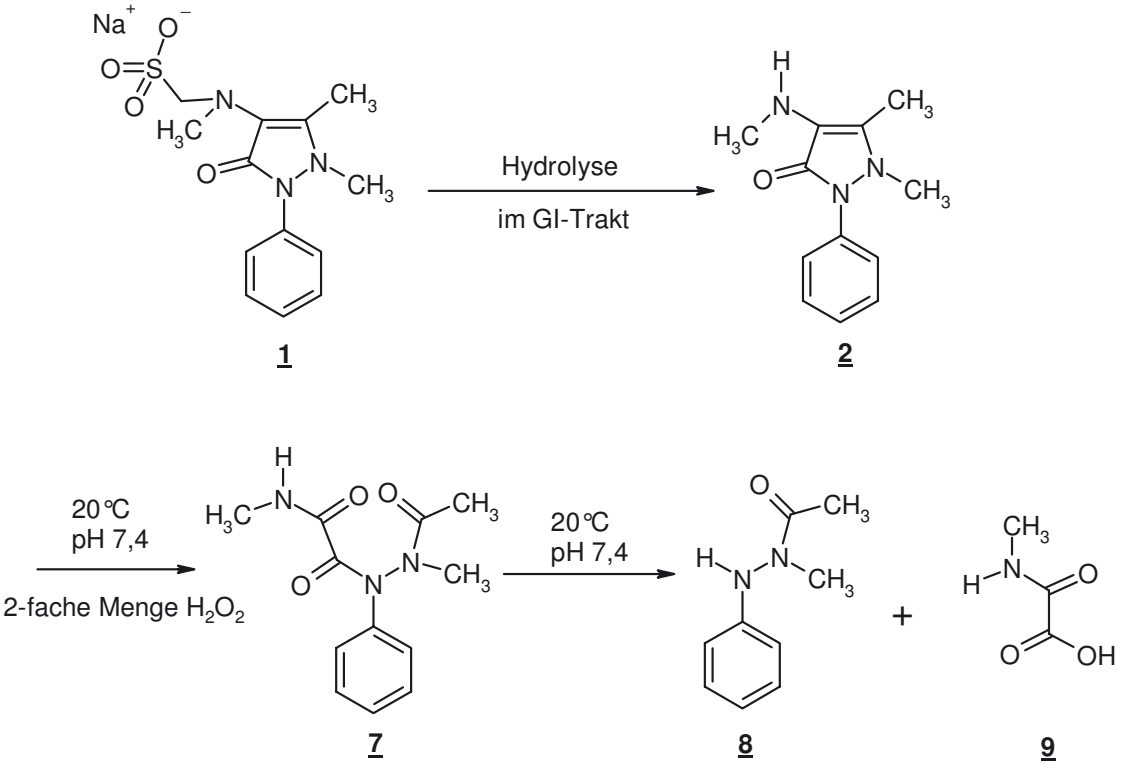


Abbildung 67: Oxidative Ringöffnung von **1** unter zellähnlichen Bedingungen

6.1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, durch einen spezifischen Nachweis von **9** aus biologischem Probenmaterial die auf *in-vitro*-Untersuchungen basierende Hypothese einer Biotransformation von **1** durch oxidative Ringöffnung des Pyrazolinonringes *in-vivo* zu überprüfen.

6.1.2 Entwicklung eines Nachweisverfahrens für 9

Zu diesem Zweck wurde ein spezifisches Nachweisverfahren für **9** entwickelt, welches eine quantitative Extraktion der Substanz aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie ermöglicht (Kapitel 2.3.4, S.50). Nach einer anschließenden Methylierung von **9** mit Diazomethan erfolgte die Detektion des Methylesters **22** per GC-FID und GC-MS (Abbildung 68). Dieses Verfahren wurde in den nachfolgenden Untersuchungen zum Metabolismus von **1** angewendet.

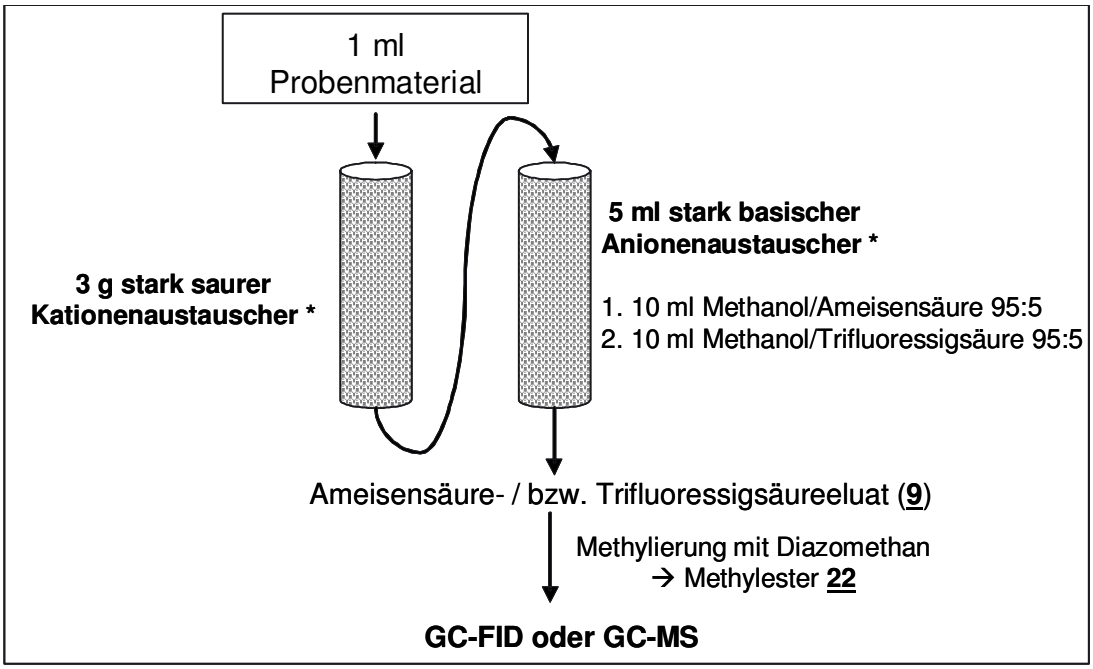


Abbildung 68: Extraktions- und Nachweisverfahren für **9**, (* Mengenangaben (g/ml) laut Hersteller)

6.1.3 Untersuchungen zum Metabolismus von Metamizol (1)

1. Metabolisierung von Methyloxamidsäure (9) in der Ratte

Zuerst wurde die Biotransformation von **9** in der Ratte untersucht, um die bis dahin nicht bekannte metabolische Stabilität dieser Substanz zu überprüfen. **9** wurde per Schlundsonde an die Versuchstiere appliziert und anschließend mit dem oben beschriebenen Verfahren aus dem Urin der Ratten qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass bis zu 90 % von **9** unverändert nach 24 Stunden im Urin der Versuchstiere erscheinen. Die Untersuchungen zeigten, dass **9** keiner weiteren Metabolisierung im Rattenorganismus unterliegt und bestätigten zusätzlich das entwickelte Nachweisverfahren für **9**. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Methyloxamidsäure (**9**) - falls sie bei der Metabolisierung von **1** im Humanstoffwechsel tatsächlich entsteht - aus dem Urin der Probanden nachzuweisen sein muss.

2. Metabolisierung von Metamizol (1) im bebrüteten Hühnerei

Das bebrütete Hühnerei stellt ein akzeptiertes Modell zur Simulation von Metabolisierungsreaktionen dar, da die hier gebildeten Metaboliten häufig mit denen des Humanstoffwechsels übereinstimmen. Kiep et al. hatten 2002 gezeigt, dass die Metabolisierung von **1** im bebrüteten Hühnerei weitgehend mit der Biotransformation der Substanz beim Menschen übereinstimmt[79]. Aus diesem Grund wurden eigene Untersuchungen zum Schicksal von **1** im bebrüteten Hühnerei vorgenommen, um mit Hilfe des entwickelten Nachweisverfahrens für **9** die Hypothese der oxidativen Ringöffnung von **1** zu überprüfen. Zusätzlich wurde ein organischer Extrakt der AF erstellt, um diesen auf die Anwesenheit von **7** und **8** zu untersuchen.

Nach Inokulation von **1** konnten tatsächlich **7**, **8** und **9** als Produkte der oxidativen Ringöffnung qualitativ aus der AF nachgewiesen werden.

3. Metabolisierung von Metamizol (1) im Humanstoffwechsel

Im nächsten Schritt der Arbeit wurde überprüft, ob die aus der AF der bebrüteten Hühnereier detektierten Metaboliten **7**, **8** und **9** sich auch aus dem Humanstoffwechsel nachweisen lassen.

Nach Verabreichung von je 1 g Metamizol (**1**) an zwei Probanden konnten ebenfalls **7**, **8** und **9** im Urin der Versuchspersonen detektiert werden. Allerdings handelte es sich dabei um sehr geringe Mengen dieser Substanzen, so dass

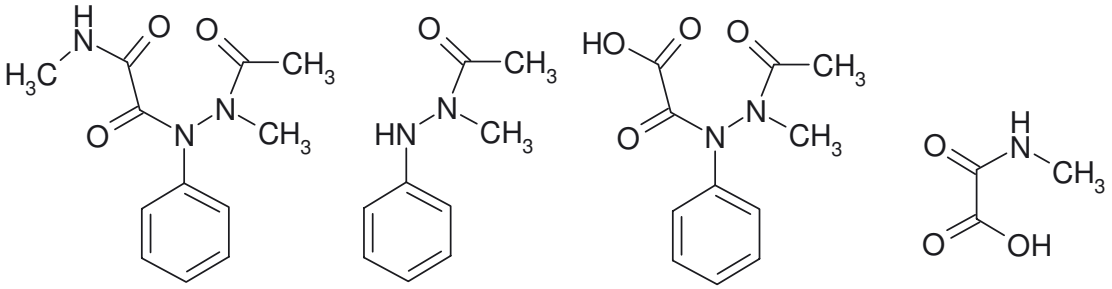
auf eine exakte Quantifizierung verzichtet wurde. Andererseits ergab sich aus diesem Umstand auch, dass damit die Lücke in der Metabolisierungsbilanz von Metamizol (**1**) nicht erklärt werden kann.

Zusätzlich wurde eine unbekannte Substanz **25** im Trifluoressigsäureextrakt des Probandenurins gefunden, deren Struktur mit Hilfe einer synthetisierten Vergleichssubstanz aufgeklärt werden konnte. Es handelt sich bei dieser Verbindung um den Methylester von **26** (Struktur siehe Abbildung 69), einem Oxalsäurehydrazid, welches auch bei der *in-vitro*-Behandlung von **1** mit geringen Mengen Wasserstoffperoxid/HRP durch Öffnung des Pyrazolinonringes entsteht.

Diese Verbindung konnte nachträglich ebenfalls aus der hydrolysierten AF der bebrüteten Hühnereier nachgewiesen werden, was die weitgehende Übereinstimmung der Metabolisierung von **1** im Humanstoffwechsel und im bebrüteten Hühnerei bestätigt.

6.1.4 Fazit

Mit den entwickelten Analysemethoden ist es erstmals gelungen, die Ringöffnungsprodukte **7**, **8**, **9** und **26** als Metaboliten von Metamizol (**1**) *in-vivo* nachzuweisen (Abbildung 69). Bemerkenswert war hierbei die Übereinstimmung der Metabolisierung von **1** in den bebrüteten Hühnereiern und im Humanstoffwechsel.



7 **8** **26** **9**

Abbildung 69: Ringöffnungsprodukte von **1**, extrahiert aus der AF von bebrüteten Hühnereiern und Humanurin

Es muss allerdings festgestellt werden, dass die Entstehung der neuen Metaboliten **7**, **8** und **9** nicht als alleinige Erklärung für das Defizit in der Metabolisierungsbilanz von Metamizol dienen kann, da sie lediglich einen geringen Prozentsatz der Metabolisierung von **1** ausmachen.

