

Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany

Wichtige pharmazeutisch-chemische Eigenschaften des zentralen Muskelrelaxans Chlormezanon

A. SEELING, H. OELSCHLÄGER UND D. ROTHLEY

Die Arbeit widme ich dem Andenken meines Freundes Dr. Paul Henrich (1911–1998), ehemaliger Oberassistent am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg und späterer Geschäftsführer der Apothekerkammer Hamburg.

Chlormezanon (**1**), ein zentrales Muskelrelaxans, kann an einer Daicel OD-Säule enantiospezifisch mit einer Ausbeute von 98% in seine Enantiomeren getrennt werden. (+)- und (-)-Chlormezanon werden bei pH 7,4 zu etwa 11–12% an humanes Serum-Albumin (HSA) gebunden. Die Globulinfraktionen binden nur im Bereich von 2–4% (Gleichgewichtsdialyse, validiert durch Ultrafiltration). Durch ¹H-NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die **1**-Enantiomeren sowohl mit dem aromatischen Ring als auch mit dem Thiazanon-Ring an HSA binden. Die Racemisierungsgeschwindigkeit wurde erstmalig durch HPLC mit Hilfe einer BSA-7-Säule gemessen. Die Enantiomeren racemisieren bei pH 7,4 und 37 °C mit einer Halbwertszeit von ca. 20,5 h.

Important pharmaceutical-chemical characteristics of the centrally acting muscle relaxant chlormezanone

The enantiomers of chlormezanone (**1**) may be achieved by enantioselective HPLC separation with a yield of 98% using a OD-Daicel column. Both enantiomers bind to human serum albumin (HSA) at pH 7,4 to a range of 11–12%. Binding to the globuline fractions is much less (2–4%, equilibrium dialysis, validation by ultrafiltration). It could be demonstrated by means of ¹H-NMR spectroscopy that **1** binds to HSA with the benzene ring as well as with the thiazanone ring. The velocity of racemisation could be measured for the first time using a BSA column. The enantiomers undergo racemisation at pH 7.4 and 37 °C with a halflife of approx. 20.5 h.

1. Einleitung

2-(4-Chlorphenyl)-3-methyl-perhydro-1,3-thiazin-4-on-1,1-dioxid, (Chlormezanon, **1**) wurde 1962 als racemische Monosubstanz, später auch in Kombination mit Paracetamol und Codeinphosphat, in die Therapie eingeführt. 1996 entschloß sich der Hersteller aufgrund des seltenen Auftretens schwerer Hautreaktionen nach Gabe von **1** dieses weltweit aus dem Handel zu nehmen, obwohl die Inzidenzen im Bereich der von Diazepam und Allopurinol lagen. Die Ursache dieser Epidermolysen ist nach wie vor unklar. Im Rahmen geplanter dermatologischer Untersuchungen war es nötig, die Enantiomeren mit Hilfe einer enantiospezifischen HPLC in größerer Menge rein darzustellen, um sie als „tools“ für die experimentelle Forschung verfügbar zu machen. Ferner mussten ihre pharmazeutisch-chemischen Eigenschaften eindeutig gekennzeichnet werden. Nach einmaliger Gabe von 400 mg rac-**1** konnten wir in zwei Studien mit insgesamt 20 männlichen Probanden [1, 2] feststellen, dass sich die Enantiomeren in ihren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Die Resorption der beiden Enantiomeren erfolgt mit etwa der gleichen Geschwindigkeit (t_{\max} 15–45 min), aber die Eliminationshalbwertszeit für (+)-**1** war mit 47 h fast doppelt so lang wie die des (-)-**1** mit 24 h. Berger et al. [3] prüften die Enantiomeren des Chlormezanon, die im Milligrammmaßstab durch SC an Triacetylcellulose [4] gewonnen worden waren, im Pentetrazol- und im Strychnin-Krampf-Test an Mäusen auf antikonvulsive und toxische Wirkung. In beiden Tests erwies sich (+)-**1** als wesentlich stärker antikonvulsiv als (-)-**1**, auch schützte (+)-**1** die Versuchstiere deutlich besser vor einem tödlichen Ereignis.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

