

Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Germany

## Zur Trennung von Oxetacain und seinen Metaboliten

B. UNTERHALT und C. WENNING

Oxetacain (**1**), das unter dem Namen Tepilta<sup>®</sup> gehandelt wird, kann zu den Metaboliten **2–5** biotransformiert werden. Nach anfänglichen Versuchen, ein gc Verfahren zur Simultanentrennung von **1–5** zu erarbeiten, gelang diese schließlich durch HPLC an einer Kieselgel Si 60-Phase mit dem Fließmittelsystem Methanol/*tert.*Butylmethyl ether/Perchlorsäure (MeOH/TBME/HClO<sub>4</sub>).

### Separation of oxetacaine and its metabolites

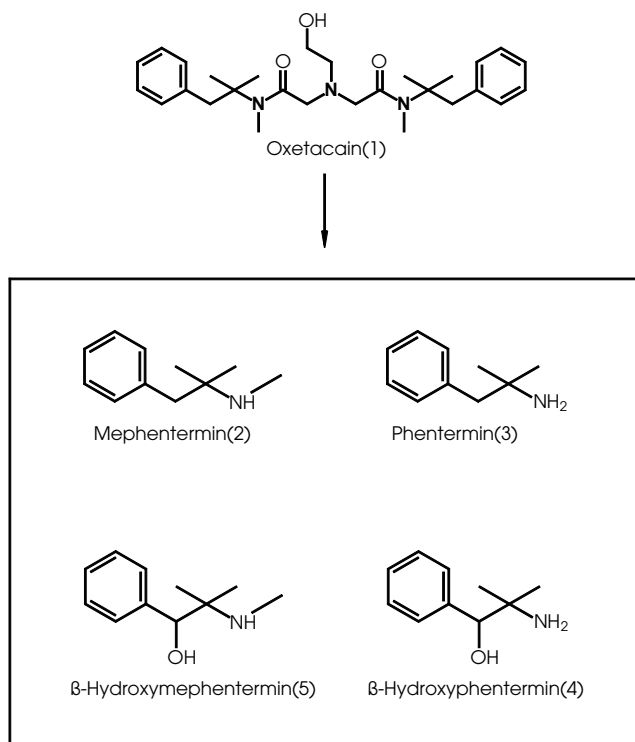
Oxetacaine (**1**), known as Tepilta<sup>®</sup>, may be biotransformed to **2–5**. After having tried to separate **1–5** by GC we succeeded in finding the HPLC method on Silicagel Si 60 with the eluent MeOH/TBME/HClO<sub>4</sub>.

### 1. Einleitung

*N,N'*-Bis( $\alpha,\alpha$ -dimethylphenethyl)-*N,N'*-dimethyl-2'-hydroxyethylimino-diacetamid (Oxetacain, **1**) findet in Kombination mit Antazida bei schmerzhaften akuten und chronischen Gastritiden, bei Ulcus ventriculi und duodeni sowie bei Schwangerschaftsodbrennen Anwendung. Bei der Therapie der Refluxösophagitis ist die Kombination einem reinen Antazidum hinsichtlich der Schmerzsymptomatik überlegen [1].

**1** befindet sich unter dem Namen Tepilta<sup>®</sup> als Suspension und Tablette im Handel. Über seine Biotransformation weiß man wenig, die langsame Hydrolyse in der Leber ist beschrieben [2]. Unveröffentlichte Versuche [3] nennen die Metaboliten Mephentermin (**2**) und Phentermin (**3**) sowie deren  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen **4** und **5** (Schema).

### Schema



### 2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen unserer Arzneistoffuntersuchungen bot sich zunächst die Entwicklung einer gc Methode an, da zahlreiche Aminoalkohole direkt oder nach ihrer Derivatisierung auf diese Weise bestimmt werden [4–7]. Die Trennung gelang für **2–5** unter dem Einsatz einer DB-5<sup>®</sup> Fused-Silica-Kapillarsäule mit Helium sowie für **1–5** an einer HP-1<sup>®</sup> Fused-Silica-Kapillarsäule mit Wasserstoff als Trägergas (Abb. 1). **1** war von seinen Metaboliten abzutrennen (Abb. 1a), zeigte jedoch einen zweiten Peak im Chromatogramm, der nach seiner Retentionszeit **2** zukommt (Abb. 1b). Dies ließ entweder unter den hohen Probenaufgabentemperaturen im Injektorblock oder während der Tren-