Viel versprechend ist hingegen das erstmals als Metabolit nachgewiesene Oxalsäurehydrazid **26**, welches nach Hydrolyse des Probenmaterials in wesentlich größeren Mengen als **7**, **8** und **9** im Trifluoressigsäureextrakt des Probandenurins detektiert werden konnte.

6.2 Ausblick

Auf der Grundlage der vorgestellten Ergebnisse könnten folgende weitere Untersuchungen zum Metabolismus von **1** angestellt werden, um das Problem der bislang immer noch unbefriedigenden Metabolisierungsbilanz von Metamizol (**1**) einer endgültigen Lösung näher zu bringen:

- Untersuchung zur Hydrolysestabilität von **26**
- Verabreichung von **26** im Tierversuch zur Bestimmung der metabolischen Stabilität
- Falls **26** sich als stabil erweist, Entwicklung einer HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung dieses Metaboliten.
- Prüfung von **26** in pharmakologischen Testsystemen (z. B. COX-Hemmung) zur Aufklärung bisher unbekannter Wirkungsmechanismen von **1**

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Verwendete Geräte

Brutgeräte:

Ehret Kleinmotorbrüter KMB/F2 mit automatischer Wendung und Feuchtigkeitsregelung

Hygrometer/Thermometer Hydromette TR 350, Gann

Schierlampe (Quecksilberdampflampe) Typ Blohm, Ehret

Mikrobohrmaschine MIK 20 mit Hartmetallfräser TCD 0203, Messner Emtronic

Omnifix®-F DUO Tuberkulin-Einmalspritzen, 1 ml mit 0,01 ml Graduierung, Kanülen G 25 x 5/8, Länge 16 mm, 0,05 mm Durchmesser, beides B. Braun

Elementaranalyse:

Zentrale Einrichtung der WE Chemie/Pharmazie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Elementaranalyse: Perkin Elmer PE 2400 CHN Elemental Analyser

Mikrowaage Perkin Elmer AD-6 Auto Balance

Gaschromatographie:

System 1: Gaschromatograph Sichromat 1-4, Siemens
FID-Detektor
Chromjet Integrator, Spectra Physics

System 2: GC/MS-System Saturn 2000 Varian
Gaschromatograph: CP-3800
Massenspektrometer: Saturn 2200, Ionisierungsenergie 70 eV
Autosampler: Varian automatic liquid sampler 8400

System 3: GC/MS-System Hewlett Packard 5890 MSD 5970
Ionisierungsenergie 70 eV
Autosampler: Hewlett Packard 7673

IR-Spektren:

Perkin Elmer FT IR-Spektralphotometer,

Festsubstanzen als KBr-Preßlinge, Angaben in Wellenzahlen ν [cm^{-1}]

Charakterisierung der Schwingung durch: Transmission [%]

vw	(very weak)	90 – 70
w	(weak)	70 – 50
m	(medium)	50 – 30
s	(strong)	30 – 10
vs	(very strong)	10 – 0
br	(broad)	

Massenspektren:

1. Finnigan MAT 4000: Elektronenstoßionisation, Ionisierungsenergie 70

2. Finnigan MAT 311 A: Elektronenstoßionisation, Ionisierungsenergie 70

Angaben als m/z (relative Intensität in %)

NMR-Spektren:

1. ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR: Bruker AC-200, Messfrequenz 200 MHz

2. HMBC: Bruker, DRX 500, Messfrequenz 500 MHz

Angabe der chemischen Verschiebung δ in ppm gegen TMS als internen Standard

Pipetten:

1000, 250, 50, 25 µl, Gilson, Pipettenspitzen Microman, Gilson

Schmelzpunkte:

Kofler Schmelzbank, unkorrigiert

Vortex:

Genie 2, Bender & Hobein AG

Zentrifuge:

Allegra 21R Centrifuge, Beckman Coulter

7.2 Verzeichnis der Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
AF	Allantoisflüssigkeit
arom.	aromatisch
aust.	austauschbar
ber.	berechnet
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDI	N,N'-Carbonyldiimidazol
^{13}C-NMR	^{13}C-Kernresonanzspektroskopie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
dd	Dublett vom Dublett
dem.	demineralisiert
d. h.	das heißt
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett vom Triplett
d. Th.	der Theorie
EI	Elektronenstoßionisation
Ether	Diethylether
evtl.	eventuell
FID	Flammenionisationsdetektor (GC)

FM	Fließmittel, Elutionsmittel
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
gef.	gefunden
ges.	gesucht
GI-Trakt	Gastro-Intestinaltrakt
Gl.	Gleichung
HMBC	heteronuclear multibond correlation
^{1}H-NMR	^{1}H-Kernresonanzspektroskopie
HRP	horse radish peroxidase
i.D.	innerer Säulendurchmesser
IR	Infrarot; Infrarotspektroskopie
J	Betrag der Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
m	Multiplett
Lit.	Literatur
$M^{+\bullet}$	Molekülkationradikal
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse / Ladung
NMR	Kernresonanz; Kernresonanz-Spektroskopie
$NO^{\bullet}$	Stickstoffmonoxid
p.A.	zur Analyse
PE	Polyethylen
p.o.	per oral

ppm	parts per million
pro inj.	zur Injektion
proz.	prozentig
q	Quartett
R_f	mittlere Wanderungsstrecke
rel.	Relative, relative
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S.	Seite
SC	präparative Säulenchromatographie
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
t	Triplett
Tab.	Tabelle
ν	Wellenzahl
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.S.	zur Synthese
z. T.	zum Teil

7.3 Chemikalien/Materialien

7.3.1 Gaschromatographie

Gase:

Helium 5.0, Messer Griesheim

Stickstoff 5.0, Messer Griesheim

Wasserstoff 5.0, Messer Griesheim

Synthetische Luft, Messer Griesheim

Gasnachreinigungssystem Oxisorb®

Lösungsmittel:

Methanol p. A., Riedel-de Haën

Säulen:

1. HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

2. Permabond-OV-17-0.25, 25 m x 0.32 mm i. D., Macherey-Nagel

7.3.2 Säulenchromatographie

Sorbens:

Kieselgel 60, Korngröße 0,04-0,063 mm (Merck Nr.9385)

7.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Stark basischer Ionenaustauscher (Anionenaustauscher)

Ionenaustauscher Amberlite® IR-402, Merck

Stark saurer Ionenaustauscher (Kationenaustauscher)

Ionenaustauscher I, Merck

Verwendet wurden Glassäulen mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Länge von 15 cm.

7.3.4 Dünnschichtchromatographie

DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck Nr. 5554)

Die Laufstrecke betrug jeweils 10 cm. Alle Substanzen wurden durch UV-Löschung bei 254 nm detektiert.

Verwendete Fließmittel:

FM 1 Toluol/Isopropanol 80:20

FM 2 Toluol/Isopropanol 70:30

FM 3 Ethylacetat

FM 4 Diisopropylether

FM 5 Toluol/Isopropanol 90:10

FM 6 Diethylether

FM 7 Ethanol/Toluol/Eisessig 60:40:2

FM 8 Toluol/Ethanol 80:20

FM 9 Ethylacetat/Aceton 95:5

FM 10 Ethylacetat/Diisopropylether 70:30

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

7.3.5 Verwendete Chemikalien

Ameisensäure p. A.	Riedel-de-Haën
Benzoesäure p. A.	Riedel-de-Haën
Benzylalkohol z. S.	Acros
p-Bromphenacylbromid z. S.	Fluka
N,N'-Carbonyldiimidazol	Aldrich
Dicyclohexyl-18-krone-6	Aldrich
2,6-Dihydroxybenzoesäure	Aldrich
4-Dimethylaminopyridin	EGA Chemie
Eisessig p. A.	Roth
Ethylenglykolmonoethylether z. S	Riedel-de-Haën
Ethylenglykolmonomethylether z. S.	HSL
Kaliumhydroxid p. A.	Merck
Magnesiumsulfat wasserfrei p. A.	Grüssing
Methylaminlösung 40% z. S.	Acros
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Riedel-de-Haën
Natriumchlorid p. A.	Merck
Natriumhydrogencarbonat p. A.	Merck
Natriumhydrogenphosphat p. A.	Grüssing
Natriumhydroxid p. A.	Merck
Natriummetaperiodat p. A.	J. T. Baker
Natriumsulfat wasserfrei p. A.	Roth
N-Methyl-N-Nitroso-p-toluolsulfonamid (Diazald®)	Aldrich
Oxalsäurediethylester z. S.	Merck-Schuchardt
Oxalylchlorid z. S.	Acros
Perchlorsäure 70% p. A:	Riedel-de-Haën

Phenolphthalein p. A.	Merck
Phenylalanin	Acros
Salzsäure 37% z. S.	Caldic
Schwefelsäure 98% z. S.	Caldic
Trifluoressigsäure p. A.	Acros
Wasserstoffperoxidlösung 30%	J. T. Baker
Weinsäure p. A.	Riedel-de-Haën

7.3.6 Puffer

pH = 7.5 Lösung a) 4.546 g KH_2PO_4 auf 500 ml H_20

Lösung b) 11.876 g Na_2 HPO4 auf 1000 ml H_2O

74 ml von Lösung a) werden mit 426 ml von Lösung b) gemischt und gegen ein kalibriertes pH-Meter eingestellt.

7.3.7 Enzyme

Peroxidase aus Meerrettich (horse radish), EC 1.11.1.7,

Aktivität: 10.000 U/51 mg

Merck, Bestellnummer 1.16216.0001

7.4 Versuchsdurchführung

7.4.1 Ionenaustauschchromatographie

7.4.1.1 Modellversuch zur Verwendung von Trifluoressigsäure als Elutionsmittel (Kapitel 2.3.3.1, S. 47)

244 mg Benzoesäure (2 mmol) und 308 mg 2,6-Dihydroxybenzoesäure (2 mmol) werden in 300 ml dem. Wasser gelöst. Die Lösung wird über eine Glassäule gefüllt mit 10 ml stark basischem Anionenaustauscher gegeben. Die Säule wird zuerst mit 10 ml dem. Wasser, danach mit 10 ml Methanol gespült.

Anschließend wird nacheinander eluiert mit:

Methanol/Ameisensäure: 96:4, 50 ml, waschen mit 10 ml Methanol

Methanol/Trifluoressigsäure: 96:4, 50 ml, waschen mit 10 ml Methanol

Durchflussrate: 2 ml/min

Die Eluate werden im Vakuum bei 40 °C eingeengt, die Rückstände gewogen und zusätzlich dünnschichtchromatographisch untersucht.

Ergebnis:

	Ameisensäureextrakt	**Trifluoressigsäureextrakt**
Benzoesäure	210 mg (86 %)	-
2,6-Dihydrobenzoesäure	-	262 mg (85 %)

7.4.1.2 Modellversuch zur Abtrennung von Aminosäuren durch Verwendung eines Kationenaustauschers (Kapitel 2.3.3.2, S. 49)

106 mg Phenylalanin (0.65 mmol) und 76 mg Oxamidsäure (**14**) (0.85 mmol) werden in 300 ml dem. Wasser gelöst. Diese Lösung wird über eine Glassäule gefüllt mit 3 g Kationenaustauscher gegeben und anschließend die Säule mit 10 ml dem. Wasser gespült. Das Eluat wird auf eine zweite Säule, gefüllt mit 5 ml stark basischem Anionenaustauscher gegeben. Die Säule wird zuerst mit 10 ml dem. Wasser, danach mit 10 ml Methanol gespült.