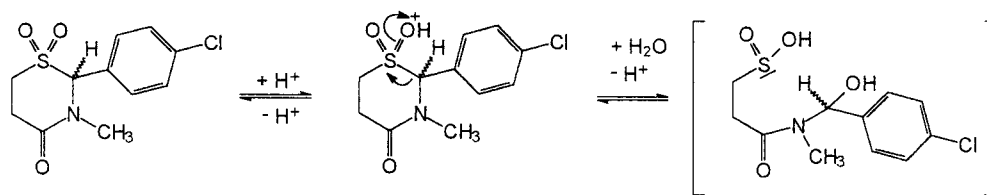
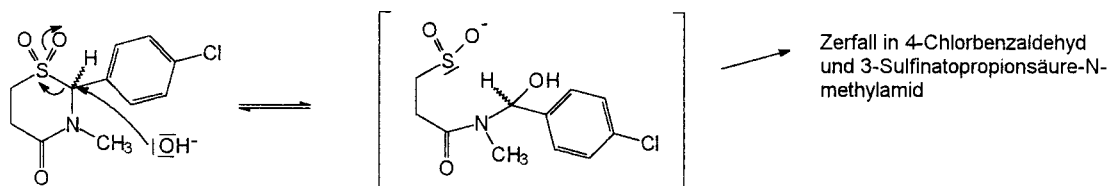
Die Trennung von rac-**1** erfolgte an einer Daicel OD-Säule (500 × 50 mm) mit dem Eluens EtOH/Hexan (1+1), UV-Detektor 254 nm. Injiziert wurde 1 g **1**, gelöst in EtOH/THF (1+1). Als erste Fraktion erscheint (+)-**1** ($t_R = 26$ min), gefolgt von (-)-**1** ($t_R = 36$ min). Die Ausbeute beträgt für die Enantiomeren bis zu 98% d. Th. mit einer LC-Enantiomerenreinheit von besser als 99%.

Für die geplanten dermatologischen Untersuchungen war es erforderlich, sowohl die Eiweißbindung als auch die Racemisierungsgeschwindigkeit von **1** zu kennen. Dabei musste die von Oelschläger und Rothley [5] bereits 1992 eingehend untersuchte *In-vitro*-Hydrolyse des Moleküls berücksichtigt werden, die pH-abhängig mit einem Minimum der Spaltung zwischen pH 4–7 zwischen dem Schwefelatom und C-2 unter Bildung von 4-Chlorbenzaldehyd, der rasch zu 4-Chlorbenzoesäure weiteroxidiert wird, und dem 3-Sulfinatopropionsäure-*N*-methylamid erfolgt. Dieses unterliegt der Hydrolyse. Eine Beteiligung von Cytochrom P-450 an der Primärsplattung konnte eindeutig ausgeschlossen werden [6].

Die Hydrolyse unterliegt der sauren und alkalischen Katalyse. Sie verläuft im optimalen Stabilitätsbereich von pH 2–9 als Autoprotolyse. Bei pH 2 beträgt die HWZ 45 h, bei pH 10 17 h und bei pH 7,4 50 h (37 °C) (Schema 1).

Auf den Grad der Eiweißbindung existierte in der Literatur nur ein Hinweis. Sie sollte bei Verwendung von Pferdeserum 48% betragen (Dialyse-Methode) [7]. Wir bestimmten die Eiweißbindung sowohl für Humanplasma als auch für HSA und die humanen Globulinfraktionen (α , β , γ) mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse (Dianorm-Dialysegerät). Als Membran diente eine Regeneratcellulose-Membran (Fa. Sartorius). Dialysiert wurde gegen eine