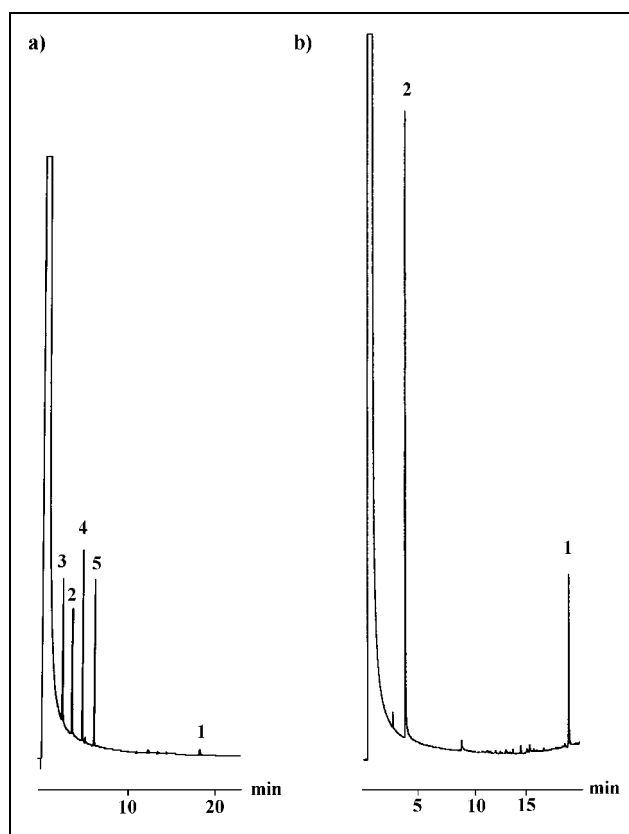


Abb. 1: GC-Bestimmung der Metaboliten **2–5** an einer HP-1<sup>®</sup>-Säule: a) nach Injektion einer Stammlösung von **1–5**; b) nach Injektion einer **1**-Lösung

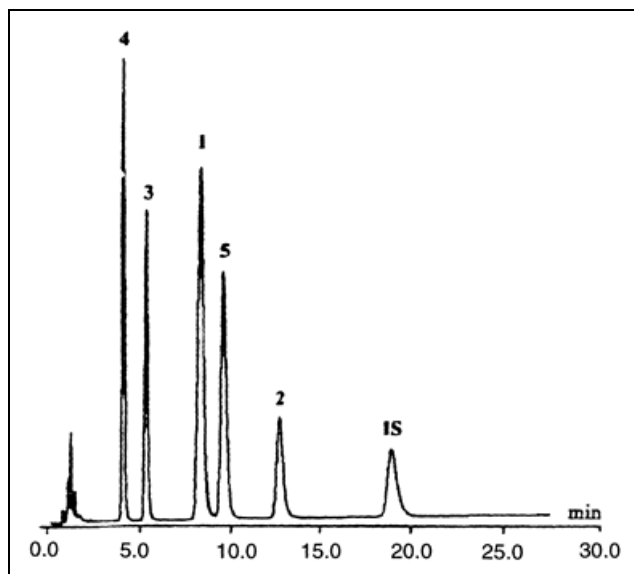


Abb. 2: HPLC-Chromatogramm einer Stammlösung von 1–5; Prolintan als int. Standard.

