

75. Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von Cyclosporin A durch Derivatisierung mit 2-Naphthylselenenylchlorid

von Jean-Claude Gfeller¹⁾

Analytische Forschung und Entwicklung, Pharmazeutisches Departement, Sandoz AG, CH-4002 Basel

und Albert K. Beck und Dieter Seebach¹⁾

Laboratorium für Organische Chemie der ETH Zürich, ETH Zentrum, Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich

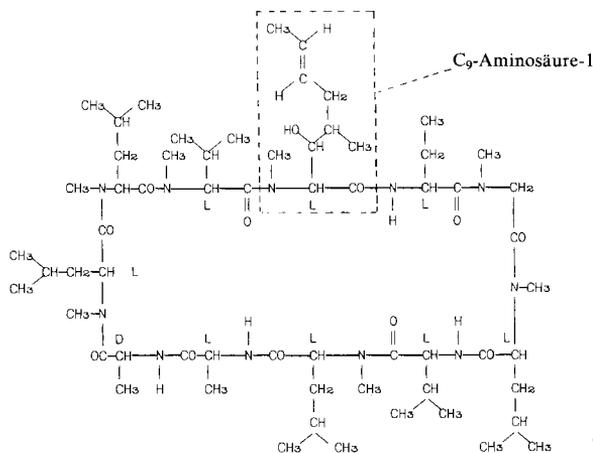
(21. II. 80)

Enhancement of Detection Sensitivity of Cyclosporin A by Derivatization with 2-Naphthylselenenylchloride

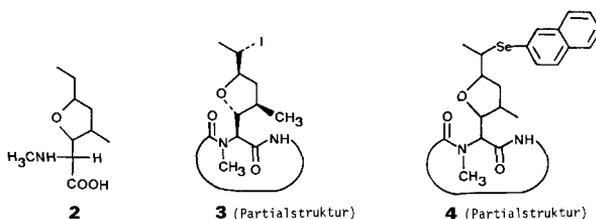
Summary

The UV./HPLC. detection sensitivity of cyclosporine A **1**, an immunosuppressive cyclic undecapeptide containing one D-amino acid and seven N-methylated amino acids, is enhanced by a factor of 3-4 (limit of detection 5 ng) by conversion of the characteristic side chain of amino-acid-1 to the β -naphthylseleno-substituted tetrahydrofuran derivative **4**.

Das an sieben der elf Aminosäurebausteine N-methylierte, cyclische Undecapeptid Cyclosporin A **1** ist wegen seiner immunosuppressiven Wirkung interessant [1]. Charakteristisch ist die ungewöhnliche C₉-Aminosäure-1,

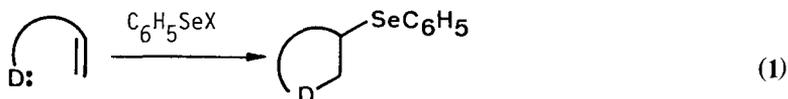


¹⁾ Korrespondenzautoren.



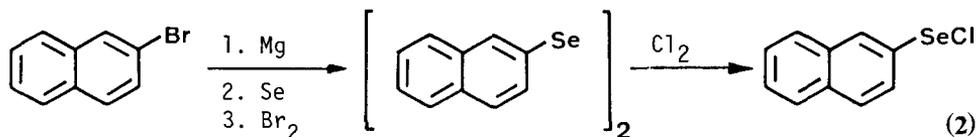
(2*S*, 3*R*, 4*R*)-2-Methylamino-3-hydroxy-4-methyl-6-octensäure, welche bei der sauren Hydrolyse (6*N* HCl) des Peptids als Tetrahydrofuran-derivat **2** anfällt [1]; sie ist auch für die leicht erfolgende (TIOAc/I₂), reversible (Zn/HOAc) Cyclisierung zu **3** verantwortlich [1], dessen Röntgenstrukturanalyse [2a] auch die Sekundärstruktur **1** von Cyclosporin A erbrachte.