Schema 1

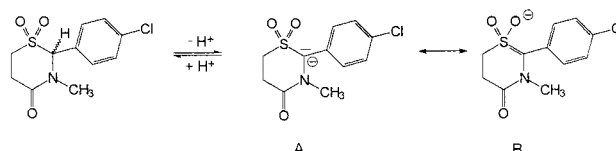
 H^+ -Katalyse OH^- -Katalyse

isotonische Phosphatpuffer-Lösung (pH 7,4). Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. Man sieht, dass die beiden Enantiomeren von Humanplasma nur wenig und in etwa gleicher Stärke gebunden werden. Die Validierung erfolgte mit Hilfe der Ultrafiltration. Da bei der Ultrafiltration nur der **1**-Gehalt des proteinfreien Filtrats bestimmt werden kann, entfällt die Bestätigung der 100%-Wiederfindung. Dieser Umstand machte sich in der etwas größeren Streuung der Bindungsrate an HSA bemerkbar (s. Tabelle 1). Eine nennenswerte Stereoselektivität der Proteinbindung war nicht erkennbar. Wenn man allerdings im Ultrafiltrat das Verhältnis der Enantiomere mit Hilfe einer Proteinsäule (Ultron ES-OVM-Säule) bestimmte, ergab sich die Andeutung einer gewissen enantiospezifischen Eiweißbindung von (+)-**1** zu (-)-**1** von 56:44. Die Daten in Tabelle 1 erklären nicht die unterschiedliche Eliminationskinetik. Dazu sind weitere Untersuchungen der Gewebeseiweißbindung, besonders im Eliminationsorgan Niere erforderlich.

Als analytisches Verfahren zur Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit diente die HPLC mit einer BSA-7-Säule, die sich wegen ihrer Empfindlichkeit auf Änderungen der Elutionsbedingungen (Eluenten-pH, Ionenstärke, Modifier-Anteil, Temperatur) als besonders geeignet für dieses Trennproblem erwies. Die Säule ermöglichte außer der Bestimmung der Enantiomeren auch die Einzelbestimmung der Spaltprodukte der chemischen Hydrolyse. Eluiert wurde mit einem Ammoniumphosphat-Puffer

(pH 8,0) unter Zusatz von 2% n-Propanol als Modifier. Die Retentionszeit betrug etwa 7 min. Die Abb. zeigt, dass die Racemisierung sowohl für (+)-**1** als auch für (-)-**1** mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt. Die Halbwertszeit bei 37 °C beträgt $20,5 \pm 1,5$ h für beide Enantiomere. Sie verläuft also bei pH > 7 wesentlich schneller als die Hydrolyse bei pH 7,4, bei pH 2,0 dagegen erheblich langsamer. Da **1** formal als N,S-Acetal aufgefasst werden kann, existieren nach Deprotonierung die beiden enantiotopen Formen A und B, von denen B dominieren dürfte (Schema 2). Konfigurativ mehr oder weniger stabile Carbanionen sind bekannt.

Schema 2



Der von uns gefundene Wert stimmt gut mit dem Ergebnis von Blaschke [4] überein, der in wässrig-alkoholischen Lösungen die temperaturabhängige Racemisierung mittels der weniger empfindlichen optischen Drehung untersuchte. Er ermittelte z. B. in einer 30-prozentigen ethanolischen Lösung eine Halbwertszeit von 22,4 h (bei 37 °C). Unsere Befunde (Tabelle 2) demonstrieren, dass beide Enantiomere bei pH 2,0, abweichend von dem zitierten Autor [4],

Tabelle 1: Eiweißbindung von rac-**1** und seinen Enantiomeren

Proteinfraktion	% gebunden	Methode
Humanplasma	22 ± 3 rac-CM	Dialyse
	24 ± 2 (+)-CM	
	21 ± 3 (-)-CM	
HSA	12 ± 5 rac-CM	Dialyse
	12 ± 4 (+)-CM	
	11 ± 4 (-)-CM	
	15 ± 7 rac-CM	Ultrafiltration
	16 ± 5 (+)-CM	
	16 ± 5 (-)-CM	
α -Globulin (human)	4	Dialyse
γ -Globulin (human)	<2	Dialyse
Cohn-Fraktion IV-4 (human), vorw. β -G.	<2	Dialyse

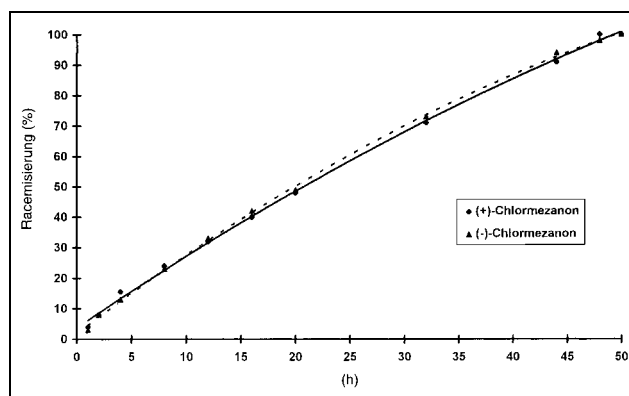
Abb. 1: Vergleich der Racemisierungsgeschwindigkeit von (+)-**1** [●] und (-)-**1** [▲] bei pH 7,4 und 37 °C