nung die Zersetzung von 1 zu 2 vermuten. Daraufhin angestellte Thermolyseversuche bestätigten die Annahme [8]. Es blieb nun das Ziel, zur Simultanentrennung von 1–5 ein schonendes HPLC-Verfahren zu entwickeln, um später biologische Proben untersuchen zu können. Gill et al. beschrieben eine RP-HPLC-Methode zur qualitativen Bestimmung von 1 und verwendeten als mobile Phasen Mischungen von MeOH und n-Hexylamin-Phosphorsäure-Puffer pH 2,8 [9]. Nach Versuchen an RP-18-Phasen, die zur Trennung von 2–5 mit dem Eluenten MeOH/Triethylammoniumphosphat-Puffer (pH 2,6–2,8) = 12/88 führten, gelang die Separierung von 1–5 an einer Normalphase (Kieselgel Si 60) mit dem Fließmittelsystem MeOH/*tert.*Butylmethylether (TBME)/1 M HClO<sub>4</sub>. Es wurden sowohl isokratische Verfahren als auch Trennungen mit Fließmittelgradienten entwickelt [10]. Mit der isokratischen Methode erreichten wir eine gute Aufspaltung in effizienten Analysenzeiten (Abb. 2), so dass dieses Verfahren nach Kriterien von Shah et al. für pharmakokinetische Studien validiert wurde [11]. Im Ergebnis entspricht die aufgeführte HPLC-Methode in allen Fällen den o. a. Erfordernissen [10].

Nachfolgende *In-vitro*-Biotransformationsstudien wurden mit Leberzellfraktionen (Mikrosomen, Cytosol, Supernatant) Phenobarbital-induzierter männlicher Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt [12], die Leberhomogenisate

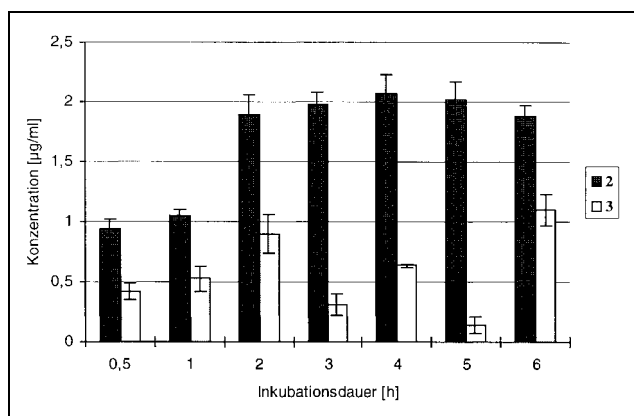


Abb. 3: Konzentration von 2 und 3 nach der Inkubationsdauer ( $\pm$ SD)

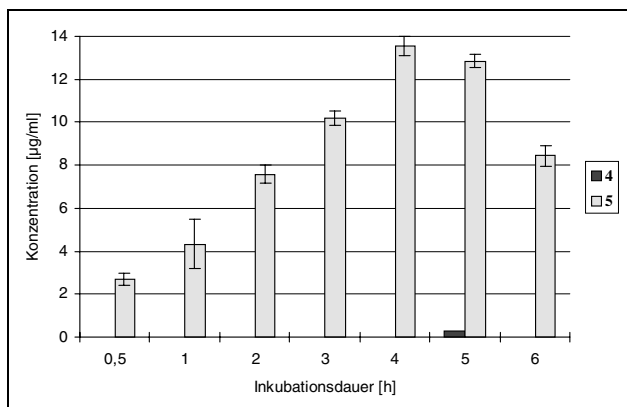
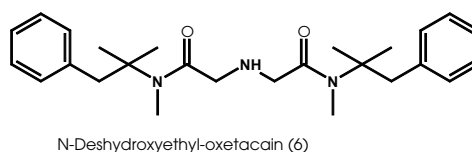


Abb. 4: Konzentration von 4 und 5 nach der Inkubationsdauer ( $\pm$ SD)

nach Dayer et al. gewonnen [13, 14]. Inkubationsansätze bestanden aus Substrat – Oxetacain (1) –, Enzymquelle – frisch aufgetaute Leberzellpräparation –, Tris-Puffer (pH 7,8) und MgCl<sub>2</sub>- sowie NADPH-Lösung als Kofaktoren. Die Konzentrationen der in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit induzierten Rattenlebermikrosomen gebildeten Metaboliten 2–5 sind Abb. 3 und 4 zu entnehmen [10].

Neben 2–5 traten drei weitere Metaboliten auf. Der in der höchsten Konzentration vorliegende Metabolit konnte durch LC-MS-Kopplung sowie durch den Vergleich mit seinem Syntheseprodukt als N-Deshydroxyethyl-oxetacain (6) identifiziert werden [10].



### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1. Geräte und Methoden

GC mit dem Chromatographen Sichromat 2 (Siemens): Säule HP-1<sup>®</sup>, 25 m, 0,32 mm; Trägergas H<sub>2</sub> (0,8 bar); Injektor: T = 250 °C, Septumspülung, „hot-needle“-Technik, split = 1:10; FID-Detektor: T = 300 °C. -GC-MS mit dem Finnigan MAT GCQ: Säule DB-5<sup>®</sup>, 30 m, 0,25 mm; Trägergas He; obiger Injektor, MS-Detektor (EI, 70 eV). HPLC mit dem System Kontron: Säule LiChrospher<sup>®</sup> Si60, 5 µm, 250 mm × 4 mm; Vorsäule LiChrospher<sup>®</sup> Si 60, 5 µm, 4 mm × 4 mm; Flow 1,5 ml/min; UV-Detektor: 210 nm; Mobile Phase: TBME/MeOH/1M HClO<sub>4</sub> = 93,5/6,0/0,5. <sup>1</sup>H-NMR- u. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren: Varian Gemini 200. – Schmp.: Leitz Heiztischmikroskop 350. – Elementaranalysen: Perkin Elmer CHN-Analyser 240.

#### 3.2. Synthese der Metaboliten 4 u. 5

β-Hydroxyphentermin (4), Schmp. 100–101 °C (Et<sub>2</sub>O), wird nach [15, 16] hergestellt. β-Hydroxymephentermin (5) ist über die Reaktion von 4 mit Chlorameisensäurethylester und die Reduktion des Amids mit LiAlH<sub>4</sub> zu gewinnen [17]; Schmp.: 125–126 °C (Cyclohexan).

#### 3.3. N-Deshydroxyethyl-oxetacain (6)

##### 3.3.1. *Tert.*Butyloxycarbonyl-iminodiessigsäure [18]

2,66 g (20 mmol) Iminodiessigsäure werden in 20 ml H<sub>2</sub>O, 40 ml 1 M NaOH und 40 ml 1,4-Dioxan gelöst. Unter Eiskühlung und kräftigem Rühren gibt man 4,9 g (22,5 mmol) *tert.*Butyl-pyrocbonat hinzu, rührt 2 h lang bei 0 °C und 48 h lang bei Raumtemperatur. Nach dem Ansäuern mit verd. wäss. KHSO<sub>4</sub>-Lsg. auf pH 2–3 wird dreimal mit je 100 ml EtOAc extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingengt und der ölige, bei Raumtemperatur auskristallisierende Rückstand mehrfach mit n-Hexan gewaschen. Schmp.: 128–131 °C (EtOAc); Ausbeute: 72%.

### 3.3.2. *N,N'*-Bis-( $\alpha,\alpha$ -dimethylphenethyl)-*N,N'*-dimethyl-*tert*.butyloxycarbonyl-*iminodiacetamid* [19, 20]

0,58 g (2,5 mmol) Boc-*iminodiacetamid* werden in 15 ml trockenem DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt und unter N<sub>2</sub> mit 1,19 g (5,6 mmol) Mephen-termin-hemisulfat, 2,61 g (5,6 mmol) Bromo-trispyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBroP) und 2,6 ml (25 mmol) Et<sub>2</sub>NH versetzt. Nach 1 min lässt man auf Raumtemperatur erwärmen, rührt 48 h lang, engt ein und gibt 300 ml EtOAc hinzu. Es wird je zweimal mit 100 ml 5-proz. Citronensäure sowie mit 100 ml 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. extrahiert, mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, die EtOAc-Phase eingengt und der Rückstand mit der Flash-Säulenchromatographie (Kieselgel 60, 0,04–0,063 mm; EtOAc/n-Hexan = 1:1) gereinigt. Ausbeute: 20% blassgelbes Öl.