Anschließend wird eluiert mit:

Methanol/Trifluoressigsäure: 95:5, 50 ml, waschen mit 10 ml Methanol

Durchflussrate: 2 ml/min

Das Eluat wird im Vakuum bei 40 °C eingeengt und der Rückstand gewogen. Danach wird er in 5 ml Methanol gelöst und mit einem Überschuss an etherischer Diazomethanlösung versetzen. Der Ansatz wird über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand in 1,0 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wurde per DC auf die Anwesenheit von Methylierungsprodukten des Phenylalanins und unter Verwendung der Vergleichssubstanz gaschromatographisch auf die Anwesenheit von Oxamidsäuremethylester (**23**) untersucht.

Gaschromatographie:

System 1

Säule: Permabond-OV-17-0.25, 25 m x 0.32 i. D., Macherey-Nagel

Trägergas: Stickstoff

Druck (N_2): 0.6 bar

Split: 20 ml/min

Injektortemperatur: 240°C

Detektortemperatur: 240°C

Temperaturprogramm:

70 °C, 4 min, 10 °C/min bis 220 °C, 1 min

Gesamtdauer: 20 min.

Retentionszeit:

Verbindung	Retentionszeit (in min)
23	8.7

Ergebnis:

	Trifluoressigsäureextrakt
Phenylalanin	-
Oxamidsäure (**14**)	75 mg (~ 100 %)

7.4.2 Metabolisierung von Methyloxamidsäure (9) in der Ratte (siehe Kapitel 3, S. 57)

7.4.2.1 Versuchstiere

Ratten der Rasse Wistar, (männlich, Gewicht: 200 g, Alter: 3 Monate)

7.4.2.2 Durchführung

Die Tiere wurden in eine Verumgruppe und eine Kontrollgruppe eingeteilt (jeweils n = 3). Die Verumgruppe erhielt per Schlundsonde 1 mg **9**, gelöst in 1 ml Wasser, die Kontrollgruppe jeweils 1 ml Wasser. Anschließend wurden die Tiere getrennt voneinander über einen Zeitraum von 48 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Alle 12 Stunden wurde der ausgeschiedene Urin der Versuchstiere aus den Sammelgefäßen entnommen und bis zur Aufarbeitung in PE-Gefäßen bei -20 C tiefgefroren.

7.4.2.3 Aufarbeitung des Probenmaterials

AAV 2

Die Lösung wird im Verhältnis 1:10 mit Methanol p. A. verdünnt.

7.4.2.4 Gaschromatographische Untersuchung

7.4.2.4.1 Qualitative Analytik des Rattenurins

Gaschromatographie:

System 2

Säule: HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

Trägergas: Helium

Durchflussrate: 1 ml/min

Split/purge off time: 0.01 min. mit einem Splitverhältnis von 1:80

Injektortemperatur: 170°C

Transferline temperature: 250°C

Detektortemperatur: 225°C

Injektionsvolumen: 1 µl

Temperaturprogramm:

50 °C, 2 min, mit 30 °C/min bis 110 °C, mit 12 °C/min bis 290 °C, 15 min

Gesamtdauer: 34 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
22	5.2

7.4.2.4.2 Quantitative Analytik des Rattenurins

Untersucht wurden die Trifluoressigsäureextrakte extrahiert aus den Urinproben der Verumgruppe 12 bzw. 24 Stunden nach Gabe von **9**, da **22** in diesen Proben bereits qualitativ nachgewiesen werden konnte.

Gaschromatographie:

GC-System 1

Säule: Permabond-OV-17-0.25, 25 m x 0.32 mm i. D., Macherey-Nagel

Trägergas: Stickstoff

Druck (N_2): 0.5 bar

Split: 17 ml/min

Injektortemperatur: 150 °C

Detektortemperatur: 240 °C

1. Erstellung der Eichgeraden:

Es wurden folgende methanolische Vergleichslösungen von **22** hergestellt:

1. 25 ng/µl
2. 40 ng/µl
3. 50 ng/µl
4. 75 ng/µl
5. 100 ng/µl

Injektionsvolumen: 3 µl

Jede Lösung wurde dreimal injiziert.

Temperaturprogramm

70 °C, 3 min, mit 30 °C/min bis 220 °C, 1 min

Gesamtdauer: 9 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
22	6.6

Eichgerade: siehe Abbildung 38, S. 63

2. Messung der Proben:

Injektionsvolumen: 3 µl

Jede Probe wurde dreimal injiziert.

Temperaturprogramm

70 °C, 3 min, mit 10 °C/min bis 110 °C, 3 min, 50 °C/min bis 220 °C, 10 min

Gesamtdauer: 22.2 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
22	9.7

7.4.3 Metabolisierung von Metamizol (1) im bebrüteten Hühnerei (siehe Kapitel 4, S.67)

7.4.3.1 Bruteier

Fertile Eier der Hybridhühner Shaver Starcross 288 A, ca. 55 – 70 g.

Die Eier wurden am Ablagetag bezogen

7.4.3.2 Applizierte Substanzen

Metamizol (**1**)

Oxalsäurehydrazid (**7**)

Methyloxamidsäure (**9**)

Es wurden 5 und 10 mg jeder Substanzen in ein Kollektiv Eier (n = 11) inokuliert.

7.4.3.3 Applikation der Substanzen, Inkubation und Extraktion der AF

Die Bruteier wurden vor Versuchsbeginn zwischen 24 h und 4 Tagen bei 10 – 15 °C ruhig gelagert. Vor der Applikation der Substanzen wurden die Eier gewogen und jeweils Kollektive von elf Eiern mit vergleichbarem Durchschnittsgewicht gebildet. Eier mit Schalendefekten und großen Abweichungen vom Durchschnittsgewicht des Kollektivs (jeweils 10 % der Gesamtzahl) wurden aussortiert. Zur Applikation der Substanzen wurde mit einer Mikrobohrmaschine ein ca. 2 mm großes Loch seitlich des spitzen Eipols gebohrt. Jedem Kollektiv wurde die angegebene Substanzmenge gelöst in 0.1 ml Aqua bidest pro inj. Mit einer 1 ml Spritze ins Eiweiß injiziert. Anschließend wurde das Loch mit Dufix®-Spachtelmasse verschlossen. Zwei Kollektive blieben unbeimpft (Blindversuche). Die Eier wurden bei einer Temperatur von 38.0 °C (± 0.5 °C) und einer Luftfeuchtigkeit von 64 % (± 5 %) in einer Bebrütungsanlage bebrütet und alle drei Stunden gewendet. Am 5., 11. und 15. Tag erfolgte eine Schierkontrolle der Eier, bei der unbefruchtete, nicht entwickelte und abgestorbene Eier aussortiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 11 bzw. 15 Tagen wurde die Bebrütung der Eier abgebrochen. Zu diesem Zweck wurden sie für ca. 30 min. in einen Tiefkühlschrank bei -20 °C gelegt. Danach erfolgte die Öffnung der Eier über der Luftblase am stumpfen Eipol. Die Eihaut wurde mit Wasser befeuchtet und mit einer Pinzette entfernt. Die Chorioallantois-Membran wurde mit einer Spritze

durchstochen, die darunter liegende AF abgesaugt und pro Kollektiv gepoolt. Bei Trübungen der Flüssigkeit durch Uratausfällungen erfolgte eine Zentrifugation. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben in Polyethylengefäßen bei -20 C gelagert.

7.4.3.4 Extraktion

Jede Probe wurde nach AAV 2 und AAV 3 aufgearbeitet. Charge 1 (5 mg **1**, 11 Bruttage) wurde zusätzlich einer HCl-Konjugatspaltung unterzogen und anschließend ebenfalls nach AAV 2 und AAV 3 extrahiert.

7.4.3.5 HCl-Konjugatspaltung

10,0 ml Allantoisflüssigkeit werden mit 5,0 ml 37 % HCl 30 min im siedenden Wasserbad unter Rühren erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 2,3 g NaOH neutralisiert.

7.4.3.6 Gaschromatographische Untersuchung

7.4.3.6.1 Qualitative Analytik der Methyloxamidsäure (9)

Probenvorbereitung:

Die nach AAV 2 gewonnenen Extrakte werden im Verhältnis 1:10 mit Methanol p. A. verdünnt.

Gaschromatographie:

System 2

Säule: HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

Trägergas: Helium

Durchflussrate: 1 ml/min

Split/purge off time: 0.01 min. mit einem Splitverhältnis von 1:80

Injektortemperatur: 170°C

Transferline temperature: 250°C

Detektortemperatur: 225°C

Injektionsvolumen: 1 µl

Temperaturprogramm:

50 °C, 2 min, 30 °C/min bis 110 °C, 12 °C/min bis 290 °C, 15 min

Gesamtdauer: 34 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
22	5.3

7.4.3.6.2 Qualitative Analytik der lipophilen Metaboliten 7 und 8

Probenvorbereitung:

Die nach AAV 3 gewonnenen Extrakte werden direkt gaschromatographisch vermessen.

Gaschromatographie:

System 3

Säule: HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

Trägergas: Helium

Druck: 70 kPa

Split/purge off time: 2 min

Injektortemperatur: 270 °C

Transferline temperature: 280 °C

Detektortemperatur: 270 °C

Scan Modus: 40 – 550 m/z

Injektionsvolumen: 1 µl

Temperaturprogramm:

60 °C, 2 min, 40 °C/min bis 110 °C, 13 °C/min bis 300 °C, 15 min

Gesamtdauer: 32.87 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
7	14.8
8	10.1

7.4.4 Metabolisierung von Metamizol (1) im Humanstoffwechsel (siehe Kapitel 5, S.91)

7.4.4.1 Versuchsdurchführung

Zwei Probanden (männlich, weiblich, keine Einnahme weiterer Arzneistoffe) wurde jeweils eine Einzeldosis von 1000 mg **1** peroral verabreicht. Der Urin der folgenden 48 Stunden wurde unterteilt in zwei Fraktionen von je 24 Stunden gesammelt. Das Probenmaterial wurde bis zur Aufarbeitung in PE-Gefäßen bei -20 °C tiefgefroren.

7.4.4.2 Extraktion

Jede Probe wurde nach AAV 2 und AAV 3 aufgearbeitet. Die Urinfraktion 24P1 wurde zusätzlich einer Konjugatspaltung mit verdünnter Schwefelsäure unterzogen und anschließend ebenfalls nach AAV 2 extrahiert.

7.4.4.3 Konjugatspaltung

10 ml Urin wird mit 1-proz. Schwefelsäure auf pH = 4 - 5 eingestellt und 20 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert mit Natriumhydrogencarbonat auf pH = 7 – 8 gebracht.

7.4.4.4 Gaschromatographische Untersuchungen

7.4.4.4.1 Qualitative Analytik der Methyloxamidsäure (9)

Probenvorbereitung:

Die nach AAV 2 gewonnenen Extrakte werden im Verhältnis 1:10 mit Methanol p. A. verdünnt.

Gaschromatographie:

System 2

Säule: HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

Trägergas: Helium

Durchflussrate: 1 ml/min

Split/purge off time: 0.01 min. mit einem Splitverhältnis von 1:80

Injektortemperatur: 170 °C

Transferline temperature: 250 °C

Detektortemperatur: 225 °C

Injektionsvolumen: 1 µl

Temperaturprogramm:

50 °C, 2 min, 30 °C/min bis 110 °C, 12 °C/min bis 290 °C, 15 min

Gesamtdauer: 34 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
22	5.3

7.4.4.4.2 Qualitative Analytik der lipophilen Metaboliten 8 und 9

Probenvorbereitung:

Die nach AAV 3 gewonnenen Extrakte werden direkt gaschromatographisch vermessen.