Tabelle 2: Racemisierung von (+)-1 und (-)-1 bei 37 °C bzw. 22 °C

pH (Temp.)	Halbwertszeit (h)	
	Seeling et al.	Blaschke et al. [7]
2,0 (22 °C)	240	stabil, da innerhalb von 36 h keine Drehwertänderung
7,4 (37 °C)	20,5	22,4
9,0 (37 °C)	1,3	1,1
9,0 (22 °C)	7,0	-

Tabelle 3: Vergleich der Hydrolyse-Halbwertszeiten von (+)-1 und (-)-1 bei 37 °C

pH	t _{1/2} [(+)-1]; [h]	t _{1/2} [(-)-1]; [h]
Chlormezanon-Hydrolyse in wässriger Pufferlösung		
5,0	58,3	58,5
7,4	58,1	59,0
9,0	35,3	35,7
Chlormezanon-Hydrolyse in Humanplasma		
7,4	72,7	73,6

nicht uneingeschränkt stabil sind. Bereits nach 36 h ließ sich mit unserer Methode eine ca. 10-prozentige Racemisierung eindeutig feststellen.

Die Hydrolyse von **1** zu 4-Chlorbenzaldehyd und 3-Sulfonatopropionsäure-*N*-methylamid wurde parallel quantitativ verfolgt, brauchte aber in der graphischen Darstellung des Racemisierungsverlaufs nicht berücksichtigt zu werden, da die Degradationskinetik keine Unterschiede der getrennt untersuchten Enantiomere erkennen ließ (vgl. Tabelle 3). Somit ergibt sich der Kurvenverlauf allein aus dem Flächenquotienten der beiden Enantiomere.

Durch die vorstehenden Untersuchungen stellt sich für die geplanten dermatologischen Prüfungen **1** als ein relativ stabiles Muskelrelaxans dar, das nur in geringem Umfang an Plasmaproteine, dominierend an HSA, gebunden wird. Eine enantiospezifische Eiweißbindung ist nur angedeutet. Mit Hilfe der Methode von Jardetzky [8, 9] konnte durch Verbreiterung der ¹H-NMR-Signale von beiden **1**-Enantiomeren in einer 4-prozentigen HSA-Lösung nachgewiesen werden, dass an der Eiweißbindung sowohl der aromatische Ring als auch der Thiazanon-Ring beteiligt sind. Die Racemisierungsgeschwindigkeit ist pH-abhängig. Die **1**-Enantiomere sind im sauren Bereich deutlich stabiler als im schwach alkalischen Bereich. Die Hydrolyse der S-C-Bindung tritt merklich langsamer ein und beeinträchtigt nicht die Pharmakotherapie mit **1**.

Über die dermatologischen Untersuchungen wird zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden.

4. Experimenteller Teil

4.1. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien besaßen, wenn nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad p.a. Pufferlösungen wurden, ebenso wie die Referenz- und Analysenlösungen, an jedem Versuchstag frisch bereitet. Die HPLC-Fließmittel wurden aus Acetonitril zur Chromatographie bzw. 1-Propanol zur Chromatographie und Phosphatpuffer hergestellt. Wasser wurde für chromatographische Zwecke zuvor durch eine Filteranlage (Seralpur[®] Pro 90 CN) gereinigt. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit einem Digital-pH-Meter pH 525 der Firma WTW (Weilheim). Für die Eichung wurden DIN-Standardpuffer verwendet.

Alle HPLC-Fließmittel wurden durch ein 0,2 µm-Membranfilter (Sartorius) filtriert und mit Helium 5.0 entgast.

Zur Thermostatisierung der Probelösungen wurde ein LAUDA M3-Thermostat (Lauda, Königshofen) verwendet.