### 3.3.3. *Abspaltung der Schutzgruppe zu 6*

260 mg (0,5 mmol) Boc-*iminodiacetamid* (3.3.2.) werden unter N<sub>2</sub> mit 2 ml Anisol und 40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Trifluoressigsäure = 5/1 versetzt, 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt, eingengt, in wenig Toluol aufgenommen und 1 M HCl hinzugefügt. Das kristalline 6-HCl saugt man ab, wäscht mit Toluol und kristallisiert aus Toluol/H<sub>2</sub>O um. Schmp.: 62 °C; Ausbeute: 39%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1,47 (s, 12 H, 4  $\times$  CH<sub>3</sub>); 2,46 (s, 6 H, 2  $\times$  CH<sub>3</sub>); 3,20 (s, 2  $\times$  CH<sub>2</sub>); 4,02 (s, 2  $\times$  CH<sub>2</sub>); 7,22 (m, 10 H<sub>ar</sub>).  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50,3 MHz):  $\delta$  (ppm) = 27,42 (CH<sub>3</sub>); 32,10 (CH<sub>3</sub>); 43,60 (CH<sub>2</sub>); 50,26 (CH<sub>2</sub>); 61,74 (C<sub>qu</sub>); 126,69; 128,40; 130,35; 137,89 (C<sub>ar</sub>); 164,75 (C=O).

C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  $\times$  2 H<sub>2</sub>O (496,1)

Ber.: C 62,95 H 8,53, N 8,47

Gef.: C 63,59 H 8,68 N 8,64

### 3.4. *Thermolyseversuche*

Je 60 mg **1** werden in zwei Quarzschiffchen eingewogen, in den extra beheizbaren Reaktionsraum einer Flash-Thermolyse-Apparatur gebracht und bei 0,02 mbar 5–6 min lang auf 300 °C erhitzt. Das an einem mit flüssigem N<sub>2</sub> gefüllten Kühlfinger abgeschlossene zähflüssige Öl nimmt man in 96-proz. EtOH auf, entfernt das Lösungsmittel i. Vak. und löst den Rückstand in 1 ml CHCl<sub>3</sub>. Die Untersuchung auf Kieselgel 60F<sub>254</sub> „Merck“ (6 cm) mit dem Fließmittelsystem Cyclohexan/Toluol/Et<sub>2</sub>NH = 60/25/10 ergibt **1** und **2** als Produkte (GC-MS-Analyse) [10].

### 3.5. *Hydrolytische Stabilität von 1*

Die Versuche erfolgten in Puffermedien unterschiedlicher pH-Werte (pH 3–9) über 72 h bei 37 °C. **1** unterlag einem maximalen Abbau von 24%, einziges Zersetzungsprodukt war Mephen-termin (**2**). Kontrollinkubationen gegen einen Blindwert ergaben für Proben ohne NADPH-Zusatz einen Abbau von maximal 5,7% in 6 h, für Proben ohne Mikrosomenfraktion von 2,4%.

### 3.6. *In-vitro-Untersuchungen zur Biotransformation von Oxetacain (1)*

#### 3.6.1. *Inkubationsbedingungen*

Lösungen: 0,1 M Tris-Puffer pH 7,8; 0,986 g Tris-Base, 2,660 g Tris-HCl ad 500 ml Aq. bidest., den pH-Wert mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> einstellen. 0,06 M MgCl<sub>2</sub>-Lsg.: 1,22 g MgCl<sub>2</sub>  $\times$  6 H<sub>2</sub>O ad 100,0 ml Aq. bidest. NADPH-Lsg.: 8 mg/ml NADPH in Tris-Puffer pH 7,8 (9,2 mmol); stets frisch bereiten. 1-Stammlsg.: 1 mg/ml **1** in MeOH.

50  $\mu$ l (0,11  $\mu$ mol) 1-Stammlsg. werden in 10 ml-Normalschliffgläser übergeführt, MeOH mit N<sub>2</sub> entfernt und die weiteren Lösungen in der Reihenfolge 250  $\mu$ l Tris-Puffer pH 7,8, 50  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>-Lsg., 100  $\mu$ l Leberzellfraktion (Rattenlebermikrosomen) und 50  $\mu$ l NADPH-Lsg. einpipettiert. Nach der Zugabe eines Magnetstäbchens, das eine kontinuierliche Durchmischung und Belüftung des gerührten Ansatzes ermöglicht, wird im Wasserbad von 37 °C inkubiert. Parallel zu jedem Versuch erfolgt die Inkubation von Kontrollansätzen ohne Leberpräparation bzw. NADPH-Zusatz, das