Gaschromatographie:

GC-System 3

Säule: HP-5 MS, 30 m x 0.25 mm i. D., 0.25 µm Filmdicke, Hewlett Packard

Trägergas: Helium

Druck: 70 kPa

Split/purge off time: 2 min

Injektortemperatur: 270°C

Transferline temperature: 280°C

Detektortemperatur: 270°C

Scan Modus: 40 – 550 m/z

Injektionsvolumen: 1 µl

Temperaturprogramm:

60 °C, 2 min, 40 °C/min bis 110 °C, 13 °C/min bis 300 °C, 15 min

Gesamtdauer: 32.87 min

Retentionszeit

Verbindung	Retentionszeit (in min)
7	14.4
8	9.7

7.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Methylierung von Carbonsäuren unter Verwendung von Diazomethan

Die Carbonsäure wird in wenig Methanol p. A. gelöst und unter Rühren solange Diazomethanlösung[83] hinzugefügt, bis eine Gelbfärbung der Lösung bestehen bleibt. Es wird über mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend überschüssiges Diazomethan (Lösung ist weiterhin gelb gefärbt) durch Zugabe eines Tropfen Eisessigs entfernt. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand umkristallisiert bzw. durch Destillation gereinigt.

AAV 2: Isolierung von Carbonsäuren (z. B. **9**) mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie

1,0 ml Probenmaterial wird über eine Säule, gefüllt mit 3 g stark saurem Kationenaustauscher (Merck Ionenaustauscher I), gegeben und die Säule mit 10 ml dem. Wasser gewaschen. Das Eluat wird auf eine zweite Säule, gefüllt mit 5 ml stark basischem Anionenaustauscher (Merck Amberlite IRA-402), gegeben. Die Säule wird zuerst mit 10 ml dem. Wasser, danach mit 10 ml Methanol gespült. Anschließend wird nacheinander eluiert mit:

Methanol/Ameisensäure: 95:5, 10 ml, waschen mit 10 ml Methanol

Methanol/Trifluoressigsäure: 95:5, 10 ml, waschen mit 10 ml Methanol

Durchflussrate 2 ml/min

Beide Eluate werden wie folgt bearbeitet:

Zur Trockene einengen bei 40 °C im Vakuum am Rotationsverdampfer, in 5 ml Methanol lösen und mit einem Überschuss an etherischer Diazomethanlösung versetzen. Der Ansatz wird über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand in 1.0 ml Methanol gelöst. Diese Lösung wird mit ca. 300 mg

---

[83] Herstellung siehe T. J. de Boer, H. J. Backer, *Organic Synthesis Coll. Vol. 4*, **1963**, 250 - 253

Natriumsulfat getrocknet und anschließend bei 14 000 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert.

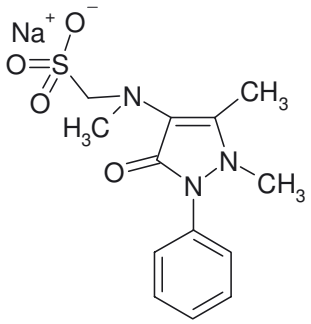
AAV 3: Extraktion von lipophilen Metaboliten (z. B. **7** und **8**) per Flüssig/Flüssig-Extraktion

0.7 ml Probenmaterial wird mit 0.1 ml 0.5-molarer Natriumhydrogenphosphat-Lösung auf pH = 8 – 9 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml Dichlormethan/Diethylether 7:3 wird 1 min geschüttelt (Vortex) und anschließend 10 min bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die organische Phase wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgetrennt und die Allantoisflüssigkeit durch Zugabe von 0.1 ml einer 10-proz. Weinsäurelösung auf pH = 3 – 4 angesäuert. Erneut wird mit 1 ml Dichlormethan/Diethylether 7:3 extrahiert. Die organischen Phasen werden mit 300 mg Natriumsulfat getrocknet, und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels unter Stickstoffstrom wird der Rückstand in 0.1 ml Methanol p.A. aufgenommen

Die Lösung wird gaschromatographisch vermessen.

7.6 Charakterisierung der Substanzen

Natrium-[(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1*H*-pyrazol-4-yl)-N-methylamino]-methansulfonat (1)

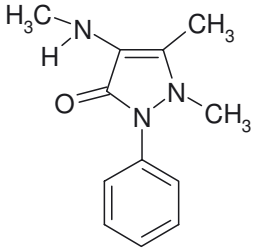


Metamizol (INN)

Bezugsquelle: ehemalige Hoechst AG

Schmp.: 235 °C (unter Zersetzung)

1,2-Dihydro-1,5-dimethyl-4-methylamino-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on (2)



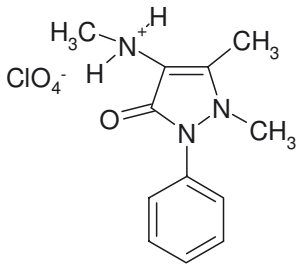
4-Methylaminophenazon

Bezugsquelle: Firmenerwerb

Schmp.: 82 °C

Rf (DC): 0.18 (FM 2), 0.04 (FM 3), 0.08 (FM 5), 0.02 (FM 6)

1,2-Dihydro-1,5-dimethyl-4-methylamino-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on-hydroperchlorat (2a)



4-Methylaminophenazon

als Perchlorat

Darstellung:

4g Metamizol-Na (12 mmol) werden in 100 ml 20-proz. Salzsäure 30 min gekocht. Nach dem Abkühlen wird mit 10-proz. NaOH alkalisiert und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert.

Die organischen Phasen werden getrocknet und eingeengt.

Der Rückstand (gelbes Öl) wird in Ethanol gelöst und bis auf pH 1 mit 70-proz. etherischer Perchlorsäure-Lösung versetzt. Durch Zugabe von Diethylether wird das gebildete Perchlorat gefällt.

Umkristallisation aus Acetonitril/Diethylether

Ausbeute:	96 % d. Th.
Schmp.:	225 °C (unter Zersetzung)
R_f-Wert:	0.18 (FM 2), 0.04 (FM 3), 0.08 (FM 5), 0.02 (FM 6)
IR (KBr),[cm^{-1}]:	3431 (w), 3088 (m), 2681 (m), 2459 (m), 2410 (m), 1636 (vs), 1492 (s), 1460 (s), 1414 (s), 1375 (m), 1325 (s), 1120 (vs), 1038 (s), 928 (m), 910 (m), 767 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, CD_3CN) [ppm]:

7.3 – 7.6	m	5 H	arom H
4.8	s, breit	2 H	4-N$\underline{H}_2^+$-CH_3 (aust. mit D_2O)
3.18	s	3 H	4-NH-C$\underline{H}_3$
2.95	s	3 H	2-N-CH_3
2.34	s	3 H	3-C-CH_3

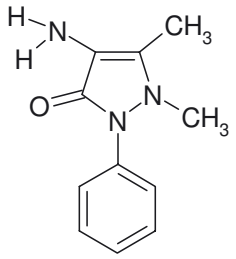
MS: m/z (rel. Intensität): 217 $M^{+\bullet}$ (26.7), 215 (52.5), 187 (16.5), 123 (90.7), 121 (68.5), 83 (55), 77 (64.1) 56 (100)

Elementaranalyse:

$C_{12}H_{16}Cl_1N_3O_5$	(317.70)	ber.:	C	45.37	H	5.08	N	13.23
		gef.:	C	45.48	H	5.17	N	13.25

4-Amino-1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on (3)

4-Aminophenazon, 4-Aminoantipyrin



Bezugsquelle: Fluka

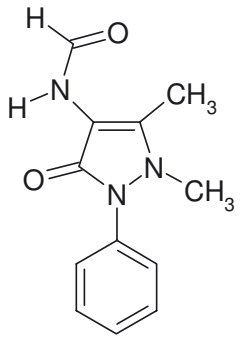
Schmp.: 110 °C

R_f (DC): 0,05 (FM 3); 0,46 (FM 7);0,17 (FM 8); 0,17 (FM 9)

4-Formylamino-1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on (4)

4-Formylaminophenazon,

4-Formylaminoantipyrin



Darstellung:

2 g **3** (9.8 mmol) werden mit 17,5 g Ameisensäure p.A. 7 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wird die überschüssige Ameisensäure abdestilliert und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Nach Alkalisieren mit Natriumhydrogencarbonat und Zugabe von 1 g Natriumchlorid wird fünfmal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeengt.

Umkristallisation aus Aceton.

Ausbeute:	85% d. Th.
Schmp.:	192 °C (189 °C Lit.[84])
R_f-Wert:	0,04 (FM 3), 0,46 (FM 7), 0,17 (FM 8), 0,17 (FM 9)
IR (KBr),[cm^{-1}]:	3178 (vs), 3110 (vs), 3054 (vs), 2876 (s), 1692 (vs, breit), 1662 (vs), 1620 (vs), 1590 (vs), 1495 (vs), 1480 (vs), 1452 (s), 1434 (s), 1375 (s), 1308 (vs), 1269 (vs), 1174 (m), 1164 (m), 1152 (m), 1135 (s), 1025 (s), 938 (m), 918 (m), 872 (m), 774 (s), 743 (vs), 720 (s), 694 (s)

[84] J. Halberkann, F. Fretwurst, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **1950**, *285*, 97 - 127

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

9.32	s	⅔ H	N<u>H</u>-CH_3 (65 % Rotamer 1, aust. mit D_2O)
9.15	d	⅓ H	N<u>H</u>-CH_3 (35 % Rotamer 2, aust. mit D_2O)
8.21	d	⅓ H	4-N-C<u>H</u>O (35 % Rotamer 2, ^3J = 11.2 Hz)
8.14	d	⅔ H	4-N-C<u>H</u>O (65 % Rotamer 1, ^3J = 1.5 Hz)
7.3 – 7.6	m	5 H	arom. H
3.05	s	3 H	2-N-C<u>H</u>$_3$
3.04	s		
2.22	s	1 H	3-C-C<u>H</u>$_3$ (35 % Rotamer 2)
2.15	s	2 H	3-C-C<u>H</u>$_3$ (65 % Rotamer 1)

MS: m/z (rel. Intensität): 231 $M^{+\bullet}$ (2.2), 203 (4.5), 107 (8.4), 106 (12.7), 84 (18.6), 83 (14.1), 77 (11.6), 57 (45.6), 56 (100)

Elementaranalyse:

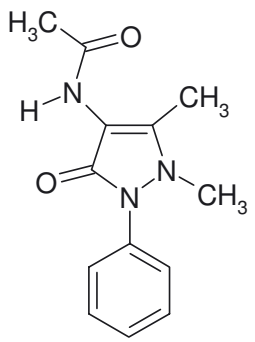
$C_{12}H_{13}N_3O_2$	(231.26)	ber.:	C	62.33	H	5.67	N	18.17
		gef.:	C	62.15	H	5.72	N	17.98

4-Acetylamino-1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on

4-Acetylaminophenazon

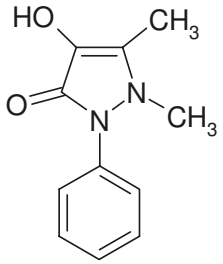
Bezugsquelle: EGA-Chemie

Schmp.: 201 °C



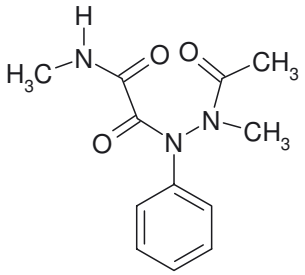
1,2-Dihydro-4-hydroxy-1,5-dimethyl-2-phenyl-3*H*-pyrazol-3-on (6)

4-Hydroxyphenazon, 4-Hydroxyantipyrin



Bezugsquelle: Aldrich

Schmp.: 184 °C



Methylaminooxoessigsäure-2-acetyl-2-methyl-1-phenylhydrazid (7)

Darstellung:

3,4 mmol **2** (747,8 mg) werden in 60 ml Methanol gelöst und mit 24 ml Wasser versetzt. Unter Rühren werden 2,57 g Natriummetaperiodat (12 mmol) gelöst in 36 ml Wasser hinzugetropft. Anschließend wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 60 ml Wasser wird mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeengt.