4.2. Präparative, enantioselektive Trennung von **1**

rac-**1** ließ sich an OD-Phasen mit einem Ethanol/Hexan-Gemisch (LiChrosolv[®], Merck, Darmstadt) als Eluens in seine Enantiomere trennen. Gelöst wurde rac-**1** in Ethanol/THF (1 + 1). Die injizierte Menge wurde so optimiert, dass bei 254 nm gerade noch eine Basislinientrennung eintrat. Die Trennung erfolgte bei RT an einer 500 × 50 OD-Säule der Fa. Daicel, Tokyo, Japan. Als Pumpe wurde das Modell HD-200 der Fa. Labomatic, Allschwil, Schweiz, UV-Detektor 254 nm des gleichen Herstellers eingesetzt. Die Injektion erfolgte mit dem präparativ-manuellen Injektionsventil der Fa. Rheodyne, Cotati CA, USA. Injiziert wurden 10 ml einer 10-prozentigen Lösung von **1**; getrennt wurde mit einem Eluentenfluss von 75 ml/min. Der Säulendruck betrug ca. 18 bar. Die beiden erhaltenen Fraktionen wurden in getrennten Rotationsverdampfern bei 40 °C vorsichtig auf wenige ml eingengt, dann mit 30 ml eisgekühltem Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die abfiltrierten Kristalle zeigten eine LC-Enantiomerenreinheit von mehr als 99,9%, bestimmt im gleichen LC-System auf einer analytischen OD-H-Säule bei 230 nm. Die Ausbeute betrug 95–98% d. Th.

4.3. Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit wurden jeweils 10⁻³ M-Lösungen der **1**-Enantiomere in 0,02 M-Phosphatpufferlösung pH 7,4 frisch hergestellt und in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad inkubiert. Einige Versuche wurden auch bei RT und pH 9 durchgeführt. Nach 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 und 48 h wurden Proben entnommen und mit HPLC-Fließmittel auf eine Endkonzentration von 10⁻⁴ M verdünnt. Die anschließende Chromatographie erforderte 20 min und erfolgte an einer Resolvisil[®] BSA-7 Säule [150 × 4] (Macherey & Nagel, Düren); Fließmittel 0,05 M-Ammoniumphosphatpuffer pH 8,0 + n-Propanol (96 + 4 [v/v]); Flow 0,7 ml/min; Detektorwellenlänge 228 nm. Gerätekonfiguration: Pumpe LC-10AS (isokratisch), Autoinjektor SIL-10A, UV-Detektor SPD-M10A (Diodenarray); Bus-Modul CBM-10A, Class-LC10-Workstation (alle Anlagenteile Shimadzu Europa GmbH, Duisburg).

4.4. Bestimmung der Plasmaproteinbindung

4.4.1. Gleichgewichtsdialyse

Hierzu wurde ein Dianorm[®]-Dialysegerät (Bachofer, Reutlingen) mit fünf Probekammern verwendet, deren je 1,2 ml fassenden Halbzellen durch eine Cellaphan-Dialysemembran getrennt waren. Je eine Halbzelle wurde mit 1,2 ml 0,067 M-Phosphatpuffer pH 7,4 gefüllt, die andere Halbzelle mit 1,2 ml Humanplasma, in dem zuvor 8 · 10⁻⁵ M des jeweiligen **1**-Enantiomers gelöst worden waren. Die Konzentration wurde aus einer 10⁻³ M-Stammlösung in Humanplasma durch Verdünnung eingestellt und nach Enteiweißung einer Probe durch HPLC-Messung im Gehalt gesichert. Nach einer Dialysezeit von 60 min bei 37 °C wurden jeweils 500 µl aus den Probekammern entnommen und im Messkolben mit Fließmittel (s. u.) auf 5,0 ml aufgefüllt. Der Acetonitrilanteil führte sofort zur vollständigen Proteinkoagulation, so dass nach Zentrifugation (3 min, 1000 Upm) die überstehende Lösung der plasmahaltigen Halbzellen direkt zur HPLC-Vermessung verwendet werden konnte. Die Proben der puffergefüllten Zellen bedurften nach der Verdünnung keiner weiteren Vorbereitung. Die Gehaltsbestimmung erfolgte gegen externen Standard im Konzentrationsbereich 5 · 10⁻⁶ bis 5 · 10⁻⁷ M. Bei jedem Versuchsdurchgang wurde neben vier eiweißhaltigen Proben eine 8 · 10⁻⁵ M **1**-Lösung in Phosphatpuffer pH 7,4 dialysiert. Versuchsreihen, bei denen die **1**-Gehalte in den Halbzellen dieser Referenzproben nicht gleich waren, wurden ebenso verworfen wie Proben, in denen das Zersetzungsprodukt 4-Chlorbenzaldehyd nachgewiesen werden konnte.