- Zum Inkubationsansatz werden pipettiert:
  - 850  $\mu$ l Aq. bidest.
  - 100  $\mu$ l Lösung des internen Standards Prolintan (300  $\mu$ g/ml)
  - 300  $\mu$ l 1 M NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl-Puffer pH 11
  - 4 ml TBME
- 15 min schütteln (Stufe 1000)
- 10 min zentrifugieren (3500 rpm)
- organische Phase mit 50  $\mu$ l MeOH / 70 proz. HClO<sub>4</sub> (99/1) versetzen und im N<sub>2</sub>-Strom zur Trockne einengen
- Rückstand in 500  $\mu$ l Fließmittel gelöst analysieren

Abb. 5: Verfahren zur Extraktion von **1–5** aus *In-vitro*-Inkubationsansätzen (IS = interner Standard)

fehlende Volumen wird durch Tris-Puffer ersetzt. Gleichzeitige Blindversuche dienen der Prüfung auf Interferenzen aus der biologischen Matrix. Man stoppt die Reaktion durch schnelles Abkühlen im Kältebad bei 0 °C.

### 3.6.2. *Aufarbeitung der Ansätze*

Die in Abb. 5. dargestellte optimierte Extraktionsmethode dient der Aufarbeitung der Inkubationsansätze [10].

### Literatur

- 1 Arnd, M.; Pelster, F. W.; Fiedler, C.; Kautz, G.: *Münch. Med. Wschr.* **132**, 681 (1990)
- 2 Dinnendahl, V.; Fricke, U. (Hrsg.): *Arzneistoffprofile*: Bd. 7, Oxetacain, Erg.-Lfg., Govi-Verlag, Frankfurt/M. 1983
- 3 Donike, M.: *Mitt. an Dr. König, Wyeth Pharma Münster*, 1988
- 4 Beckett, A. H.; Tucker, G. T.; Moffat, A. C.: *J. Pharm. Pharmacol.* **19**, 273 (1967)
- 5 Donike, M.: *J. Chromatogr.* **103**, 91 (1975)
- 6 Franceschini, A.; Duthel, J. M.; Vallon, J. J.: *J. Chromatogr.* **541**, 109 (1991)
- 7 Perrigo, B. J.; Peel, H. W.; Ballantyne, D. J.: *J. Chromatogr.* **341**, 81 (1985)
- 8 Göber, B.; Franke, P.; Lisowski, H.: *Pharmazie* **47**, 584 (1992)
- 9 Gill, R.; Abbott, R. W.; Moffat, A. C.: *J. Chromatogr.* **301**, 155 (1984)
- 10 Wenning, C.: *Dissertation Universität Münster* 1998
- 11 Shah, V. P. und 11 Mitarb.: *J. Pharm. Sci.* **81**, 309 (1992)
- 12 Die Rattenleberzellfraktionen wurden dankenswerterweise von der AG G. Blaschke zur Verfügung gestellt. Für die Gewinnung und Verwendung Phenobarbital-induzierter Fraktionen lag eine Tierversuchsgenehmigung vor [10]
- 13 Dayer, P.; Gasser, R.; Gut, J.; Kronbach, T.; Robertz, G.-M.; Eichelbaum, M.; Meyer, U. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 374 (1984)
- 14 Lerch, C.: *Dissertation Universität Münster* 1996
- 15 Amouroux, R.; Axiotis, G. P.: *Synthesis* 270 (1981)
- 16 Lidy, W.; Sundermeyer, W.: *Chem. Ber.* **106**, 587 (1973)
- 17 Bruce, W. F.; Szabo, J. L.; Tubis, S.: *US 2.597.445* (1952), *C. A.* **47**, 2771g (1953)
- 18 Bodanszky, M.; Bodanszky, A.: *The Practice of Peptide Synthesis*, 2. Ed., p. 15–17, Springer Lab. Manuals 1994
- 19 Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P.: *J. Org. Chem.* **59**, 2437 (1994)
- 20 Auvin-Guette, C.; Frérot, E.; Coste, J.; Rebuffat, S.; Jouin, P.; Bodo, B.: *Tetrahedr. Lett.* **34**, 2481 (1993)

Eingegangen am 19. Mai 2000  
Angenommen am 15. Juni 2000

Univ.-Prof. Dr. B. Unterhalt  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
Hittorfstr. 58–62  
D-48149 Münster