Rohausbeute: gelbes Öl

Aufreinigung durch SC.

Elutionsmittel: Petrolether/Isopropanol 70:30 und Dichlormethan/Ethanol 92:8

Umkristallisation aus Dichlormethan/Petrolether

Ausbeute: 41 % d. Th.

Schmp.: 109 °C (103 – 106 °C Lit.[82])

R_f-Wert: 0,44 (FM 2); 0,25 (FM 3), 0,21 (FM 5); 0,07 (FM 6)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3335 (m), 23069 (m), 1711 (vs), 1620 (s), 1514 (s), 1412 (m), 1289 (s)

Das **^{1}H-NMR-Spektrum** ist aufgrund der Existenz mehrerer Rotationsisomere schwierig zu interpretieren (siehe Literatur[82])

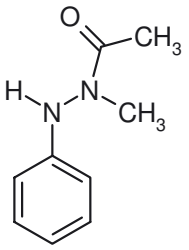
GC-MS: m/z (rel. Intensität): 249 $M^{+\bullet}$ (3.7), 207 (20.4), 191 (79.9), 164 (36.8), 149 (5.3), 122 (65.2), 121 (100.0), 119 (8.8), 107 (20.1), 93 (9.7), 92 (22.4), 91 (8.8), 77 (22.3), 65 (7.9), 58 (35.4), 51 (10.0)

(System 3)

Elementaranalyse:

$C_{12}H_{15}N_3O_3$	(249.27)	ber.:	C	57.82	H	6.07	N	16.86
		gef.:	C	57.93	H	6.17	N	16.87

1-Methyl-2-phenyl-acetohydrazid (8)



Darstellung:

4g **1** (12 mmol) werden in 100 ml 20-proz. Salzsäure 30 min gekocht. Nach dem Abkühlen wird mit 10-proz. Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird in 100 ml 2-proz.-Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst, innerhalb 1 h mit 100 ml einer 0.6-proz. Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt.
Nach 24 h wird mit 10-proz. NaOH alkalisiert und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand der Dichlormethanphasen mittels SC aufgetrennt.

Elutionsmittel: Petrolether/Isopropanol 95:5

Umkristallisation aus Aceton/Petrolether

Ausbeute: 40 % d. Th.

Schmp.: 93 °C (90 °C Lit.[39])

R_f-Wert: 0,54 (FM 2); 0,31 (FM 3); 0,30 (FM 5), 0,15 (FM 6)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3230 (s), 3128 (m), 3064 (s), 2965 (m), 1636 (vs), 1595 (s), 1544 (m), 1494 (s), 1384 (s), 1262 (s), 751 (s), 692 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

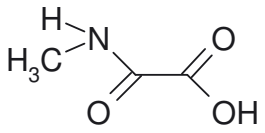
8.12	s	1 H	-N-H (aust. mit D_2O)
6.6 – 7.3	m	5 H	arom. H
2.97	s	3 H	-N-CH_3
1.97	s	3 H	-CO-CH_3

MS: m/z (rel. Intensität): 164 $M^{+\bullet}$ (11.6), 122 (36.0), 121 (43.8), 107 (41.9), 93 (36.4), 92 (100), 77 (41.2), 65 (90.3), 51 (57.9)

Elementaranalyse:

$C_9H_{12}N_2O$	(164.21)	ber.:	C	65.83	H	7.37	N	17.06
		gef.:	C	65.89	H	7.35	N	17.09

Methyloxamidsäure (9)



Darstellung:

Aus Metamizol

4g **1** (12 mmol) werden in 100 ml 20-proz. Salzsäure 30 min gekocht. Nach dem Abkühlen wird mit 10-proz. Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird in 100 ml 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst, innerhalb 1 h mit 100 ml einer 0.6-proz. Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wird mit 10-proz. NaOH alkalisiert und mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert.

Die wässrige Phase wird mit 10-proz. HCl auf pH 6-7 eingestellt und das überschüssige Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Katalase entfernt. Die Lösung wird bis auf 10 ml eingeengt, mit 10-proz. Salzsäure auf pH 1 angesäuert und bis zur Trockene eingeengt. Der kristalline Rückstand wird mit Magnesiumsulfat verrieben, bis ein trockenes Pulver entsteht. Dieses wird mehrmals mit Diethylether extrahiert, die vereinigten Etherphasen getrocknet und einrotiert. Umkristallisation aus Aceton/Petrolether

Ausbeute: 39 % d. Th.

2. Aus Oxalsäurediethylester

14.6 g Oxalsäurediethylester (0.1 mol) werden in 50 ml Ethanol gelöst, 0.1 mol Methylamin (7.77 g einer 40-proz. Lösung) hinzugefügt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 0.1 mol NaOH gelöst in ca. 50 ml H_2O alkalisiert und eine Stunde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und abkühlt. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser auf 200 ml verdünnt und mit Chloroform extrahiert.

Die Wasserphase wird mit 10-proz. Salzsäure angesäuert und eingeengt, der kristalline Rückstand mit Magnesiumsulfat verrieben und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeengt.

Umkristallisation aus Aceton/Petrolether

Ausbeute	40 % d. Th.
Schmp.:	150 – 151 °C (ca. 140 °C Lit.[45])
IR (KBr),[cm^{-1}]:	3359 (vs), 3291 (s), 3188 (s), 1758 (vs), 1677 (vs), 1560 (m), 1411 (s), 1363 (vs), 1256 (m), 1185 (vs), 1032 (w), 864 (m), 842 (m), 810 (m), 735 (m)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

13.6	s, sehr breit	1 H	-COOH (aust. mit D_2O)
8.8	s, breit	1 H	-N<u>H</u>-CH_3 (aust. mit D_2O)
2.7	d	3 H	-NH-C<u>H</u>$_3$ (^3J = 4.84)

^{13}C-NMR (50 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

25.76	-NH-<u>C</u>H_3
158.79	-<u>C</u>O-NH-
	Zuordnung erfolgte durch Auswertung des HMBC-Spektrums
161.96	-<u>C</u>OOH
	Zuordnung erfolgte durch Auswertung des HMBC-Spektrums

HMBC (500 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

Das C-Atom bei 158.79 ppm verursacht ein deutliches Kreuzsignal mit den H-Atomen der Methylgruppe, während das C-Atom bei 161.96 ppm keine Kopplung zeigt. Aus diesem Grund wurde das Signal bei 158.79 ppm dem Amidkohlenstoff zugeordnet.

Berechnung der Partialladungen mit „Spartan“ Basissatz 631 G*

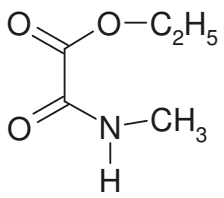
Atom	Partialladung	Atom	Partialladung
-<u>C</u>OOH	**0.717339**	-CO<u>N</u>CH_3	-0.582265
-C<u>O</u>OH	-0.603488	-CON<u>C</u>H_3	0.012808
-CO<u>O</u>H	-0.677341		0.066014
-COO<u>H</u>	0.503531	-CONC<u>H</u>$_3$	0.069492
-<u>C</u>ONCH_3	**0.629341**		0.069394
-C<u>O</u>NCH_3	-0.549222		

MS: m/z (rel. Intensität): 103 $M^{+\bullet}$ (3.3), 60 (10.1), 59 (43.3), 58 (84.1), 56 (23.9), 44 (100)

Elementaranalyse:

$C_3H_5NO_3$	(103.08)	ber.:	C	34.96	H	4.89	N	13.59
		gef.:	C	34.67	H	4.88	N	13.32

Methyloxamidsäureethylester (<u>12</u>)



Darstellung (Nebenprodukt der Synthese von <u>9</u>):

14.6 g Oxalsäurediethylester (0.1 mol) werden in 50 ml Ethanol gelöst, 0.1 mol Methylamin (7.77 g einer 40-proz. Lösung) hinzugefügt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand durch eine Kugelrohrdestillation gereinigt.

Ausbeute: 85 % d. Th.

Schmp.: 24 °C (24°C Lit.[85])

Sdp.: 170 °C bei10 mbar
(243 – 244 °C bei 1013 mbar Lit.[45])

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3429 (vs), 3024 (vs), 3013 (vs), 2986 (m), 2942 (m), 2906 (w), 1759 (s), 1716 (vs), 1537 (vs), 1466 (m), 1417 (s), 1394 (w). 1371 (s), 1304 (vs), 1229 (vs), 1200 (s), 1046 (vs)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d$_6$) [ppm]:

8.8	s, breit	2 H	-N<u>H</u>-CH$_3$ (aust. mit D$_2$O)
4.22	q	2 H	-O-C<u>H</u>$_2$-CH$_3$ (^{3}J = 7.10)
2.66	d	3 H	-NH-C<u>H</u>$_3$ (^{3}J = 4.82)
1.26	t	3 H	-O-CH$_2$-C<u>H</u>$_3$ (^{3}J = 7.10)

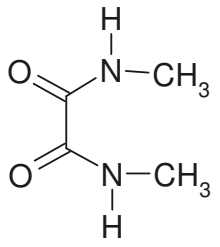
MS: m/z (rel. Intensität): 132 M$^{+\bullet}$ (54.0), 104 (48.2), 102 (4.1), 86 (5.4), 76 (3.1), 75 (4.6), 74 (2.5), 72 (3.5), 59 (100.0), 56 (11.2), 47 (29.5), 45 (45.5), 43 (12.8), 42 (13.2)

Elementaranalyse:

$C_5H_9N_1O_3$	(131.13)	ber.:	C	45.80	H	6.92	N	10.68
		gef.:	C	45.64	H	7.22	N	10.77

[85] Tierie, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, , **1933**, *52*, 357 - 359

N,N'-Dimethyloxamid (13)



Darstellung (Nebenprodukt der Synthese von 9):

14.6 g Oxalsäurediethylester (0.1 mol) werden in 50 ml Ethanol gelöst, 0.1 mol Methylamin (7.77 g einer 40-proz. Lösung) hinzugefügt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 0.1 mol NaOH gelöst in ca. 50 ml Wasser alkalisiert und eine Stunde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und abkühlt. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser auf 200 ml verdünnt, und mit Chloroform extrahiert.

Die vereinigten Chloroformphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockene eingeengt.

Unkristallisation aus Diethylether/Petrolether

Ausbeute: 14 % d. Th.