Bei der quantitativen Analyse von Cyclosporin A z. B. in Blutplasma mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC.) und UV.-Detektion stösst man aufgrund des kleinen spezifischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{210} = 44.000$) bei ca. 20 ng auf die Nachweisgrenze [2b]. Auf der Suche nach einer Derivatisierungsmöglichkeit zur Empfindlichkeitssteigerung erwies sich die Veresterung der OH-Gruppe in der Seitenkette des C₅-Aminosäurebausteins mit *p*-Nitrobenzoyl-



D: = OH [5a], COOH [5b], NHCOOR [5c], C=C [5d]

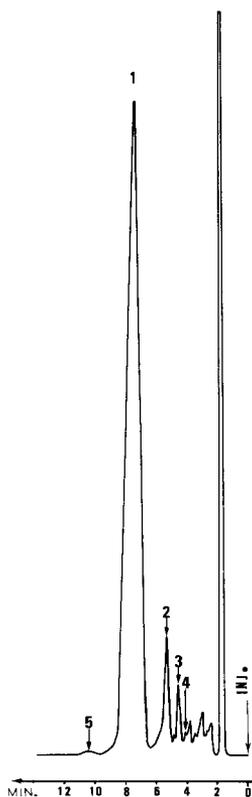
chlorid als zu aufwendig und nicht genügend reproduzierbar; mit Standardlösungen erreichte man eine bei 260 nm detektierte Nachweisgrenze von ca. 50 ng. Da sich Organoselenylderivate wie Halogene (vgl. oben **3**) leicht an Doppelbindungen addieren [3]²⁾ und diese Reagentien bei Anwesenheit eines Nucleophils (Donor-Zentrums) in derselben Molekel nach Gleichung (1) in hohen Ausbeuten Cyclisierungen bewirken [5], führten wir zunächst eine Phenylselenoverätherung von Cyclosporin A mit dem käuflichen Phenylselenylchlorid durch. Es bildete sich in einer sehr raschen Reaktion ein Addukt vom Typ **3**. Um die gewünschte Chromo-



phorverstärkung zu erreichen, stellten wir nach Gleichung (2) über das bekannte Dinaphthylselenid [6] eine Probe von 2-Naphthylselenylchlorid her. Der Naphthylchromophor mit $\epsilon_{220} \sim 90.000$ sollte nach der Pre-Column-Derivatisierung eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit des Cyclosporin-Nachweises er-

²⁾ Neue ausführliche Übersicht über die Verwendung von Selenverbindungen in der organischen Synthese, siehe [4].

lauben. Es zeigte sich, dass das Naphthylderivat in Tetrachlorkohlenstoff praktisch momentan mit Cyclosporin A zum naphthylselenylsubstituierten Tetrahydrofuran-derivat **4** reagiert, welches durch Auffangen der HPLC-Fraktion und Aufnahme eines Felddesorptions-Massenspektrums eindeutig identifiziert wurde (M^+ :1408). Mit Standardlösung der beiden Komponenten erhält man nach 5 Min. und äquimolarer Umsetzung das in *Figur 1* gezeigte Chromatogramm. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng (siehe *Fig. 2*), die Reproduzierbarkeit ist gut. Wie im experimentellen Teil ausgeführt, ist bei Verwendung von überschüssigem Selenylchlorid auch der Nachweis im Plasma möglich, obwohl dort Pike aus der Plasmamatrix eine Optimierung der Extraktionstechnik und der Chromatographiebedingungen nötig machen.