4.4.2. Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration wurden Centrisart I[®]-Zentrifugalfilter MWCO 20 kD (Sartorius, Göttingen) verwendet. Die proteinhaltigen Untersuchungslösungen entsprachen in Zusammensetzung und Konzentration den Lösungen der Versuchsbeschreibung 4.4.1. Je Filtrationseinheit wurden 2,5 ml der Probe einpipettiert und 30 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Der **1**-Gehalt im proteinfreien Filtrat konnte direkt gegen externen Standard HPLC-vermessen werden.

Zur Kontrolle der **1**-Absorption durch die Kunststoffteile bzw. das Membranmaterial wurde eine proteinfreie **1**-Referenzlösung filtriert. Der Verlust an **1** lag außerhalb des Empfindlichkeitsbereichs der Methode und konnte daher vernachlässigt werden.

Die Chromatographie wurde an einer LiChrospher[®] RP-18-Säule [125 × 4 mm; 100 µm] (Merck, Darmstadt) durchgeführt; Fließmittel Acetonitril/0,02 M-Phosphatpuffer pH 5,5 (50:50 [v/v]), Flow 0,4 ml/min; Detektorwellenlängen 218, 228 und 250 nm; interner Standard β-Naphthol (c = 5 · 10⁻⁵ M in der Meßlösung).

4.5. Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit von (+)-1 und (-)-1

In Analogie zur Untersuchung der rac-**1**-Hydrolysekinetik wurden jeweils 10⁻³ M-(+)-**1** und (-)-**1**-Lösungen in Phosphatpuffer pH 5,0, 7,4 und 9,0

bzw. in Humanplasma bei 37 °C inkubiert (Wasserbad, LAUDA-Thermostat M3, LAUDA-Königshofen). Nach 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48 und 72 h wurden Proben entnommen, nach 2-Naphthol-Zusatz mit HPLC-Fließmittel 1 : 10 verdünnt, falls notwendig zentrifugiert und gemäß 4.4.2. chromatographiert.

Wir danken dem Fonds der Chemie, Frankfurt a. M., für finanzielle Förderung.

Literatur

- 1 Oelschläger, H.; Lemmer, B.; Rothley, D.; Nold, G.; Riederer, H.; von Fallois, J.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **49**, No. ½ A20045E (1995)
- 2 Oelschläger, H.; Lemmer, B.; Rothley, D.; Nold, G.; Riederer, H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, im Druck
- 3 Berger, C.: *Centre de Recherche Winthrop, Longvic, Frankreich* (1983), siehe bei [4]
- 4 Blaschke, G.: *J. Liq. Chromatogr.* **9**, 341 (1986)
- 5 Oelschläger, H.; Klinger, W.; Rothley, D.; Seeling, A.; Bockhard, H.; Hofmann, B.; Machts, H.; Riederer, H.; Rackur, H.: *Pharmazie* **53**, 9 (1998)
- 6 McChesney, E. W.; Banks Jr, W. F.; Portman, G. A.; Crain, A. V. R.: *Biochem. Pharmacol.* **16**, 813 (1967)
- 7 Blaschke, G.; Fraenkel, W.; Fröhlingdorf, B.; Marx, M.: *Liebigs Ann. Chem.* **753** (1988)
- 8 Jardtetzki, O.: *Naturwissenschaften* **54**, 149 (1967)
- 9 Nachev, P. K.: *Diss. Univ. Frankfurt am Main* 1982

Eingegangen am 28. Mai 1999
Angenommen am 11. Oktober 1999

Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger
Institut für Pharmazie
Philosophenweg 14
D-07743 Jena