Schmp.: 215 °C (215 °C Lit.[86])

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3311 (vs), 3072 (m), 2943 (m), 2883 (m), 2804 (w), 2545 (w), 2344 (vw), 1660 (vs), 1533 (s), 1458 (s), 1405 (s), 1236 (s). 1154 (s), 987 (w), 775 (s), 538 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d$_6$) [ppm]:

8.7	s, breit	2 H	-CO-N<u>H</u>-CH$_3$ (aust. mit D$_2$O)
2.66	d	6 H	-CO-NH-C<u>H</u>$_3$ (^{3}J = 4.86)

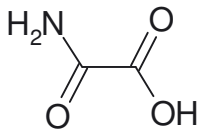
MS: m/z (rel. Intensität): 116 M$^{+\bullet}$ (36), 88 (18.9), 59 (43.2), 58 (100), 44 (44.1)

[86] H. O. Desseyn, B. J. van der Veken, M. A. Herman, *Spectrochim. Acta Part A*, **1977**, *33*, 633 - 641

Elementaranalyse:

$C_4H_8N_2O_2$	(116.12)	ber.:	C	41.37	H	6.94	N	24.13
		gef.:	C	41.26	H	6.69	N	24.04

Oxamidsäure (14)



Bezugsquelle: Aldrich

Schmp.: 220 °C

^{13}C-NMR (50 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

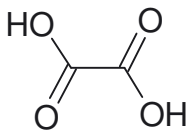
160.54

162.51

Berechnung der Partialladungen mit „Spartan“ Basissatz 631 G*

Atom	**Partialladung**	**Atom**	**Partialladung**
-<u>C</u>OOH	**0.694084**	-C<u>O</u>NH$_2$	-0.574731
-C<u>O</u>OH	-0.575830	-CO<u>N</u>H$_2$	-0.014232
-CO<u>O</u>H	-0.671976	-CON<u>H</u>$_2$	0.420673
-COO<u>H</u>	0.497643		0.458994
-<u>C</u>ONH$_2$	**0.765374**		

Oxalsäure (15)



Bezugsquelle: Aldrich

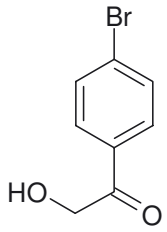
Schmp.: 191 °C

Berechnung der Partialladungen mit „Spartan“ Basissatz 631 G*

Atom	**Partialladung**	**Atom**	**Partialladung**
1. Carboxylgruppe		2. Carboxylgruppe	
-COOH	0.723461	-COOH	0.724743
-COOH	-0.550259	-COOH	-0.550150
-COOH	-0.676568	-COOH	-0.676704
-COOH	0.502740	-COOH	0.502737

1-(4-Bromphenyl)-2-hydroxy-ethanon (16)

p-Bromphenacylalkohol



Darstellung (in Anlehnung an Literatur[87])**:**

405 mg Triethylamin (4 mmol), gelöst in 8 ml absolutem Aceton werden mit 412 mg **9** (4 mmol) neutralisiert und zu dieser Mischung eine Lösung von 556 mg p-Bromphenacylbromid (2 mmol) in 12 ml trockenem Aceton gegeben. Man lässt 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen, verdünnt mit 40 ml Wasser und saugt den ausgefallenen Niederschlag ab.

Umkristallisation aus Ethanol

Ausbeute: 46 % d. Th.

Schmp.: 139 °C (138 – 140 °C Lit.[88])

[87] *Organikum*, **2001**, *21. Auflage*, Wiley-VCH Verlag Weinheim, 242, Variante A

[88] J. F. Grove, P. J. Suter, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3350 - 3351

R_f-Wert: 0.58 (FM 2)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3421 (s), 3380 (s), 1718 (w), 1687 (s), 1681 (s), 1586 (s), 1412 (m), 1297 (w), 1276 (w), 1231 (m), 1191 (m), 1110 (m), 1070 (m), 978 (m), 823 (m)

^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) [ppm]:

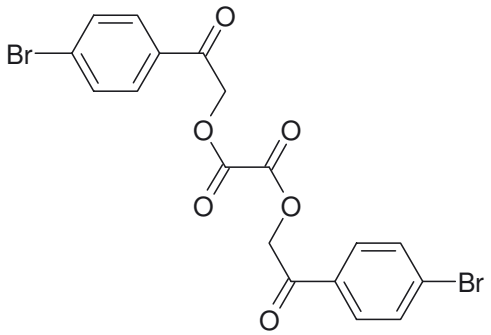
7.9 – 7.7	m	4 H	arom H
5.15	t	1 H	$-CH_2-O\underline{H}$
			(^3J = 5.9 Hz)
4.77	d	2 H	$-C\underline{H_2}-OH$
			(^3J = 5.4 Hz)

MS: m/z:
(rel. Intensität) 216 $M^{+\bullet}$ (1.5), 214 (1.6), 202 (3.1), 202 (2.9), 185 (100), 183 (99.4), 157 (50.5), 155 (51.7), 105 (3.6), 104 (6.0), 77 (17.0), 76 (58.1), 75 (54.0), 74 (25.6), 51 (18.4), 50 (56.0)

Elementaranalyse

C_7H_7BrO	(187.04)	ber.:	C	44.68	H	3.28	N	0.00
		gef.:	C	44.82	H	3.15	N	0.00

Oxalsäure-di-(p-bromphenacyl)-ester (<u>17</u>)



Darstellung:

In Anlehnung an Literatur[46]

180.08 mg **10** (2 mmol) werden in 10 ml trockenem Ethylenglykolmonoethylether (Methylcellusolve) suspendiert und durch Zugabe einer 1-proz. Kaliumhydroxidlösung in Methylcellusolve gegen Phenolphthalein neutralisiert. Nach Zugabe von 1.39 g p-Bromphenacylbromid (5 mmol) gelöst in 20 ml Methylcellusolve wird unter Rühren eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Niederschlag abfiltriert.

Umkristallisation aus Ethanol

Ausbeute: 40 % d. Th.

Schmp.: 253 °C (244 – 245 °C Lit.[46])

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3439 (w, br), 3090 (vw), 3013 (v), 2952 (vw), 1751 (s), 1691 (s), 1585 (m), 1432 (w), 1399 (w), 1384 (w), 1369 (w), 1283 (w), 1239 (w), 1187 (s), 1071 (m), 1023 (vw), 1006 (w), 942 (w), 835 (w), 812 (w), 772 (w), 702 (vw)

^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) [ppm]:

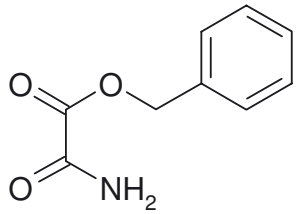
7.9 – 7.8	d	4 H	arom H
7.8 – 7.7	d	4 H	arom H
5.63	s	4 H	$-CH_2-$

MS: m/z (rel. Intensität): 484 $M^{+\bullet}$ (1.1), 405 (1.5), 403 (1.4), 185 (97.3), 183 (100), 171 (8.7), 169 (9.4), 157 (13.9), 155 (15.1), 104 (4.9), 90 (9.2), 89 (5.8), 77 (1.8), 76 (13.9), 75 (9.3), 74 (1.6), 63 (1.4), 57 (1.8), 51 (2.0), 50 (5.7), 45 (2.3), 44 (1.9), 43 (1.1)

Elementaranalyse:

$C_{18}H_{12}Br_2O_6$	(484.10)	ber.:	C	44.66	H	2.50	N	0.00
		gef.:	C	44.50	H	2.21	N	0.00

Oxamidsäurebenzylester (18)



Darstellung:

500 mg 14 (5.6 mmol) und 910 mg CDI (5.6 mmol) werden in 20 ml absolutem DMF gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 610 mg Benzylalkohol (5.6 mmol) hinzugefügt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von ca. 100 ml Wasser wird dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert.

Umkristallisation aus Dichlormethan/n-Hexan 70:30

Ausbeute: 60 % d. Th.

Schmp.: 132 °C (132°C Lit.[89])

R_f-Wert: 0,09 (FM 4)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3383 (s), 3250 (br, m), 1736 (vs), 1685 (vs), 1457 (w), 1408 (m), 1366 (s), 1254 (m), 1230 (s), 1218 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) [ppm]:

7.5 – 7.3	m	5 H	arom. H
6.9	s, breit	1 H	$-NH_2$ (aust. mit D_2O)
6.0	s, breit	1 H	$-NH_2$ (aust. mit D_2O)
5.32	s	2 H	$-CH_2-$

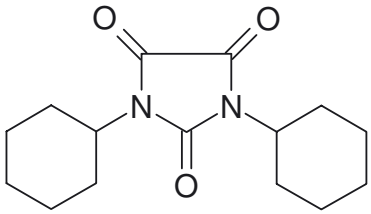
MS: m/z (rel. Intensität): 180 $M+1^{+\bullet}$ (0.3), 152 (1.7), 107 (13.8), 92 (8.5), 91 (100), 65 (12.7), 51 (4.9), 44 (14.7)

[89] O. Wallach, A. Liebmann, *Chem. Ber.*, **1880**, *13*, 506 - 511

Elementaranalyse:

$C_9H_9N_1O_3$	(179.18)	ber.:	C	60.33	H	5.06	N	7.82
		gef.:	C	60.45	H	5.19	N	7.62

Dicyclohexylimidazolidin-2,4,5-trion (19)



Darstellung:

1. Aus 14 und DCC

890 mg **14** (10 mmol) werden in 20 ml absolutem DMF gelöst. Nach der Zugabe von 50 mg DMAP und 1,08 g Benzylalkohol (10 mmol) werden 2.27g DCC (11 mmol) unter Eiskühlung hinzugefügt. Nach Rühren bei Raumtemperatur über 12 h wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit Dichlormethan mehrfach extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte werden mit 1-proz. Schwefelsäurelösung und Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und Chloroform abdestilliert.

Umkristallisation aus Ethanol

Ausbeute: 20 % d. Th.

2. Aus 14, DCC und DCU

112 mg DCU (0.5 mmol), 45 mg **14** (0.5 mmol) und 103 mg DCC (0,5 mmol) werden in 10 ml absolutem DMF gelöst und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat wie unter **1.** aufgearbeitet.

Ausbeute: 86 % d. Th.

Schmp.: 174 °C (174 – 175 °C Lit.[90])

[90] H. Ulrich, A.A.R. Sayigh. *J. Org. Chem.*, **1965**, *30*, 2781 - 2783

R_f-Wert: 0,64 (FM 2), 0,49 (FM 5)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 2937 (vs), 2856 (s), 1736 (br, s), 1450 (m), 1412 (vs), 1372 (vs), 1347 (s), 1260 (m), 1176 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, $CDCl_3$) [ppm]:

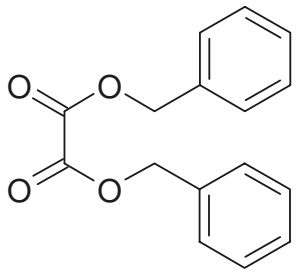
4.0	tt	2 H	-N-CH-
			($^3J_{1a,2a}$ = 12.2 Hz, $^3J_{1a,2e}$ = 3.9 Hz)
1.2 – 2.2	m	20 H	$-CH_2-$

MS: m/z (rel. Intensität): 278 $M^{+\bullet}$ (6.3), 198 (34.4), 197 (100), 116 (61.7), 115 (88.3), 83 (88.5), 82 (78.8), 67 (78.2), 56 (55.4), 55 (82.0)

Elementaranalyse:

$C_{15}H_{22}N_2O_3$ (284.16)	ber.:	C 64.73	H 7.97	N 10.06
	gef.:	C 64.74	H 7.82	N 10.30

Oxalsäuredibenzylester (<u>20</u>)



Darstellung:

1. Aus Oxalsäure (<u>15</u>) unter Verwendung von CDI

270 mg **<u>15</u>** (3 mmol) und 973 mg CDI (6 mmol) werden in 50 ml absolutem DMF gelöst und 30 min gerührt. Nach der Zugabe von 649 mg Benzylalkohol (6 mmol) wird vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wird mit Wasser verdünnt und mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden mit 1-proz. Schwefelsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand bei 9 mbar und 70 – 80 °C am Kugelrohr destilliert. Der Destillationsrückstand wird aus umkristallisiert.

Ausbeute: 20 % d. Th.

2. Aus Oxalylchlorid

1.27 g Oxalylchlorid (10 mmol) und 2.16 g Benzylalkohol (20 mmol) werden unter Eiskühlung in wasserfreiem DMF gelöst und 15 min gerührt. Der Reaktionsansatz wird auf Eis gegossen, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert und in Diethylether gelöst. Die Etherlösung wird mit 1-proz. Schwefelsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet.

Ausbeute: 35 % d. Th.