*Fig. 1. Chromatogramm der Reaktionslösung von Cyclosporin A und 2-Naphthylselenenylchlorid. Säule: 25×0,46 cm; RP-8 10 µm. Mob. Phase: Methanol/Wasser 5:1. Fluss: 1,7 ml/Min. Detektion: 220 nm. Temp. 73°. 1, Cyclosporin A-Naphthylselenenyladditionsprodukt **4**; 2, Dinaphthylselenid; 3, Dinaphthylselenid; 4, eventuell nicht umgesetztes Cyclosporin A; 5, unbekannt.*

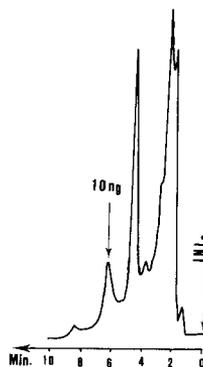


Fig. 2. Chromatogramm von 10 ng derivatisiertem Cyclosporin A. Säule: 12,5×0,3 cm; RP-8 5 µm. Mob. Phase: Acetonitril/Wasser 3:1. Fluss: 0,4 ml/Min. Detektion: 230 nm. Temp. 73°.

Experimenteller Teil

Bis(2-naphthyl)-diselenid. Diese Verbindung wurde analog dem Diphenyldiselenid [7] hergestellt. Die Grignard-Lösung aus 4,9 g Magnesium (0,2 mol) und 41,4 g 2-Bromnaphthalin (0,2 mol) in 110 ml Äther wurde portionenweise mit einem Feststoffdosiertrichter so mit 14,1 g (0,18 mol) Selen versetzt, dass das Lösungsmittel leicht unter Rückfluss siedete. Nach Beendigung der Zugabe wurde nach 30 Min. unter Rückfluss erhitzt, unter Kühlung vorsichtig mit 1 ml Wasser versetzt und im Eisbad 4,7 ml Brom (0,09 mol) so zugegeben, dass der Äther nicht siedet. Zur Aufarbeitung wurde zunächst unter Kühlung 10,7 g Ammoniumchlorid in 30 ml Wasser zugetropft und durch eine Fritte abgenutscht. Der Filterkuchen wurde für 3 Tage im Soxhlet mit Äther extrahiert, und die vereinigten, mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Phasen eingedampft. Rohausb. 31,2 g (75,6%), gelbes Pulver. Laut DC. ist das Produkt einheitlich (Rf 0,24 in Pentan). Wie aus der nachfolgenden Vorschrift und den HPLC.-Analysen ersichtlich, muss aber Dinaphthylselenid als Verunreinigung vorliegen. Ein ähnlich hergestelltes Dinaphthylselenid schmolz bei 137–138° [6a] resp. 139° [6b].

(2-Naphthyl)-selenylchlorid. Analog einer Vorschrift von Reich *et al.* [7b] zur Herstellung des Phenylselenylchlorids wurden auf die Oberfläche einer gerührten Lösung von 11,5 g (28 mmol) Bis(2-naphthyl)-diselenid in 230 ml Tetrachlorkohlenstoff 2,0 g (28 mmol) Chlorgas geleitet. Die rotbraune Lösung verfärbte sich dunkel und erwärmte sich leicht. Die resultierende Mischung wurde kurz aufgekocht, von eventuell ausgefallenem Trichlorid (s. unten) filtriert und eingedampft. Das schwarzbraune, ölige Rohprodukt (13,4 g) wird in heissem Hexan/CCl₄ gelöst. Mehrfache Kristallisation führte schliesslich zu geringen Mengen (1–2 g) einer Probe von ockerfarbenen Kristallen, die zwischen 63 und 65° sintern und darüber in eine rotbraune Schmelze übergehen.

C ₁₀ H ₇ ClSe	Ber. Cl 14,68	Se 32,68%	
	Gef. „ 12,86	„ –	(Elementaranalyse)
	„ 11,19 ± 0,23	„ 31,44 ± 0,63%	(Röntgenfluoreszenzanalyse)

Das Atomverhältnis Se:Cl = 1,26 ± 0,03 entspricht einer Verunreinigung von 16% Dinaphthylselenid (s. unten, Reinheit des Reagens).

Mit überschüssigem Chlor entsteht ein rotbrauner Niederschlag (nach Trocknung dunkelorange) von (2-Naphthyl)selenyltrichlorid (vgl. Herstellung von Phenylselenylchlorid [7b]). Smp. 86–87° (Zers.).

C ₁₀ H ₇ Cl ₃ Se (312,49)	Ber. Cl 34,04	Gef. Cl 34,22%
--	---------------	----------------

Chromatographisches System. Das Trennsystem setzt sich aus einer Altex 110 Pumpe (Altex Scientific, Berkeley, Calif., USA), einem UVIKON LCD 725 UV.-Monitor (Kontron AG, Zürich), einem Rheodyne 7010-Injektionsloop (Rheodyne, Berkeley, Calif., USA) und einer HPLC.-Säule gepackt mit LiChrosorb RP-8 Material (Merck, Darmstadt, BRD) zusammen. Die Säule wurde in allen Versuchen auf 73° thermostatisiert; das Injektionsvolumen betrug in allen Fällen 50 µl. Die chromatographischen Bedingungen sind in den Figuren angegeben.

Reaktionsbedingungen und Identifikation. Lösungen von äquimolaren Mengen Cyclosporin A und Naphthylselenylchlorid in Tetrachlorkohlenstoff (Merck p.A.) wurden zusammengegeben. Nach ca. 5 Min. wurde das Lösungsmittel mit N₂ abgeblasen, der Rückstand in mobiler Phase aufgenommen und chromatographiert. Die Reaktion verläuft quantitativ (Fig. 1). Das Produkt ist weniger polar als das Cyclosporin A und besitzt bei 226 nm ein UV.-Maximum. Die molare Absorption ist ca. 3mal grösser als die von nicht derivatisiertem Cyclosporin A. Der chromatographische Pik wurde aufgefangen und durch Felddesorptions-MS. identifiziert (*M*⁺: 1408).

Stabilität und Reinheit des Reagens. Das Reagens wird durch Wasser zum unreaktiven Dinaphthylselenid umgesetzt. Da in Tetrachlorkohlenstoff Feuchtigkeitsspuren vorhanden sind, ist die Reagenslösung nur beschränkt haltbar und muss frisch angesetzt werden. Die Verunreinigung des Reagens durch Dinaphthylselenid (s.o.) stört nicht, da dieses bei der Chromatographie gut vom Produkt 4 getrennt wird und die Reaktion nicht beeinflusst.

Im Chromatogramm der Fig. 1 erscheint neben dem Pik des Produktes ein weiterer Pik einer unbekannt Substanz, die aufgefangen wurde; ihr UV.-Spektrum ist gleich dem von Dinaphthylselenid, sie wurde noch nicht identifiziert.

Reproduzierbarkeit und Linearität. Zu 200 µl Standardlösung (2,67 µg Cyclosporin A) wurden je 20 µl Reagenslösung (1,6 µg Reagens) gegeben und nach 5 Min. mit Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde in 500 µl mobiler Phase aufgenommen und davon je 50 µl injiziert (267 ng), wobei eine

Wiederholstandardabweichung von 4,4% ($n=4$) erzielt wurde (Pikhöhen-Auswertung). Die Linearität des Detektorsignals wurde im Konzentrationsbereich von 20 bis 270 ng/Injektion überprüft. Die Regression der Pikhöhen in Funktion der Konzentration ist linear ($r=0,9935$). Die Empfindlichkeitsgrenze für das Cyclosporin wurde geprüft, indem gegenüber den vorigen Versuchen eine 10mal kleinere Reagensmenge eingesetzt wurde. Dadurch wurde erreicht, dass der Dinaphthylidisenidpik weniger mit dem Derivatpik interferiert. Wie aus *Figur 2* ersichtlich, können trotz grosser Retention ($k'=5,5$) noch < 10 ng bestimmt werden. Die Retention muss für die Blindwertunterdrückung durch die Plasmamatrix gross sein ($k'_{\min} \geq 4$). zusätzlich wird diese durch die Detektion bei höherer Wellenlänge z. B. bei 230 nm verbessert.

Bestimmung von Cyclosporin A in Plasma. Der Plasmaextrakt wurde zunächst mit 250 ng Cyclosporin A und dann mit einem ca. 100fachen Reagensüberschuss versetzt. Dieser war notwendig, da die im Extrakt vorhandenen Feuchtigkeitsspuren sowie einzelne reaktive Substanzen die Umsetzung des Reagens mit Cyclosporin A stören. Es konnte ein Derivatpik für das Cyclosporin A beobachtet werden, der allerdings von anderen Piken - herrührend von der Plasmamatrix - umgeben war. Durch chromatographische Anpassung oder optimierte Extraktion sollten diese Pike abgetrennt werden können.

Wir danken den Herren *D. Manser* (Laboratorium für Organische Chemie, ETH), *Dr. B. Magyar* (Laboratorium für Anorganische Chemie, ETH), *P. Schaub* und *Dr. W. Niederberger* (Sandoz AG) für die Durchführung von Elementaranalysen, der Röntgenfluoreszenzanalyse bzw. für die Überlassung von Plasmaextrakt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *A. Rügger, M. Kuhn, H. Liechi, H.-R. Loosli, R. Huguenin, Ch. Quiquerez & A. v. Wartburg*, *Helv.* 59, 1075 (1976).
- [2] a) *T.J. Petcher, H.-P. Weber & A. Rügger*, *Helv.* 59, 1480 (1976); b) *W. Niederberger, P. Schaub & P. Beveridge*, *Journal of Chromatography, Biomedical Application* (accepted for publication).
- [3] *K.B. Sharpless & R.F. Lauer*, *J. org. Chemistry* 39, 429 (1974); *H.J. Reich*, *ibid.*, 39, 428 (1974); *D.L.J. Clive*, *J. chem. Soc., Chem. Commun.* 1974, 100; *N. Miyoshi, S. Murai & N. Sonoda*, *Tetrahedron Letters* 1977, 851; *D. Liotta & G. Zima*, *ibid.*, 1978, 4977.
- [4] *D.L.J. Clive*, *Tetrahedron* 34, 1049 (1978).
- [5] a) *D.L.J. Clive, G. Chittattu, N.J. Curtis, W.A. Kiel & C.K. Wong*, *J. chem. Soc., Chem. Commun.* 1977, 725; b) *K.C. Nicolaou & Z. Lysenko*, *J. Amer. chem. Soc.* 99, 3185 (1977); *K.C. Nicolaou et al.*, *ibid.* 101, 3704, 3884 (1979); c) *D.L.J. Clive*, *J. chem. Soc., Chem. Commun.* 1978, 379; d) *K.C. Nicolaou, S.P. Seitz, W.J. Sipio & J.F. Bount*, *J. Amer. chem. Soc.* 101, 3704, 3884 (1979). *Commun.* 1978, 379; d) *Idem*, *ibid.* 1978, 441.
- [6] a) *G. Bergson*, *Ark. Kemi* 10, 127 (1956); *I. Degani & R. Fochi*, *Ann. Chim. (Rome)* 63, 319 (1973); b) *V.V. Kozlov & V.M. Pronyakova*, *Ž. Organ. Chim.* 1, 493 (1965); *Chem. Abstr.* 63, 1752a (1965); *Ž. Vses. Chim. Obshchest.* 12, 471 (1967); *Chem. Abstr.* 68, 59344x (1968).
- [7] a) *D.G. Forster*, 'Org. Synth. Coll.' Vol. III, J. Wiley Inc., New York, London, Sydney, 771 (1955); b) *H.J. Reich, J.M. Renga & I.L. Reich*, *J. Amer. chem. Soc.* 97, 5434 (1975).