Schmp.: 79,5 °C (80 °C Lit.[91])

R_f-Wert: 0,49 (FM 4), 0,63 (FM 10)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3062 (m), 3036 (m), 1763 (vs), 1499 (w), 1456 (m), 1377 (m), 1237 (vs), 1220 (vs), 1213 (vs)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d6) [ppm]:

7.3 – 7.4	m	10 H	arom. H
5.30	s	4 H	$-CH_2-$

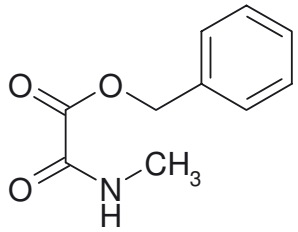
MS: m/z (rel. Intensität) 270 $M^{+\bullet}$ (3.0), 180 (17.8), 179 (7.4), 107 (6.9), 92 (14.2), 91 (100), 77 (5.8), 65 (14.3)

Elementaranalyse:

$C_{16}H_{14}O_4$	(270.28)	ber.:	C	71.10	H	5.22	N	0.00
		gef.:	C	70.96	H	5.30	N	0.00

[91] J. Bergman, P.-O. Norby, U. Tilstam, L. Venemalm, *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 6113 - 6124

Methyloxamidsäurebenzylester (21)



Darstellung:

500 mg **9** (4.8 mmol) und 786 mg CDI (4.8 mmol) werden in 20 ml absolutem DMF gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 262 mg Benzylalkohol (2.4 mmol) hinzugefügt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von ca. 100 ml Wasser wird dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird am Kugelrohr destilliert, um überschüssigen Benzylalkohol zu entfernen.

Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether

Ausbeute: 65 % d. Th.

Schmp.: 49 °C

R_f-Wert: 0,10 (FM 4)

IR (KBr),[cm^{-1}]: 2937 (vs), 2856 (s), 1736 (br, s), 1450 (m), 1412 (vs), 1372 (vs), 1347 (s), 1260 (m), 1176 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d6) [ppm]:

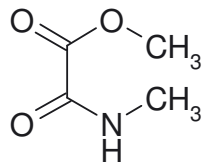
8.9	s, breit	1 H	-N<u>H</u>-CH_3 (aust. mit D_2O)
7.3 – 7.5	m	5 H	arom. H
5.24	s	2 H	-CH_2-
2.67	d	3 H	-NH-C<u>H</u>$_3$ (^3J = 4.8 Hz)

MS: m/z (rel. Intensität): 278 $M^{+\bullet}$ (6.3), 198 (34.4), 197 (100), 116 (61.7), 115 (88.3), 83 (88.5), 82 (78.8), 67 (78.2), 56 (55.4), 55 (82.0)

Elementaranalyse:

$C_{10}H_{11}N_1O_3$	(193.20)	ber.:	C	62.17	H	5.74	N	7.25
		gef.:	C	61.95	H	5.70	N	7.24

Methyloxamidsäuremethylester (22)



Darstellung:

Siehe AAV 1

Ausbeute: 100 % d. Th.

Schmp.: 78 °C (81 – 81.7 °C Lit.[92])

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3339 (s), 2955 (w), 1734 (m), 1688 (vs), 1543 (m), 1448 (w), 1440 (w), 1413 (m), 1301 (s), 1223 (s), 1056 (m)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d6) [ppm]:

8.9	s, breit	1 H	-N<u>H</u>-CH_3
3.76	s	3 H	-O-CH_3
2.66	d	3 H	-NH-C<u>H</u>$_3$ (^3J = 4.8)

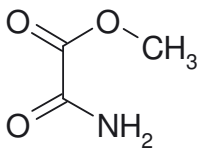
MS: m/z (rel. Intensität): 117 $M^{+\bullet}$ (2.8), 89 (18.5), 60 (6.0), 59 (10.7), 58 (100), 44 (7.1)

Elementaranalyse:

$C_4H_7NO_3$	(117.10)	ber.:	C	41.03	H	6.03	N	11.96
		gef.:	C	40.89	H	5.95	N	11.67

[92] M. Schläpfer-Dähler, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2321 - 2328

Oxamidsäuremethylester (23)



Darstellung:

Siehe AAV 1

Ausbeute: 100 % d. Th.

Schmp.: 117 °C (115 – 117 °C Lit.[93])

IR (KBr),[cm^{-1}]: 3387 (vs), 3229 (s, br), 2960 (m), 1738 (vs), 1682 (vs), 1447 (s), 1395 (s),

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d6) [ppm]:

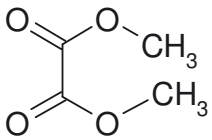
8.2	s, breit	1 H	-N$\underline{H}_2$
7.9	s, breit	1 H	-N$\underline{H}_2$
3.75	s	3 H	-O-C$\underline{H}_3$

MS: m/z (rel. Intensität): 103 $M^{+\bullet}$ (4.3), 75 (14.4), 60 (5.6), 59 (3.0), 45 (8.4), 44 (100), 43 (4.3)

Elementaranalyse:

$C_3H_5NO_3$	(103.08)	ber.:	C	34.96	H	4.89	N	13.59
		gef.:	C	34.86	H	4.77	N	13.53

Oxalsäuredimethylester (24)



Ausbeute: 100 %

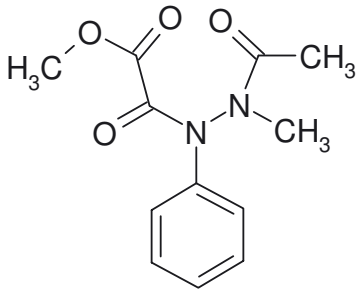
Sdp.: 163 °C

Die spektralen Daten entsprechen der Vergleichssubstanz: Aldrich 13,562-3

---

[93] H. Nomura, T. Ishiguro, S. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 381 - 386

(2-Acetyl-2-methyl-1-phenyl-hydrazino)-oxoessigsäure-methylester (25)



Darstellung durch Methylierung von 26:

1. Herstellung von 26 aus Metamizol (1)

1.05 g **6** (3 mmol) werden in 75 ml Puffer (pH = 7.5) gelöst. Zu dieser Lösung werden 30 mg HRP in 75 ml Puffer gegeben. Danach werden 3.6 ml 30-proz. Wasserstoffperoxidlösung (36 mmol) in 300 ml Wasser sehr langsam hinzugetropft und der Reaktionsansatz anschließend über 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird zuerst mehrfach mit Dichlormethan extrahiert und danach der pH-Wert mit einer 5-proz. Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH = 3 – 4 eingestellt und wiederum mit Dichlormethan extrahiert. Die verbleibende Wasserphase wird am Rotationsverdampfer im Vakuum bei maximal 40 °C zur Trockene eingeengt und der Trockenrückstand mit Chloroform/Isopropanol 9:1 extrahiert. Diese Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel abdestilliert. Zurück bleibt 0.25 g zähes, gelbes Öl (**26**)

Ausbeute (26): 35 % d. Th.

2. Herstellung von 26 aus 4-Hydroxyantipyrin (6)

1.02 g **6** (5 mmol) werden in 100 ml Puffer (pH = 7.5) gelöst. Zu dieser Lösung werden 17 mg HRP in 30 ml Puffer gegeben und 100 ml Wasser hinzugefügt. Danach werden 3 ml 30-proz. Wasserstoffperoxidlösung (30 mmol) in 500 ml Wasser sehr langsam hinzugetropft und der Reaktionsansatz anschließend über 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit zuerst mehrfach mit Dichlormethan extrahiert und danach der pH-Wert mit einer 5-proz. Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH = 3 – 4 eingestellt und wiederum mit Dichlormethan extrahiert. Die verbleibende Wasserphase wird am Rotationsverdampfer im Vakuum bei maximal 40 °C zur Trockene eingeengt und der Trockenrückstand mit Chloroform/Isopropanol 9:1 extrahiert. Diese Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel abdestilliert. Zurück bleibt 1.0 g zähes, gelbes Öl

Ausbeute (26): 85 % d. Th.

Herstellung von 25 durch Umsetzung von 26 mit Diazomethan

Siehe AAV 1

Die Aufreinigung des Methylesters erfolgt durch Säulenchromatographie.

Elutionsmittel: Toluol/Ethylacetat 70:30

Ausbeute: 15 % der Th.

IR (CH_3Cl),[cm^{-1}]: 3683 (w), 3020 (vs), 2956 (vw), 2399 (s), 1751 (vs), 1704 (vs), 1682 (vs, br), 1493 (s), 1437 (s), 1421 (s), 1375 (vs), 1341 (s), 1218 (vs, br), 1126 (m), 928 (s)

^{1}H-NMR (200 MHz, DMSO-d_6) [ppm]:

7.3 – 7.6	m	5 H	arom. H
3.88	s	3 H	-COOC$\underline{H}_3$ (Rotamer 1 - 4)
3.83	s		
3.64	s		
3.56	s		
3.30	s	3 H	-N-C$\underline{H}_3$ (Rotamer 1 - 4)
3.26	s		
3.11	s		
3.04	s		
2.19	s	3 H	-N-COC$\underline{H}_3$ (Rotamer 1 - 3)
2.14	s		
2.06	s		

MS: m/z (rel. Intensität): 250 $M^{+\bullet}$ (0.3), 209 (2.4), 208 (17.1), 179 (1.5), 149 (3.7), 122 (10.7), 121 (100), 92 (24.4), 91 (18.0), 78 (10.8), 77 (86.5), 65 (26.3), 64 (23.7), 63 (13.4), 59 (69.5), 56 (26.5)

Elementaranalyse:

$C_{12}H_{14}N_2O_4$	(250.25)	ber.:	C	57.59	H	5.64	N	11.19
		gef.:	C	57.23	H	5.69	N	10.95

8 LITERATURVERZEICHNIS

1 *Fachinformation Novalgin®*, Aventis Pharma, Stand August **2001**

2 J. E. Edwards, H. J. McQuay, *Lancet*, **2002**, *360*, 1438

3 *arznei-telegramm*, **1999**, *6*, 64 - 65

4 S. E. Andrade, C. Martinez, A. M. Walker, *J. Clin. Epidemiol.*, **1998**, *12*, 1357 - 1365

5 J. R. Vane, *Nature New Biol.*, **1971**, *231*, 232 - 235

6 W. L. Smith, L. J. Marnett, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1083*, 1 - 17

7 J. Sirois, J. S. Richards, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 6382 - 6388

8 C. Bombardier, L. Laine, A. Reicin, D. Shapiro, R. Burgos-Vargas, B. Davis, R. Day, M. B. Ferraz, C. J. Hawkey, M. C. Hochberg, T. K. Kvien, T. J. Schnitzer; VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1520 -1528

9 N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. T. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton D. L. Simmons, Proc. Natl. Acad. Sci., **2002**, *99*, 13926 - 13931

10 Interview mit B. Hinz, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **2003**, *143*, 2160 - 2161

11 O. Boutaud, D. M. Aronoff, J. H. Richardson, L. J. Marnett, J. A. Oates, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, *99*, 7130 - 7135

12 G. Reid, P. Wielinga, N. Zelcer, I. van der Heijden, A. Kuil, M. de Haas, J. Wijnholds, P. Borst, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, 9244 - 9249

13 E. Kopp, S. Gosh, *Science*, **1994**, *265*, 956 - 959

14 M. J. Yin, Y. Yamamoto, R. B. Gaynor, *Nature*, **1998**, *396*, 77 - 80

15 N. Scheuren, H. Bang, T. Münster, K. Brune, A. Pahl, *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, *123*, 645 - 652

16 S. B. Abramson, G. Weissmann, *Arthritis Rheum.*, **1989**, *32*, 1 - 9

17 Eine Übersicht über die bekannten Metaboliten **2** – **6** ist auf Seite 15 dargestellt.

18 R.Lanz, B. A. Peskar, K.Brune, *100 Jahre Pyrazolone* (Hrsg. K. Brune, R. Lanz), Urban & Schwarzenberger, **1985**, 105 - 112

19 V. Vlahov, M. Badian, M.Verho, N. Bacracheva, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 61 - 65

20 K. U. Weithmann, H.-G. Alpermann, *Arzneim.-Forsch.*, **1985**, *35*, 947 - 952

21 C. Campos R. De Gregorio, R. García-Nieto, F. Gago, P. Ortiz, S. Alemany, *Eur J Pharmacol.* **1999**, *378*, 339 - 347

22 O. Cohen, E. Zylber-Katz, Y. Caraco, L. Granit, M. Levy, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1998**, *54*, 549 - 553

23 J. Taylor, B. Mellström, I. Fernaud, J. R. Naranjo, *Eur J Pharmacol.* **1998**, *351*, 39 - 47

24 A. Beirith, A. R. S. Santos, A. L. S. Rodrigues, T. B. Creczynski-Pasa, J. B. Calixto, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *345*, 233 - 245

25 E. F. Collares, A. M. Vinagre, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, *36*, 1375 - 1382

26 H. J. Schroth, A. Steinsträßer, R. Berberich, G. Kloss, *100 Jahre Pyrazolone* (Hrsg. K. Brune, R. Lanz), Urban & Schwarzenberger, **1985**, 145 - 154

27 K. Alexander, A. Khreis, G. Traut, *Arzneim.-Forsch.*, **1963**, *13*, 493 - 497

28 L. Zicha, F. Scheiffarth, E. Schmid, U. Alms, G. Schott, *Arzneim.-Forsch.*, **1961**, *11*, 598 - 602

29 E. Planas, R. Poveda, S. Sanchez, A. Romero, M. M. Puig, *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*, 223 - 226

30 G. M. L. Reis, M. C. Doretto, I. D. G. Duarte, M. A. K. F. Tatsuo, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, *36*, 1263 - 1268

31 I. D. G. Duarte, I. R. Dos Santos, B. B. Lorenzetti, S. H. Ferreira, *Eur. J. Pharmacol.*, **1992**, *217*, 225 - 227

32 H.-J. Duchstein, S. Riederer, C. Erbach, *Pharm. Unserer Zeit*, **1999**, *28*, 197 - 207

33 O. Christ, H.-M. Kellner, G. Ross, W. Rupp, A. Schwarz, *Arzneim.-Forsch.*, **1973**, *23*, 1760 - 1767

34 M. Volz, H.-M. Kellner, *Br. J. Clin. Pharmac.*, **1980**, *10*, 299 - 308

35 V. Vlahov, M. Badian, M. Verho, N. Bacracheva, Br. *J. Clin. Pharmac.*, **1990**, *38*, 61 - 65

36 M. Levy, E. Zylber-Katz, B. Rosenkranz, *Clin. Pharmacokinet.*, **1995**, *28*, 216 - 234

37 H. Weber, E. Wollenberg, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **1988**, *321*, 551-553

38 H.-J. Duchstein, G. Ruch-Zaske, G. Holzmann, E. Wollenberg, H. Weber, *Arch. Pharm.* (Weinheim), **1988**, *321*, 25 - 27

39 H. Weber, R. Breßer, *Pharmazie*, **1996**, *51*, 152 - 155

40 K. Traber, Dissertation, Düsseldorf **2000**, 16 - 17

41 R. Breßer, H. Weber, *Pharmazie*, **1996**, *51*, 470 - 476

42 R. Breßer, Dissertation, Düsseldorf, **1996**

43 M. Volz, H.-W. Fehlhaber, F. Siebenlist, Tagungsabstract European ISSX meeting, International Society for the Study of Xenobiotics, 26. – 29.09.1993, Tours

44 K. Reddersen, T. Heberer, U.Dünnbier, *Chemosphere*, **2002,** *49*, 539 - 544

45 O. Wallach, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1877**, *184*, 67ff

46 J. Berger, *Acta Chem. Scand.*, **1956**, *10*, 638 - 640

47 E. Grushka, H.D. Durst, E.J. Kikta Jr., *J. Chromatogr.*, **1975**, *112*, 673 - 678

48 B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.*, **1978**, *90*, 556-557

49 G.Refsofszki, M. Huhn, P. Dvortsák, K.Kálóy, *Liebigs Ann. Chem.*, **1976**, 1343 - 1350

50 M. Ulbricht, G. Tomaschewski, *J. prakt. Chem.*, **1989**, *331*, 873 - 877

51 L. Lamandé, D. Boyer, A. Munoz, *J. Organomet. Chem.*, **1987**, *329*, 1-30

52 A. Buschauer, I. Krämer, W. Schunack, *Arch. Pharm.*, **1986**, *319*, 434 - 443

53 W. Walter, W. Francke, *Beyer Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie*, 23. Auflage, **1998**, S. Hirzel Verlag Stuttgart/Leipzig, 177 – 178

54 T. J. de Boer, H. J. Backer, *Organic Synthesis Coll. Vol. 4*, **1963**, 250 - 253

55 E. Ehlers, *Chemie II*, **1997**, *5. Auflage*, Gustav Fischer Verlag, 802

56 Berechnet von Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris V 4.67, Chemical Abstracts

57 A. Pickert, *Untersuchung der organischen Säuren in Serum und Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Azidosen*, Dissertation **1987**, Tübingen

58 C. Först, *Basisprofile organischer Säuren im Urin – Gaschromatographisch-massenspektroskopische Analysen, Vergleiche bei normaler und diabetischer Stoffwechsellage*, Dissertation **1985**, Heidelberg

59 M. Spiteller, G.Spiteller, *J. Chromatogr.*, **1979**, *164*, 253 - 317

60 P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, **1994,** *14. Auflage*, Georg Thieme Verlag, 185 - 187

61 K. Eger, R. Troschütz, H.J. Roth, *Arzneistoffanalyse*, **1999**, *4. Auflage*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 223 - 230

62 F. von Bruchhausen (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, **1992**, *5. Auflage*, , Springer Verlag, Band 7, 299 - 303

63 F. von Bruchhausen (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, **1992**, *5. Auflage*, , Springer Verlag, Band 3, 899 - 901

64 G. Löffler, P, . E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, **1997**, Springer Verlag, 1051

65 J. Jr. Harvey, J. C. Y. Han, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, *26*, 902 - 910

66 I. J. Belasco, J. Jr. Harvey, *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, *28*, 689 - 692

67 Y. Li, A. C. Barefoot, R. W. Reiser, A. F. Fogiel, P. J. Sabourin, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 962 - 966

68 K.-M. Chang, C. O. Knowles, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1979**, *8*, 499 - 508

69 L. Gerlach, *Anat. Anz.*, **1887**, 2, 583 - 609

70 F. Kemper, *Arzneim.-Forsch.*, **1963**, *13*, 191 - 194

71 B. Heinrich-Hirsch, D. Neubert, *Arch. Toxicol.*, **1991**, *65*, 402 - 408

72 N.-P. Lüpke, *Ärztl. Kosmetolog.*, **1987**, *17*, 13 - 30

73 G. Baron-Ruppert, N.-P., Lüpke, *Phytomedicine*, **2001**, *8*, 133 - 138

74 B. Rusche [Hrsg.], *Tierversuche - Alternativen*, **1989**, Akademie für Tierschutz <Neubiberg>

75 M. R. Juchau, Q. P. Lee, A. G. Fantel, *Drug Metab. Rev.*, **1992**, *24*, 195 - 238

76 M. Neugebauer, *Biotransformation von Arzneistoffen im bebrüteten Hühnerei - Eine Alternative zum Tierversuch,* Habilitation, **1997**, Bonn

77 K.-H. Scharf, W. Weber, *Fortpflanzung und Entwicklung*, **1990**, Schroedel Schulbuch Verlag, Hannover, 49

78 L. Kiep, H. Bekemeier, *Pharmazie*, **1986**, *41*, 868 - 872

79 L. Kiep, S. Maderner, K. Seifert, *Pharmazie*, **2002**, *57*, 829 - 833

80 A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, *Virologische Arbeitsmethoden*, **1974**, *Band I* Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 381

81 F. A. Tarbah, Th. Daldrup, *Medicina Legalis Baltica*, **1997**, *8*, 123 - 127

82 H.-J. Duchstein, G. Ruch-Zaske, G. Holzmann, E. Wollenberg, H. Weber, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **1988**, *321*, 25 - 27

83 Herstellung siehe T. J. de Boer, H. J. Backer, *Organic Synthesis Coll. Vol. 4*, **1963**, 250 - 253

84 J. Halberkann, F. Fretwurst, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **1950**, *285*, 97 - 127

85 Tierie, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, , **1933**, *52*, 357 - 359

86 H. O. Desseyn, B. J. van der Veken, M. A. Herman, *Spectrochim. Acta Part A*, **1977**, *33*, 633 - 641

87 *Organikum*, **2001**, *21. Auflage*, Wiley-VCH Verlag Weinheim, 242, Variante A

88 J. F. Grove, P. J. Suter, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3350 - 3351

89 O. Wallach, A. Liebmann, *Chem. Ber.*, **1880**, *13*, 506 - 511

90 H. Ulrich, A.A.R. Sayigh. *J. Org. Chem.*, **1965**, *30*, 2781 – 2783

91 J. Bergman, P.-O. Norby, U. Tilstam, L. Venemalm, *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 6113 - 6124

92 M. Schläpfer-Dähler, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2321 - 2328

93 H. Nomura, T. Ishiguro, S. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 381 - 386

Danksagung

Mein allererster Dank gilt Herrn Professor Weber, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt und mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Schmidt für die Übernahme des Koreferats und die ausführlichen Diskussionen zur Vorhersage von NMR-Daten.

Vielen Dank an Herrn Priv-Doz. Neugebauer aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, sowie seinen Mitarbeiter Heiko Kiefer für das zur Verfügung Stellen der Brutgeräte und Bruteier, sowie die große Hilfe bei der Durchführung meiner Untersuchungen an bebrüteten Hühnereiern.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, im Besonderen Prof. Daldrup und Herrn Dr. Tarbah danke ich für die Durchführung meiner GC-MS-Analysen und für zahlreiche fruchtbare „Analytik-Diskussionen“.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Instituts für pharmazeutische Chemie Frau Zerta, Frau Christoph, Herrn Jansen und Herrn Matthew für die Anfertigung der Elementaranalysen, IR-Spektren, Massenspektren und NMR-Spektren.

Besonders lieben Dank an das gesamte OC-Team für unsere gemeinsame Zeit im Praktikum. Schön, dass wir immer an einem Strang gezogen und manchmal auch noch weit nach Feierabend getagt haben.

Ich danke meinen Kollegen/innen Frank Sunkel, Joachim Schönlau, Sabine Plücker, Sylvia Pesch, Carsten Esser, Mark Heipke, Dirk Welsch und Holger Steinmaß sowie Frau Janoschka und Frau Matyja aus dem AK Weber für den guten Zusammenhalt und die vielen gemeinsamen Stunden in und außerhalb der Uni.

Ich danke Sylvie und Dirk, weil ich in Euch außerdem auch noch richtig gute Freunde gefunden habe.

Ein großer Dank geht natürlich an meine Familie, die mich immer beim Erreichen meiner Ziele unterstützt hat.

Danke Sumit!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Julia Wessel
Geburtsdatum:	08.01.1977
Geburtsort:	Düsseldorf
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1983 - 1987	Gemeinschaftsgrundschule Urdenbach, Düsseldorf
1987 - 1996	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Düsseldorf
Abiturprüfung:	Juni 1996

Hochschulstudium:

Okt. 1996 – Sep. 2000	Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Nov. 2000 – April 2001:	Pharmaziepraktikum in der Oberkasseler Apotheke, Düsseldorf
Mai. 2001 – Okt. 2001	Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Pharmazeutische Prüfung:	Januar 2002
Approbation als Apothekerin:	Februar 2002

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Dez. 2001	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Weber
seit Mai 2001	Wissenschaftliche Angestellte/Assistententätigkeit am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf