

**Darstellung verschiedener Benzodiazepin-Glucuronide sowie die
Testung der Benzodiazepine hinsichtlich ihres Interaktionspotentials
im Phase-II-Metabolismus mit Opiaten**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Tanja Pallmann
aus Pforzheim

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 12. Dezember 2007

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Käferstein

Zweitgutachterin: Prof. Dr. M. Petersen

Tag der mündlichen Prüfung am: 13. Dezember 2007

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Darstellung verschiedener Benzodiazepin-Glucuronide sowie die Testung der Benzodiazepine hinsichtlich ihres Interaktionspotentials im Phase-II-Metabolismus mit Opiaten“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 06.11.2007

(Tanja Pallmann)

Zur vollen Entfaltung einer Persönlichkeit gehören notwendigerweise die psychische Spannung, das Erleben von Höhen und Tiefen und die kritische Auseinandersetzung mit der Umwelt.

Ernst Mutschler

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Biotransformation.....	1
1.1.1 Glucuronidierung.....	1
1.1.2 UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs).....	2
1.1.3 In vitro Glucuronidierungen.....	3
1.1.4 Wechselwirkungsstudien im Phase-II-Metabolismus.....	4
1.1.5 Pharmakologische Aspekte von Glucuroniden.....	4
1.2 Enzymkinetik.....	5
1.2.1 Enzymkinetische Parameter (K_m , V_{max}).....	6
1.2.2 Enzyminhibition.....	7
1.3 Möglichkeiten zur Darstellung von O-Glucuroniden.....	9
1.3.1 Chemische Synthese.....	9
1.3.2 Enzymatische Synthese.....	13
1.4 Benzodiazepine.....	14
1.4.1 Oxazepam	15
1.4.2 Temazepam.....	15
1.4.3 Lorazepam.....	16
1.5 Opiate.....	16
1.5.1 Morphin.....	17
1.5.2 Codein.....	17
2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG.....	19
2.1 Motivation.....	19
2.2 Zielsetzung.....	21
3 EXPERIMENTELLER TEIL.....	23
3.1 Materialien und Geräte.....	23
3.1.1 Chemikalien.....	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	24
3.1.3 Lösungen.....	26
3.1.4 Humane Lebermikrosomen.....	28

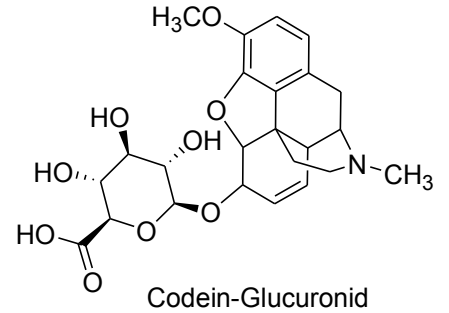
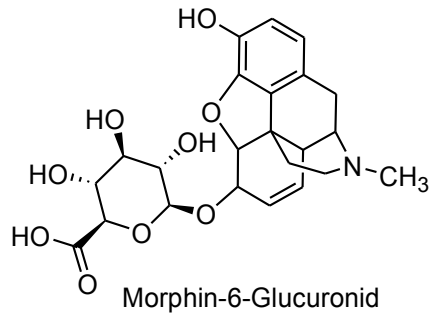
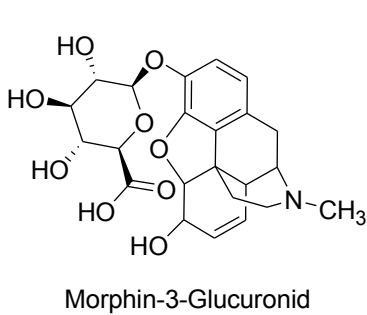
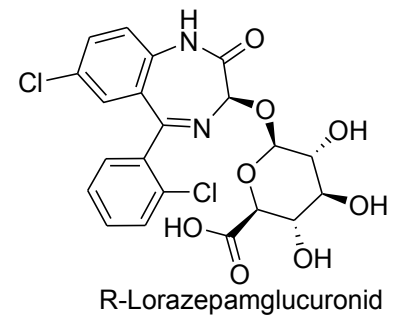
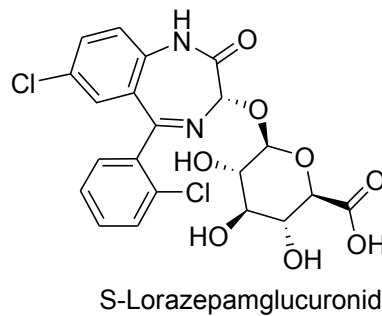
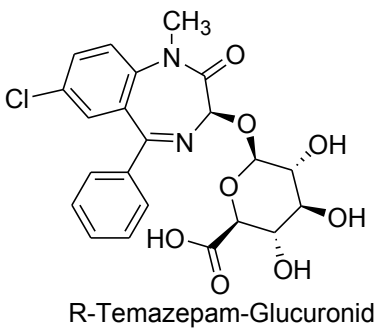
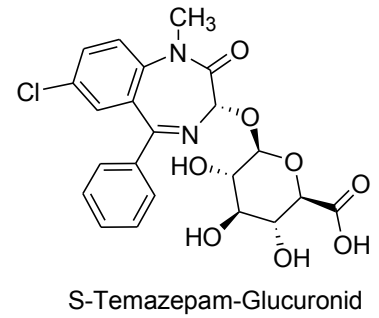
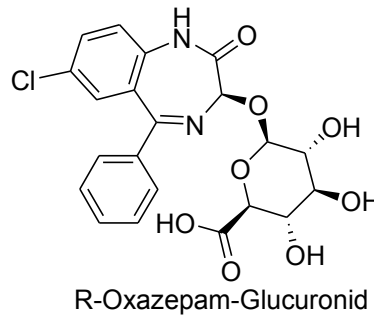
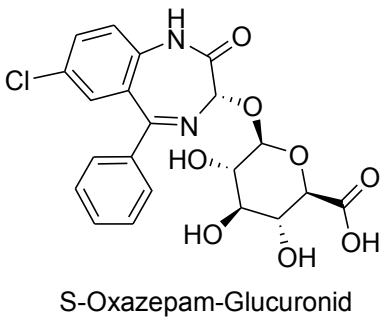
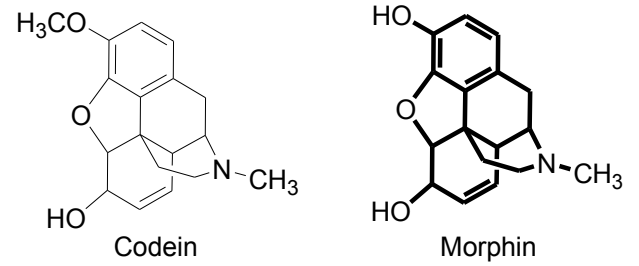
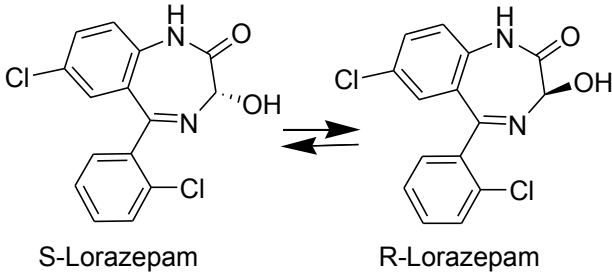
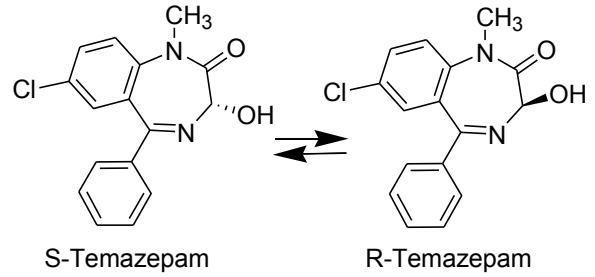
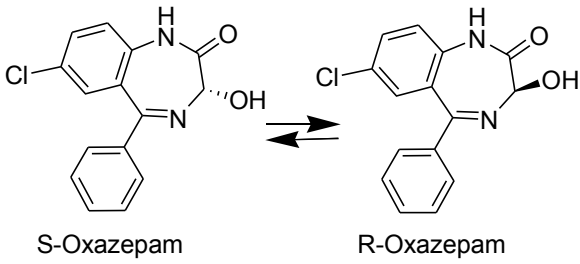
3.1.5 UGT-Isoformen (Supersomes™).....	28
3.1.6 Lösungsmittel.....	28
3.2 Chemische Synthese.....	29
3.2.1 Dünnschichtchromatographie.....	29
3.2.2 Präparative Säulenchromatographie.....	29
3.2.3 Schmelzpunkt.....	29
3.2.4 NMR-Spektroskopie.....	29
3.3 Enzymatische Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide.....	29
3.3.1 Gewinnung der Mikrosomen.....	29
3.3.2 Zentrifugation des Homogenats.....	30
3.3.3 Proteinbestimmung der Mikrosomen.....	30
3.3.4 Optimierung der enzymatischen Synthese.....	31
3.3.5 Isolierung der Benzodiazepin-Glucuronide.....	31
3.4 Präparative Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide.....	32
3.5 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide.....	33
3.5.1 Massenspektroskopie.....	33
3.5.2 ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	33
3.6 Analytik der Enzymassays und Wechselwirkungsstudien.....	34
3.6.1 HPLC.....	34
3.6.2 Kalibrierung.....	35
3.6.3 Validierung.....	37
3.7 Entwicklung der Enzymassays mit humanen Lebermikrosomen.....	41
3.7.1 Stopp-Reaktion.....	42
3.7.2 Inkubationszeit.....	42
3.7.3 pH-Optimum.....	43
3.7.4 Temperatur-Optimum.....	43
3.7.5 UDPGA-Konzentration.....	43
3.7.6 Benzodiazepin-Konzentration.....	43
3.8 UGT-Isoformen	44
3.9 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten.....	44
3.10 Enzymkinetische Auswertung.....	45

3.10.1 Parameter.....	45
3.10.2 Kurvenanpassung.....	46
3.10.3 Vergleich verschiedener Modelle.....	46
3.10.4 Auswertung der Daten aus den Inkubationsversuchen.....	48
3.11 Pharmakodynamische Testung.....	48
4 ERGEBNISSE.....	53
4.1 Enzymatische Synthese.....	53
4.1.1 Gewinnung der Mikrosomen.....	53
4.1.2 Syntheseansatz.....	53
4.1.3 Aufkonzentrierung der Benzodiazepin-Glucuronide.....	54
4.1.4 Präparative Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide.....	54
4.1.5 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide.....	55
4.1.6 Zusammenfassung.....	65
4.2 Chemische Synthese	66
4.2.1 Darstellung von 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranuronsäuremethylester und 1,2,3,4-Tetra-O-pivaloyl- β -D-glucopyranuronsäuremethylester.....	66
4.2.2 Darstellung der Vorstufen 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethylester und 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl- α -D-glucopyranuronsäuremethylester.....	67
4.2.3 Darstellung der Vorstufe 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hydroxy-1-desoxy- β -D-glucopyranuronsäuremethylester.....	67
4.2.4 Schmelzpunkte und Ausbeuten der Vorstufen.....	67
4.2.5 NMR-Messungen der Vorstufen.....	68
4.2.6 Kopplungsreaktionen.....	69
4.2.7 Zusammenfassung.....	70
4.3 Analytik der Enzymassays und Wechselwirkungsstudien.....	70
4.3.1 HPLC.....	70
4.3.2 Kalibrierung.....	72
4.3.3 Validierung.....	75
4.4 Entwicklung der Enzymassays mit humanen Lebermikrosomen.....	79
4.4.1 Lösungsmittelanteil.....	79
4.4.2 Stopp-Reaktion.....	80

4.4.3 Inkubationszeit.....	81
4.4.4 pH-Optimum.....	82
4.4.5 Temperatur-Optimum.....	83
4.4.6 UDPGA-Konzentration.....	84
4.4.7 K_m und V_{max} beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam.....	86
4.4.8 Zusammenfassung.....	91
4.5 UGT-Isoformen.....	92
4.5.1 Isoformen-Screening.....	92
4.5.2 UGT2B7.....	93
4.5.3 UGT2B15.....	95
4.5.4 Zusammenfassung.....	97
4.6 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten.....	97
4.6.1 Glucuronidierung der Opiate ohne Inhibitor.....	98
4.6.2 Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung.....	100
4.6.3 Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung.....	109
4.6.4 Zusammenfassung.....	116
4.7 Pharmakodynamische Testung.....	118
4.7.1 Neuronaler Biosensor.....	118
4.7.2 Zellwachstum.....	118
4.7.3 Temazepam.....	118
4.7.4 R- und S-Temazepam-Glucuronid.....	120
4.7.5 Zusammenfassung.....	121
5 DISKUSSION.....	123
5.1 Enzymatische Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide.....	123
5.2 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide.....	125
5.2.1 LC/MS.....	125
5.2.2 1H -NMR.....	125
5.3 Chemische Synthese.....	128
5.4 Glucuronidierung der Benzodiazepine mit humanen Lebermikrosomen.....	129
5.4.1 Inkubationsbedingungen.....	129

5.4.2 K_m und V_{max} beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam	134
5.5 UGT-Isoformen.....	137
5.6 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten.....	139
5.6.1 Glucuronidierung der Opiate ohne Inhibitor.....	139
5.6.2 Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung	141
5.6.3 Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung	143
5.6.4 Vergleich struktureller Einflüsse der Substanzen.....	145
5.6.5 Hemmtyp.....	148
5.7 Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo.....	149
5.8 Pharmakodynamische Testung.....	153
5.9 Ausblick.....	154
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	157
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	159
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	173
8.1 Lösungsmittel/Reagenzien.....	173
8.2 Spektroskopie.....	174
8.3 Enzymkinetik.....	175
8.4 Statistik.....	175
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	177
10 ANHANG.....	185
DANKSAGUNG.....	197
LEBENS LAUF.....	199

Strukturformeln häufig zitieter Verbindungen



1 Einleitung

1.1 Biotransformation

Der Mensch nimmt täglich mit und neben der Nahrung eine Vielzahl von Fremdstoffen (Xenobiotika) auf. Stoffe, aber auch Arzneistoffe, die vom Körper nicht benötigt werden oder gar toxisch wirken, können über Biotransformationsreaktionen so verändert werden, dass sie besser ausgeschieden werden. Deshalb besitzt der Organismus Enzymsysteme, die lipophile Xenobiotika in hydrophilere, leichter über die Niere ausscheidbare Stoffe umwandeln können. Der Umwandlungsprozess von Fremdstoffen wird als Biotransformation bezeichnet. Sie erfolgt vor allem in der Leber, aber auch teilweise in Niere, Darm, Lunge, Haut oder Blut (Testa und Jenner 1976; Mutschler 2001). Die daran beteiligten Enzyme können entweder strukturell an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien oder gelöst im Zytosol vorliegen. Aufgrund einer breiten Substratspezifität setzen sie sowohl körpereigene Stoffe aus Stoffwechselfvorgängen als auch Xenobiotika (Mutschler 2001) um. Die Biotransformation dient somit der Entgiftung und Ausscheidung sowohl körpereigener als auch körperfremder Substanzen. Daneben können Metabolisierungsreaktionen aber auch zu Bioaktivierungen oder Biotoxifizierungen führen. Substanzen, die zunächst keine pharmakologische Wirkung aufweisen (Prodrug), können dadurch in aktive Verbindungen mit therapeutisch erwünschten Effekten überführt werden (Testa 1995). So können Phase-II-Metaboliten eine höhere Wirksamkeit als die Muttersubstanz besitzen (z. B. Morphin-6-Glucuronid) (Osborne et al., 2000). Bei der Biotoxifizierung findet die Bildung giftiger, mutagener oder karzinogener Substanzen statt.

Die Biotransformation von Arzneistoffen wird im Allgemeinen in Phase I und Phase II eingeteilt. Im Phase-I-Metabolismus finden Funktionalisierungsreaktionen statt, bei denen funktionelle Gruppen an der Ausgangsverbindung eingeführt oder freigelegt werden. Die größte Bedeutung für die im Phase-I-Metabolismus stattfindende oxidative Biotransformation besitzen Monooxygenasen, die Hämproteine vom Typ des Cytochrom P450 (CYPs) enthalten (Mutschler 2001). Im Rahmen von Phase-II-Reaktionen werden funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen wie Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion und Aminosäuren gekoppelt.

1.1.1 Glucuronidierung

Die Glucuronidierung gehört zu den Phase-II-Reaktionen der Biotransformation und stellt die wichtigste Kopplungsreaktion dar. Sie benötigt den Co-Faktor Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA). Glucuronsäure ist sehr hydrophil, da sie zusätzlich zur Säurefunktion alkoholische OH-Gruppen besitzt. Die Synthese von aktivierter Glucuronsäure erfolgt durch Oxidation von Uridin-5'-diphosphoglucose (UDP-

Glucose), die zuvor im Zytosol aus Glucose-1-phosphat und Uridin-5'-triphosphat (UTP) gebildet wurde. Der für die enzymatische Reaktion erforderliche Co-Faktor liegt ausschließlich in α -glykosidischer Form vor und wird vor allem in der Leber, aber auch der Niere und der Darmwand auf die entsprechenden Substrate übertragen. Konjugiert werden sekundäre und tertiäre Alkohole, Phenole, Carbonsäuren und Amine körpereigener Substanzen (Steroide, Gallensäuren) und körperfremder Substanzen (Arzneistoffe, Drogen).

Formal läuft die Reaktion im Sinne einer S_N2 -Reaktion ab, bei der Uridin-5'-diphosphat (UDP) und ein β -Glucuronid gebildet wird (Abbildung 1.1). Die entstandenen Konjugate sind besser wasserlöslich, was oftmals erst die Ausscheidung dieser Substanzen renal und/oder biliär ermöglicht. Glucuronide können wieder zu ihren Ausgangsverbindungen hydrolysiert werden. Dies ist oft der Fall, wenn Konjugate mit der Galle in den Darm gelangen. Man bezeichnet dies als enterohepatischen Kreislauf (Mutschler 2001). Diesen durchlaufen z.B. die Opiate (Morphin).

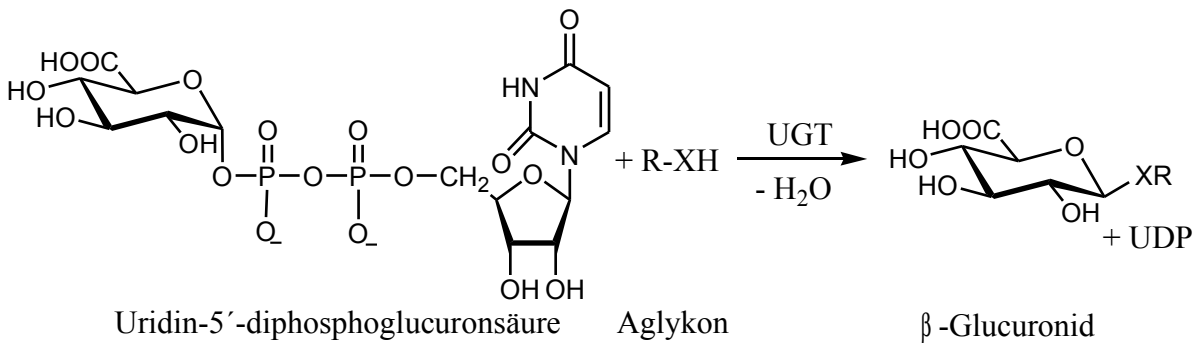


Abbildung 1.1 Konjugation von Aglyka mit Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (Miners und Mackenzie 1991).

1.1.2 UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs)

UDP-Glucuronyltransferasen gehören in die Gruppe der Transferasen, die in den Phase-II-Reaktionen die Übertragung von körpereigenen Verbindungen auf Substrate katalysieren. Die UGTs sind an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebundene Enzyme, deren aktives Zentrum auf der luminalen Seite angeordnet ist. Mittels verschiedener Transporter überwinden Co-Faktor, Substrat und Metabolit die Diffusionsbarriere (Miners et al., 2004).

Die UGTs gehören wie die CYPs zu einer Supergenfamilie (Mackenzie et al., 1997). Die Klassifikation dieser Enzyme erfolgt anhand ihrer Abweichung in der Aminosäuresequenz in die zwei Familien UGT1 und UGT2, wobei letztere in zwei Subfamilien (2A und 2B) unterteilt wird. Die Enzyme aus der Familie der UGTs sind ein Beispiel für Isoenzyme. Diese sind multiple Formen eines Enzyms mit identischen oder sehr ähnlichen katalytischen Eigenschaften, aber unterschiedlicher Primärstruktur (Aminosäuresequenz). Die Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihres Expressionsorts. Es gibt UGTs mit einer sehr geringen Substratspezifität, die viele verschiedene Substanzen umsetzen, ebenso gibt es jedoch

UGTs, die spezifisch nur wenige Substanzen umsetzen (Tephly 1990; Ebner und Burchell 1993; King et al., 2000b). Das UGT-Enzymmuster ist von Mensch zu Mensch verschieden. Individuelle Unterschiede wie Rasse, Geschlecht, aber auch Lebensgewohnheiten wie der Genuss von Tabak und Alkohol, Lebererkrankungen oder auch Arzneimittelkonsum (Enzyminduktion, Enzymhemmung) führen zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten (Lin und Wong 2002).

1.1.3 In vitro Glucuronidierungen

Eine häufig angewendete Methode zur Untersuchung der in vitro Glucuronidierung stellt die Verwendung von Lebermikrosomen dar, die entweder aus Tieren (Sharer et al., 1995; Soars et al., 2001a) oder Menschen (Court et al., 2002; Soars et al., 2003; Jurowich et al., 2004; Boldt et al., 2007) gewonnen werden. Mit Hilfe der derzeit zur Verfügung stehenden rekombinanten DNA-Methodik ist es auch möglich, die cDNA einzelner UGT-Isoenzyme in Zelllinien, die keine oder minimale UGT-Level besitzen, spezifisch zu exprimieren. Die rekombinanten Zellen können intakt oder zur Mikrosomenpräparation für in vitro-Tests verwendet werden. Fast alle humanen UGT-Isoenzyme sind derzeit in rekombinanter Form verfügbar. Der Einsatz dieser rekombinanten UGT Zelllinien ermöglicht die Aufklärung der Substratspezifität und -selektivität der UGT-Isoformen (King et al., 2000b). Neue Arzneistoffe können routinemäßig dahingehend untersucht werden, welche Isoformen für ihre Glucuronidierung verantwortlich sind (Ethell et al., 2001; Kemp et al., 2002).

Typischerweise enthalten die Enzymassays das Substrat, den Co-Faktor Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA), Magnesiumchlorid, humane Lebermikrosomen (HLM) bzw. die isolierten Isoenzyme und Brij 58 oder Alamethicin in Inkubationspuffer. Die beiden letzten Substanzen sind von größter Bedeutung für den Einsatz des Assays. Die UGTs sind membrangebundene Enzyme, deren aktives Zentrum zur luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ausgerichtet ist. Die Membran des ERs stellt somit eine Diffusionsbarriere für Substrat und Co-Substrat sowie für den Abtransport der Metaboliten dar. Dieses Phänomen wird auch als Latenz bezeichnet. Durch verschiedene Techniken wurde versucht, die Latenz zu überwinden. Dies wurde z.B. mit Detergentien wie Brij 58 (Shepherd et al., 1989; Coughtrie und Sharp 1991) oder durch eine Vorbehandlung der Mikrosomen mit Hilfe von Ultraschall (Vanstapel und Blanckaert 1988a; Soars et al., 2001b; Soars et al., 2003) und erst in jüngerer Zeit mit der porenformenden Substanz Alamethicin (Fisher et al., 2000) erreicht. Alamethicin ist ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Peptid-Antibiotikum aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride*, das sich in die Membran einlagert und Poren formt (He et al., 1996). Im Gegensatz zu Detergentien, die früher fast ausschließlich zum Einsatz kamen, werden CYP-haltige Enzyme durch den Einsatz von Alamethicin nicht inhibiert (Bechinger 1997; Fisher et al., 2000). Eine Konzentration von 50 µg Alamethicin/mg Protein (Fisher et al., 2000; Court et al., 2002; Soars et al., 2003) erwies sich als optimal, um die Enzyme maximal zu aktivieren. Einige weitere Parameter unterscheiden sich in der Literatur deutlich voneinander. So sind z.B. Co-

Substrat-Konzentrationen zwischen 2,5 mM (Court et al., 2002) und 15 mM zwischen 2,5 mM (Court et al., 2002) und 15 mM (Sawe et al., 1982) beschrieben. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Glucuronidierung ist der pH-Wert des Inkubationspuffers. Verschiedene Autoren stellten fest, dass die UGTs im leicht alkalischen pH-Bereich höhere Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen als bei physiologischem pH-Wert. Sawe et al. (1982) führten Inhibitionsstudien zwischen Morphin und Oxazepam bei pH 8,7 durch, aber die meisten Studien wurden trotz dieser Tatsache bei physiologischem pH-Wert durchgeführt, um die in vivo Situation besser zu simulieren. Auch zur Inkubationszeit gibt es sehr unterschiedliche Angaben. Diese reichen für Oxazepam von 30 min (Sawe et al., 1982) bis hin zu 360 min (Court et al., 2002). Die Inkubationsbedingungen für UGT-Assays unterscheiden sich in den verschiedenen Laboratorien deutlich voneinander (Soars et al., 2003). Die Bedingungen müssen immer für das jeweilige Substrat und für den Versuchsaufbau optimiert werden.

1.1.4 Wechselwirkungsstudien im Phase-II-Metabolismus

Verschiedene Arzneistoffe wurden in vitro als Inhibitoren der UGT-vermittelnden Glucuronidierung identifiziert. Immunsuppressiva wie Tacrolimus (Zucker et al., 1997; Zucker et al., 1999) sind starke UGT-Inhibitoren. Andere Beispiele stellen verschiedene Wirkstoffe der Substanzklasse der nichtsteroidalen Antirheumatika, Benzodiazepine und trizyklische Antidepressiva dar (Kiang et al., 2005).

In der Literatur sind in den letzten Jahrzehnten verschiedene Inhibitionsstudien zwischen Opiaten und Benzodiazepinen sowohl mit humanen als auch mit Hundelebermikrosomen beschrieben worden (Pacifci und Rane 1981; Sawe et al., 1982; Meacham et al., 1986; Patel et al., 1995b). Erst kürzlich konnte in einer Studie von Hara et al. (2007) mit 21 Arzneistoffen gezeigt werden, dass 10 der 21 untersuchten Arzneistoffe die Morphin-Glucuronidierung sowohl zu Morphin-3-Glucuronid (M3G) als auch zu Morphin-6-Glucuronid (M6G) stark inhibieren. Dabei stellt die Isoform UGT2B7 eine Hauptisoform für die Umsetzung der Opiate dar. Nicht alle der in der beschriebenen Studie eingesetzten Arzneistoffe stellten jedoch UGT2B7-Substrate dar. Die eingesetzten Benzodiazepine hemmten die Morphin-Glucuronidierung in folgender Reihenfolge: Diazepam > Lorazepam > Oxazepam. Diese Ergebnisse erwiesen sich als übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen bei denen diese Arzneistoffe die Zidovudin-Glucuronidierung in gleicher Weise inhibierten. Zidovudin wird ebenfalls durch UGT2B7 umgesetzt (Court et al., 2003). Auf diese Studien wird in der Diskussion der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate detailliert eingegangen (Diskussion 5.6.2, S.141 und 5.6.3, S.143).

1.1.5 Pharmakologische Aspekte von Glucuroniden

Die Glucuronidierung wird im Allgemeinen als Detoxifizierungsreaktion angesehen, welche die biologische Aktivität eines Substrates eliminiert. Erst in neuerer Zeit wird die Glucuronidierung auch als Toxifizierungs- oder Aktivierungsmechanismus betrachtet, da sie zur Bildung biologisch aktiver oder toxischer Metabolite führen kann.

(Mulder 1992; Ritter 2000). Dies ist z.B. bei Morphin-6-Glucuronid der Fall, welches eine höhere analgetische Wirkung als die Muttersubstanz Morphin besitzt und als eigentlicher biologisch aktiver Metabolit angesehen wird (Gong et al., 1991; Mulder 1992; Coffman et al., 1997). Ein weiteres Beispiel stellt die Retinolsäure dar (Formelli et al., 1996). Toxische Glucuronide sind beispielsweise die D-Ring-Glucuronide von Steroiden (E2, Estron, Testosteron), da sie zu Cholestase (Verminderung des Gallenflusses) führen können, während das entsprechende Steroid den entgegengesetzten Effekt hat und den Gallefluss erhöht, wenn es an der 3-OH-Gruppe konjugiert ist (Meyers et al., 1980; Meyers et al., 1981; Vore et al., 1983).

Wird an einer Carboxylgruppe konjugiert, entstehen daraus Acyl-Glucuronide, die somit Ester-Glucuronide darstellen. Diese Metaboliten besitzen toxikologische Relevanz und werden z.T. mit den unerwünschten Nebenwirkungen von Medikamenten in Verbindung gebracht (Boelsterli et al., 1995; Boelsterli 2002; Bailey und Dickinson 2003; Sakaguchi et al., 2004). Acyl-Glucuronide werden sowohl aus endogenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Retinolsäure, Lithocholsäure) als auch aus einer ganzen Reihe von Xenobiotika gebildet. Zu dieser Gruppe gehören einige häufig angewendete Arzneistoffe zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen, wie beispielsweise Diclofenac und Ketoprofen (Terrier et al., 1999; Tukey und Strassburg 2000; Sakaguchi et al., 2004; Kiang et al., 2005).

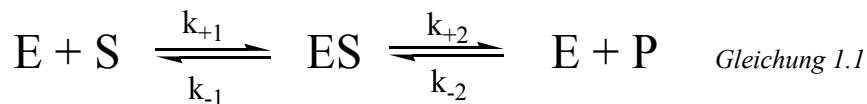
Mit geeigneten Modellen oder Biosensoren lassen sich toxische bzw. pharmakologisch aktive Metabolite bereits im Stadium der Arzneimittelforschung identifizieren. Systeme aus neuronalen Zellen und Multielektrodenarrays wurden in der Vergangenheit schon erfolgreich zur sensitiven und dosisabhängigen Detektion pharmakologischer Substanzen eingesetzt (Morefield et al., 2000; Stett et al., 2003; Xia und Gross 2003; Gopal und Gross 2004; Martinoia et al., 2005), dennoch wurden sie bisher nicht als ein zuverlässiges System für Studien in der klinischen Pharmakologie und Toxikologie akzeptiert. Die Modifikation der bei den meisten neuronalen Geweben spontan generierten Netzwerkaktivität kann als Grundlage zur Detektion neuroaktiver Substanzen herangezogen werden.

1.2 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik beschäftigt sich mit dem zeitlichen Verlauf enzymatischer Reaktionen. Eine zentrale Größe hierbei ist die Reaktionsgeschwindigkeit. Leonor Michaelis und Maud Menten legten 1913 mit ihrem Modell den Grundstein für die Enzymkinetik. Ein Hauptziel der Enzymkinetik ist die Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit mit geeigneten Formeln. Um ein besseres Verständnis für Enzymfunktionen zu bekommen, ist die enzymkinetische Analyse unerlässlich. Die Charakterisierung von Enzymen erfolgt aufgrund der Substrataffinität und der Wechselzahl. Zur Bestimmung dieser Werte dienen häufig computergestützte Verfahren.

1.2.1 Enzymkinetische Parameter (K_m , V_{max})

Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Affinität zwischen Substrat und Enzym sind ein Maß für die Enzymleistung. Grundlage ist, dass ein Enzym (E) mit einem Substratmolekül (S) einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) bildet und dieser entweder in Enzym und Produkt (P) oder in seine Ausgangsbestandteile zerfällt. Was schneller passiert, hängt von der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k ab.



Die katalytische Wirksamkeit von Enzymen beruht darauf, dass sie die Aktivierungsenergie durch Stabilisierung des Übergangszustandes so weit reduzieren, dass es zu einer Stoffumsetzung kommt. Eine enzymatische Reaktion unterteilt sich in drei verschiedene Phasen, die zeitlich nacheinander durchlaufen werden. In der sehr kurzen Anfangsphase bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex, der Anteil der freien Enzymmoleküle nimmt ab. In dieser Phase ist die Umsatzgeschwindigkeit noch gering. In der zweiten Phase erreicht die Umsatzgeschwindigkeit ihren Maximalwert (V_{max}). An diesem Punkt sind bei Substratsättigung alle Substratbindungsstellen aller Enzymmoleküle besetzt, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung davon abhängt, wie schnell die Substratmoleküle umgesetzt werden können. Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes insgesamt ändert sich kaum, da genauso viele neue Enzym-Substrat-Komplexe gebildet wie Substrate von den Enzymen zu Produkten umgewandelt werden. Da dieser Zustand einem Gleichgewicht ähnlich ist, wird er auch als Steady-state bezeichnet. In dieser Phase sind Substratabnahme und Produktbildung linear. Während der letzten Phase nimmt die Konzentration an Enzym-Substrat-Komplexen infolge der Erschöpfung des Substratüberschusses allmählich ab, daher sinkt die Umsatzgeschwindigkeit wieder.

V_{max} ist ein Maß dafür, wie schnell eine Enzymreaktion abläuft. Sie ist, im Gegensatz zur Michaelis-Konstante (K_m), abhängig von der Enzymkonzentration. K_m ist ein direktes Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat und steht für die Substratkonzentration, bei der das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit ($V_{max}/2$) arbeitet. K_m und V_{max} stehen dabei über die Michaelis-Menten-Gleichung wie folgt miteinander in Beziehung:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

V	Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min/g]
[S]	Substratkonzentration [mM]
K_m	Michaelis-Konstante [mM]

Graphisch lässt sich dies in einem Michaelis-Menten-Diagramm darstellen. Wird die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen die zugehörige Substratkonzentration aufgetragen, so ergibt sich eine Sättigungshyperbel. Zu Anfang steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration linear an und nähert sich dann asymptotisch dem Maximalwert. Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration hat keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit der Umsetzung, da alle Enzymmoleküle bereits mit Maximalgeschwindigkeit die Umsetzung katalysieren. Aus der Hyperbel im Michaelis-Menten-Diagramm lässt sich V_{\max} kaum exakt ablesen; dadurch kann auch K_m nicht genau bestimmt werden. Um diese Parameter besser darstellen bzw. ablesen zu können, werden verschiedene Linearisierungsverfahren benutzt. Da in dieser Arbeit lediglich das Lineweaver-Burk-Diagramm verwendet wurde, soll an dieser Stelle nur darauf eingegangen werden. Bei der graphischen Darstellung des Lineweaver-Burk-Diagramms handelt es sich um die reziproke Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit ($1/V$) gegen die reziproke Substratkonzentration ($1/[S]$). Dabei entsteht eine Gerade mit der Steigung K_m/V_{\max} , welche die Abszisse bei $1/K_m$ schneidet.

Die Lineweaver-Burk-Gleichung lautet:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Gleichung 1.3}$$

V	Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]
V_{\max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min/g]
[S]	Substratkonzentration [mM]
K_m	Michaelis-Konstante [mM]

Ein weiterer Vorteil des Linearisierungsverfahrens nach Lineweaver-Burk besteht darin, dass sich Hemm- und Mehrsubstrat-Mechanismen gut beurteilen lassen. Ein wesentlicher Nachteil ist die Ungleichverteilung der Daten. Die reziproke Darstellung verursacht eine Stauchung der Daten in Richtung des Achsenkreuzes bzw. eine Spreizung der Daten in die entgegengesetzte Richtung.

1.2.2 Enzyminhibition

Als Enzymhemmung (Inhibition) werden alle Vorgänge bezeichnet, die zu einer Verringerung oder zum völligen Verlust der Aktivität eines Enzyms führen. Da Inhibitoren ebenfalls eine Affinität zum Enzym besitzen, lässt sich für den Inhibitor analog zu K_m eine Konstante definieren, die als Inhibitorkonstante (K_i) bezeichnet wird und in der Dimension einer Molarität angegeben wird. Starke Inhibitoren haben einen niedrigen K_i -Wert. Grundlegend wird die irreversible von der reversiblen Hemmung

unterschieden. Bei der irreversiblen Hemmung geht ein Inhibitor eine unter physiologischen Bedingungen nicht umkehrbare Verbindung mit dem Enzym ein. Sie wird von Substanzen hervorgerufen, die entweder mit extrem hoher Affinität an das Enzym binden oder das Enzym sowohl chemisch als auch physikalisch verändern. Die Aktivität des Enzyms geht dadurch verloren. Bei der reversiblen Hemmung bindet der Inhibitor nur so an das Enzym, dass der Enzym-Inhibitor-Komplex wieder in seine Bestandteile zerfallen kann. Nach einer reversiblen Hemmung kann die Enzymaktivität wieder hergestellt werden. In diesem Fall werden aufgrund der verschiedenen Auswirkungen auf die enzymkinetischen Konstanten vier verschiedene Typen unterschieden:

Kompetitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung konkurrieren Substrat und Inhibitor um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Der Inhibitor kann entweder nicht durch das Enzym umgesetzt werden oder ein konkurrierendes Substrat darstellen (d.h. das Enzym kann verschiedene Substrate binden). Bei Erhöhung der Konzentration eines der Substrate können sie sich gegenseitig verdrängen. K_m wird in Gegenwart des Inhibitors um den Faktor i erhöht. Die Maximalgeschwindigkeit bleibt jedoch unverändert. Deshalb schneiden sich im Lineweaver-Burk-Diagramm alle Geraden auf der Ordinaten im Punkt $1/V_{max}$.

Nicht-kompetitive Hemmung

Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor nicht im Substrat-bindenden Teil des Enzyms, dem aktiven Zentrum. Der Inhibitor ist in der Lage, sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex zu binden. Die Bindung des Inhibitors führt deshalb nicht zur Blockierung der Substratbindung, sondern zu einer Konformationsänderung des Enzyms, das dadurch in seiner Aktivität vermindert wird. Der Hemmstoff kann deshalb auch durch eine erhöhte Substratzugabe nicht verdrängt werden. Dadurch ändert sich K_m nicht, V_{max} wird allerdings kleiner als bei der ungehemmten Reaktion, da ständig Enzymmoleküle der Reaktion entzogen werden. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden für die Reaktionen mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration in einem Punkt auf der Abszisse, und zwar im Wert $-1/K_m$.

Gemischte Hemmung

Bei der gemischten Hemmung bindet der Inhibitor entweder an das aktive Zentrum, um einen kompetitiven Enzym-Inhibitor-Komplex zu bilden, oder an einen Enzym-Substrat-Komplex, um als nicht-kompetitiver Inhibitor zu wirken. So haben Inhibitoren vom gemischten Typ Eigenschaften von kompetitiven und nicht-kompetitiven

Hemmstoffen. V_{\max} bleibt gleich und K_m wird entweder größer oder kleiner. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegt der Schnittpunkt der Geraden mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration oberhalb des negativen Abszissenabschnitts.

Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung geht der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex eine Bindung ein. Das Substrat kann ungehindert an das Enzym binden, wobei die Bindungsstelle für den Hemmstoff erst in Wechselwirkung mit dem Substrat gebildet wird. Bei diesem Hemmtyp wird der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex nicht oder nur verlangsamt zum Enzym-Produkt-Komplex umgesetzt. V_{\max} und K_m werden vermindert, aber das Verhältnis V_{\max}/K_m bleibt konstant. Im Lineweaver-Burk-Diagramm ergeben sich parallele Geraden ohne Schnittpunkt. Dieser Typ der Enzymhemmung zählt zu den selteneren Hemmtypen.

1.3 Möglichkeiten zur Darstellung von O-Glucuroniden

1.3.1 Chemische Synthese

Generell stellen alle Glucuronid-Synthesen Modifikationen der Bildung von 1-*O*-Glykosiden dar, jedoch sind die Glucuronide schwieriger herzustellen als ihre korrespondierenden Glucopyranosen. Glucuronate benötigen von allen gängigen Zuckern die höchste Aktivierung zur Kopplung (Müller et al., 1994).

1.3.1.1 Synthese der Vorstufen

Der am häufigsten verwendete Zucker für die Darstellung einer Vielzahl von Arzneistoff-Glucuroniden (Stachulski und Jenkins 1998) ist der acetylgeschützte Bromzucker (Bollenback et al., 1955) der Glucuronsäure. Neben den Acetylenschutzgruppen finden auch komplexere Acylschutzgruppen, wie Isobutyryl- (Scheinmann et al., 1993) und Pivaloylschutzgruppen (Vlahov und Snatzke 1983) Anwendung. Diese komplexeren Acylschutzgruppen sind weniger instabil und bilden keine Orthoester, was eine höhere Ausbeute des Kopplungsproduktes zur Folge hat. Die höchste Ausbeute an Paracetamol-Glucuronid konnte mit Isobutyrylderivaten erzielt werden (Scheinmann et al., 1993). Der Nutzen dieser Methodik wird allerdings durch die erschwerte hydrolytische Abspaltung der Schutzgruppen eingeschränkt. Auch die Verwendung des Hydroxyzuckers nimmt immer mehr an Bedeutung zu, da dieser bei mehreren Kopplungsreaktionen Einsatz findet. Häufig wird die Lewis-Säure Trimethylsilyl-Trifluormethansulfonat (TMSOTf) als Promotor in Verbindung mit dem Hydroxyzucker eingesetzt (Fischer et al., 1984). Sowohl Alkohole als auch Phenole wurden so glucuronidiert, und es wird angenommen, dass der Silylether (Abbildung 1.2) oder seine *O*-1 protonierte Form das erste Zwischenprodukt darstellt.

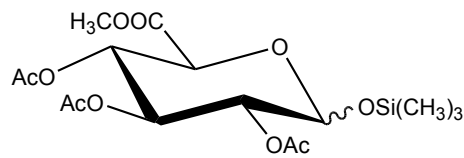


Abbildung 1.2 Zwischenprodukt des Hydroxyzuckers.

Die Pionierarbeit von Schmidt in Bezug auf die Glykosidierung unter Verwendung von Trichloracetimidaten (Schmidt und Kinzy 1994) führte zu einer steigenden Anzahl von Anwendungen in der Glucuronidierung. Aus dem oben beschriebenen Hydroxyzucker lässt sich mit Natrium- oder Kaliumcarbonat in Dichlormethan der Trichloracetimidat-Zucker gewinnen (Brown et al., 1997) (Abbildung 1.3).

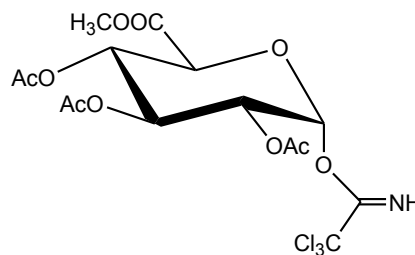


Abbildung 1.3 Trichloracetimidat-Vorstufe.

1.3.1.2 Kopplungsreaktionen

Die zentrale Reaktion bei der Synthese von Glucuroniden ist die Knüpfung der glykosidischen Bindung zwischen dem Arzneistoff und dem Zucker. Von den zahlreichen Methoden, welche die Zuckerchemie für die Darstellung von Glykosiden zur Verfügung stellt, werden im Folgenden nur diejenigen erwähnt, die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet wurden.

1.3.1.3 Königs-Knorr-Synthese

Königs und Knorr setzten 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucopyranose (Acetobromglucose) in Methanol bzw. Ethanol in Gegenwart von Silbercarbonat um und erhielten so das peracetylierte Methyl- bzw. Ethyl- β -D-glucopyranosid (Königs und Knorr 1901) (Abbildung 1.4). Das in dieser Reaktion verwendete Silbercarbonat dient als Promotor und nicht als Katalysator und muss in äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Bei der Reaktion entstehen Silberbromid und Kohlensäure. Silberionen bilden stabile Salze mit den Bromidionen und entziehen so das Bromid aus dem Reaktionsgleichgewicht, wodurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produkts gedrängt wird.

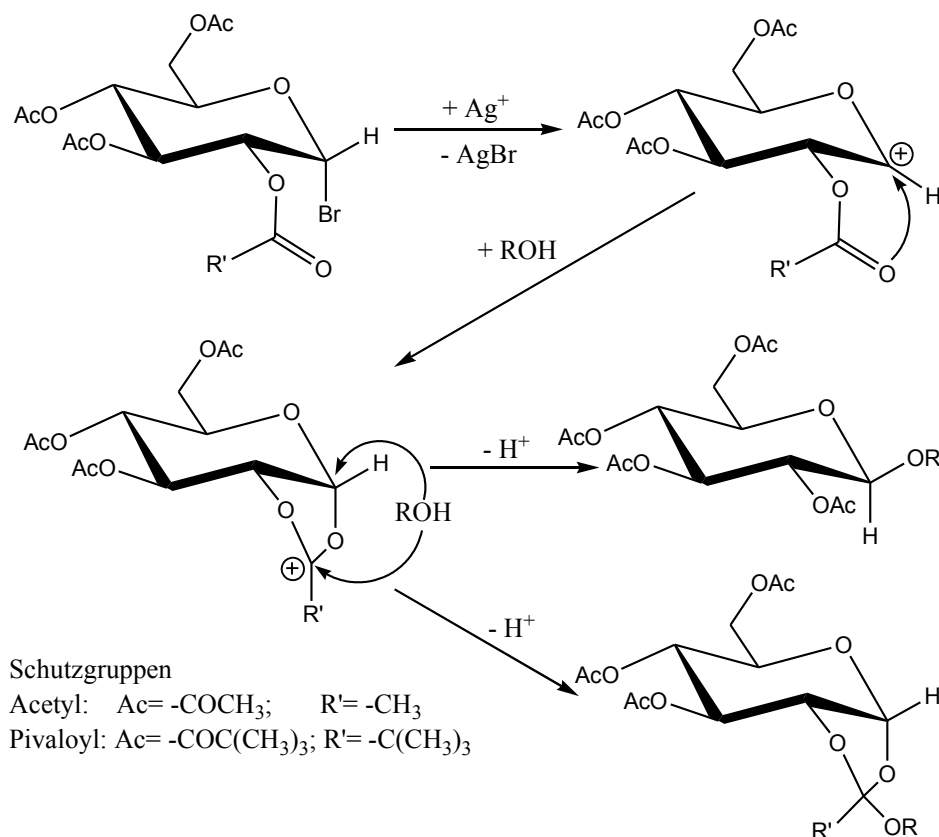


Abbildung 1.4 Reaktionsmechanismus der Königs-Knorr-Synthese.

1.3.1.4 Michael-Synthesen

Phenolglucoside sind durch Umsetzung von Acetochlorglucose mit Alkaliphenolaten zugänglich (Michael 1879). Diese der Williamson'schen Ethersynthese entsprechende Glykosidierung und ihre Modifikationen (bromierte anstelle der chlorierten Zucker) liefern β -D-Glucoside und -Glucuronide, weil es beim Angriff des Nucleophils auf das C-1 der α -Acylhalogenose in einer S_N2-Reaktion zur Walden'schen Umkehr kommt. Von besonderem Vorteil ist diese Reaktion bei der Darstellung der Phenolglykoside von Verbindungen, die sowohl alkoholische als auch phenolische Hydroxyfunktionen enthalten. Durch die Verwendung von wässrigen Alkalilaugen wird erreicht, dass nur das Phenolat, nicht aber das Alkoholat entsteht. Morphin-3-Glucosid (Mannich 1912), aber auch Morphin-3-Glucuronid (Yoshimur et al., 1968) konnten auf diese Weise synthetisiert werden (Abbildung 1.5). Bei der Darstellung von Pentazocin-Glucuronid (Goenechea et al., 1985) und der Glucuronide der Phase-I-Metaboliten des Tramadols (Goenechea et al., 1991) nach diesem Verfahren erwies sich die Einführung von Pivaloylschutzgruppen als vorteilhaft. Die oben angeführten Synthesen laufen in polaren Lösungsmitteln wie Alkohol oder Aceton-Wasser-Gemischen ab. Dabei bewirkt das alkalische Medium die Abspaltung der Schutzgruppen, so dass direkt das Glucosid oder das Glucuronid gebildet wird. Alternativ zu Natriumhydroxid werden mildere Basen wie Diazabicycloundecen (DBU) zur Deprotonierung der Hydroxygruppe eingesetzt.

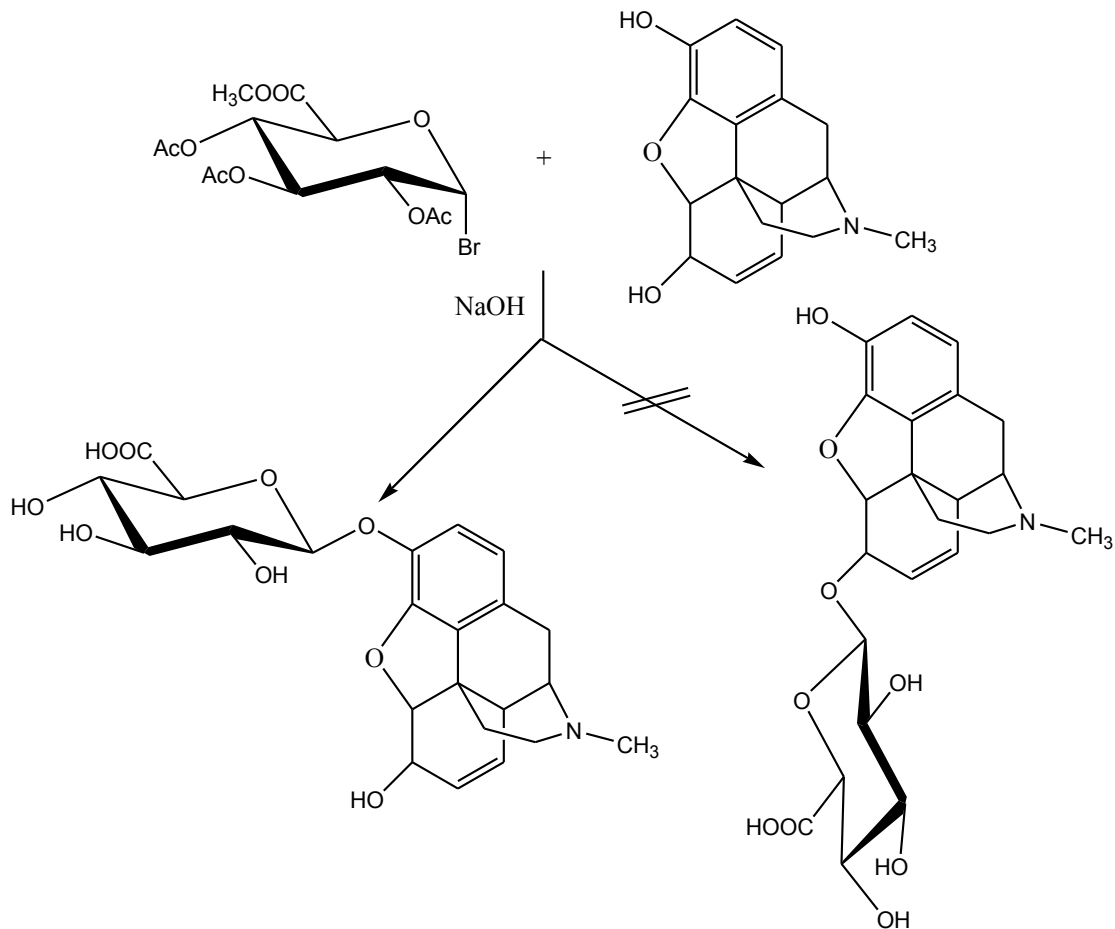


Abbildung 1.5 Darstellung von Morphin-3-Glucuronid durch Michael-Synthese.

1.3.1.5 Sonstige Methoden

Bei einer anderen Gruppe von Methoden wird der glykonische oder der aglykonische Teil des Moleküls nach der Kopplungsreaktion modifiziert: Glucuronide können durch selektive Oxidation der 6-Hydroxygruppe mit Pt/O_2 aus den entsprechenden β -D-Glucosiden dargestellt werden (Tsou und Seligman 1953; Brewster et al., 1979). Bei der Synthese des Dopamin-4-Glucuronids wurde zunächst 3-Benzoyloxy-4-Hydroxybenzaldehyd glucuronidiert. Nach mehreren Modifikationen des aglykonischen Teils und nach Abspaltung der Schutzgruppen konnte das Dopamin-4-Glucuronid gewonnen werden (Hansson und Rosengren 1976).

1.3.1.6 Abspaltung der Schutzgruppen und Isolierung der Glucuronide

Die Acetyl- oder Pivaloylgruppen und der Methylrest an der Carboxylfunktion des Glucuronids werden durch alkalische Hydrolyse mit NaOH oder KOH in wässrigem Alkohol entfernt. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen mit Alkalilauge liegen alle Säuren, also auch die Glucuronide, in der wässrigen Lösung als Alkalisalze vor. Die freien Säuren können durch Chromatographie an Ionenaustauschern (Yoshimur et al., 1968) oder an Umkehrphasen (Goenechea et al., 1991) isoliert werden. Bei einem

anderen Verfahren macht man sich die geringe Löslichkeit der Bleisalze der Glucuronide zunutze (Kamil et al., 1952). Durch Zugabe von Bleiacetat fällt das Bleiglucuronat aus. In eine wässrige Suspension des Fällungsrückstandes wird Schwefelwasserstoff eingeleitet, wobei Bleisulfid ausfällt und das Glucuronid in Lösung geht. Führt man die Schutzgruppenabspaltung mit Bariumhydroxid durch und säuert dann mit Schwefel- oder Oxalsäure an, so fallen Bariumsulfat oder -oxalat aus, während die Glucuronide, aber auch Essigsäure oder Pivalinsäure in Lösung bleiben. Es hat sich daher als vorteilhaft erwiesen, zunächst nur die Säureschutzgruppen in absolutem Methanol mit Natriummethylat zu entfernen (Helferich 1957). Dabei bleibt der Methylester des Glucuronids erhalten, Methylacetat oder Methylpivalat können abdestilliert werden. Anschließend wird das Methylglucuronat wie oben beschrieben mit Bariumhydroxid verseift.

1.3.2 Enzymatische Synthese

Eine Alternative zur klassischen chemischen Synthese stellt die enzymatische Synthese dar. Hier werden entweder durch Gewebepräparation, z.B. von Leber- oder Darmproben, oder durch Isolierung rekombinanter Isoenzyme UDP-Glucuronyltransferasen gewonnen, die als katalysierende Enzyme die aktivierte Glucuronsäure auf das jeweilige Substrat übertragen.

Durch Zellfraktionierung dieser Gewebeproben werden Mikrosomen, die Membranvesikel des Endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellen, angereichert. Die Isolierung der Mikrosomen wird üblicherweise durch differentielle Zentrifugation erreicht (Duve 1971). Nach einer mechanischen Zerkleinerung des Ausgangsmaterials wird die unterschiedliche Dichte der Zellorganellen ausgenutzt, um eine sukzessive Abtrennung zu erreichen.

Durch die hohe Spezifität der UGT liegt die Stärke der enzymunterstützten Synthese im Vergleich zur chemischen Synthese in der Gewinnung von stereochemisch reinen Produkten (Mackenzie et al., 1992). Ein Nachteil gegenüber der chemischen Synthese besteht in der geringen Ausbeute der Glucuronide. Eine technische Möglichkeit, die Ausbeute der enzymatischen Glucuronidierungssysteme mit Lebermikrosomen zu erhöhen, basiert auf Hohlfasern, die Lipidmembranen enthalten. Diese sind bekannt als immobilisierte künstliche Membranen (immobilised artificial membrane IAM) und bilden mikrosomale immobilisierte Enzymreaktoren (MIER) (Stachulski und Jenkins 1998). Um das Problem der Produkthemmung zu überwinden, kommt häufig eine kontinuierliche Durchspülung zum Einsatz. Die damit erzielten hohen Umsatzraten von manchen Substraten haben zur Entwicklung einer Vorsäule für die HPLC-Analyse der Glucuronide geführt. Eine käuflich zu erwerbende IAM-Kartusche ist mit nichtsolubilisierten Rattenlebermikrosomen beladen (Alebic-Kolbah und Wainer 1993).

In der Literatur wurden einige enzymatische Synthesen zur Gewinnung von Referenzsubstanzen wie z.B. den Glucuroniden von Nandrolon und Testosteron (Kuuranne et al., 2002) sowie Propofol und Buprenorphin (Soars et al., 2002)

beschrieben. Als Enzymquelle kamen Lebermikrosomen verschiedener Tierspezies zum Einsatz, wie z.B. von Wistarratten (Luukkanen et al., 1999; Kuuranne et al., 2002), Hasen (Lehman et al., 1983), Hunden und Affen, aber auch der Einsatz von humanen Lebermikrosomen (Soars et al., 2002) für die enzymatische Synthese wurde beschrieben. Soars et al. (2002) untersuchten vor der Synthese die entsprechenden Glucuronidierungskapazitäten der verschiedenen Lebermikrosomen aus den unterschiedlichen Spezies für das jeweilige Substrat. Dabei erwiesen sich Hundelebermikrosomen für die Gewinnung von Morphin-3-Glucuronid als am aktivsten. Auch die Verwendung von Schweinelebermikrosomen wurde bereits für die Synthese der Dobutamin-Glucuronide publiziert (Alonen et al., 2005).

1.4 Benzodiazepine

Die Substanzklasse der Benzodiazepine ist die weitaus wichtigste Gruppe innerhalb der Tranquillantien. Chlordiazepoxid (Librium®) wurde 1955 in den Roche-Laboratorien synthetisiert und war der erste Vertreter dieser Klasse. Heute leiten sich die meisten Substanzen von Diazepam bzw. dessen Metaboliten ab. Alle Benzodiazepine enthalten einen 7-gliedrigen, nichtaromatischen Heterozyklus mit zwei Stickstoffatomen, zumeist in Position 1 und 4. Ihre Wirkung ist an den intakten Siebenring gebunden. Bedeutend für die pharmakologische Aktivität ist ferner die Lactam-Struktur (Mutschler 2001). Benzodiazepine werden eingesetzt als Anxiolytika, Hypnotika, Sedativa, Antikonvulsiva und als zentrale Muskelrelaxantien. Die verschiedenen Substanzen unterscheiden sich in der Wirkstärke und der Pharmakokinetik, nicht jedoch im Wirkprofil. Meistens ist es nur eine Frage der Dosierung, welche Wirkung im Vordergrund steht (Mutschler 2001). Benzodiazepine greifen am Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-System an, indem sie an einer spezifischen Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor, der zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen gehört, binden. Verschiedene Peptiduntereinheiten (α , β , γ und δ) bilden einen Kanal für Chloridionen und verfügen neben der Bindungsstelle für GABA, die auf der β -Untereinheit lokalisiert ist, über eine sogenannte modulatorische Bindungsstelle für Benzodiazepine (α -Untereinheit). Die Bindung eines Agonisten an den "Benzodiazepin-Rezeptor" ändert seine Konformation, so dass die Affinität von GABA zu ihrem Rezeptor erhöht wird. Durch die verstärkte GABA-Stimulation nimmt die Offenwahrscheinlichkeit der Chloridkanäle zu. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Hemmung der Aktivität der neuronalen Zellen. Benzodiazepine entfalten somit ihre Wirkung nur im Zusammenspiel mit GABA, indem sie den inhibierenden Effekt des Neurotransmitters verstärken. Dies erklärt auch ihre große therapeutische Breite.

Bei einer länger andauernden Applikation gehören die Toleranzentwicklung sowie ihr Missbrauchs- und Suchtpotential zu den unerwünschten Wirkungen. Nach Robertson und Treasure (1996) werden vier Gruppen von Langzeit-Benzodiazepin-Konsumenten unterschieden: Die erste Gruppe sind Patienten mit Epilepsie oder Muskelspastik. Diese Patienten scheinen keine Abhängigkeit und auch kein Entzugssyndrom nach dem Absetzen zu entwickeln. An zweiter Stelle sind Patienten genannt, die tagsüber

regelmäßig zur Sedierung Benzodiazepine einnehmen. Die größte Gruppe bilden allerdings Patienten, die ebenfalls ohne Dosissteigerung nachts Benzodiazepine als Schlafmittel nehmen. Die vierte Gruppe von Patienten mit regelmäßigem Benzodiazepinkonsum sind diejenigen, die täglich hohe Dosen von Benzodiazepinen konsumieren. Zumeist sind diese Hochdosis-Abhängigen Polytoxikomane mit Opiatgebrauch. Die Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e. V. (DHS) schätzt 2007 die Gesamtzahl der Benzodiazepinabhängigen auf 1,5 Mio. 2004 lag die Schätzung der DHS der insgesamt Medikamentenabhängigen bei 1,3-1,4 Mio. davon ca. 1,0 Mio. Abhängige von Benzodiazepinderivaten und 300.000 von anderen Arzneimitteln (Glaeske 2003). Dementsprechend stehen Missbrauch und Abhängigkeit von Benzodiazepinen mit Abstand an der Spitze des schädlichen Arzneimittelgebrauchs in Deutschland.

1.4.1 Oxazepam

Oxazepam (Adumbran[®], Praxiten[®]) ist ein Hydroxy-Benzodiazepin und zählt zur Gruppe der Benzodiazepine mit mittlerer Wirkungsdauer (Halbwertszeit: 5-12 Stunden). Es stellt aber auch einen wichtigen Metaboliten vieler Benzodiazepine dar, u.a. von Diazepam, aber auch von Medazepam, Temazepam und Prazepam. Eingesetzt wird Oxazepam zur symptomatischen Behandlung von akuten und chronischen Angst-, Spannungs- und Erregungszuständen sowie von Durchschlafstörungen. Die mittlere Tagesdosis beträgt 10-40 mg, wobei der Grundsatz wie bei allen Benzodiazepinen gilt, die Dosis so gering und die Behandlungsdauer so kurz wie möglich zu halten. Oxazepam wird als Racemat verabreicht, wobei das S-Enantiomer eine höhere Affinität zum Benzodiazepin-Rezeptor besitzt als das R-Enantiomer (Mohler et al., 1978). Oxazepam wird nach oraler Gabe langsam, aber nahezu vollständig resorbiert. Harnausscheidungsdaten des Glucuronids lassen auf eine Bioverfügbarkeit von 80-90 % schließen, weshalb der First-Pass-Effekt gering zu sein scheint (Fachinformation: Adumbran[®]). In der Leber wird Oxazepam schnell (40 % in 6 Stunden) zu den Hauptmetaboliten R- und S-Oxazepam-Glucuronid transformiert. Die Ausscheidung erfolgt fast ausschließlich renal (mehr als 80 %). Im Fäzes wurde durchschnittlich weniger als 10 % Gesamt-Oxazepam nachgewiesen.

1.4.2 Temazepam

Temazepam (Planum[®]) ist ebenfalls ein Hydroxy-Benzodiazepin mit mittlerer Wirkungsdauer (7-11 h). Wie Oxazepam ist es ein aktiver Metabolit vieler Benzodiazepine, u.a. auch von Diazepam. Angewendet wird Temazepam hauptsächlich zur Kurzzeitbehandlung von Schlafstörungen in einer Dosis von 10-20 mg. Temazepam wird sehr gut resorbiert (90-100 %) und der First-Pass-Effekt ist sehr gering (5 %) (Fachinformation: Planum[®]). Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich in der Leber, wo der größte Teil des unveränderten Arzneimittels direkt glucuronidiert und mit dem Urin ausgeschieden wird. Ca. 5 % Temazepam werden zu Oxazepam demethyliert und als R- und S-Oxazepam-Glucuronid eliminiert (Locniskar und Greenblatt 1990). Die

Ausscheidung erfolgt hauptsächlich renal in Form der Konjugationsprodukte (80 %) und nur 12 % werden mit dem Fäzes ausgeschieden (Fachinformation: Planum[®]).

1.4.3 Lorazepam

Lorazepam (Tavor[®]) besitzt wie Oxazepam und Temazepam eine Hydroxygruppe an Position 3, hat aber im Vergleich zu diesen eine etwas längere Halbwertszeit von 12-24 h. Das Indikationsgebiet umfasst die symptomatische Behandlung von Angst-, Spannungs- und Erregungszuständen sowie dadurch bedingten Schlafstörungen und entspricht somit dem von Oxazepam. Allerdings sollte aufgrund der längeren Halbwertszeit bei der Anwendung als Schlafmittel eine ausreichende Zeit zwischen Einnahme und beispielsweise aktiver Teilnahme am Straßenverkehr oder dem Bedienen von Maschinen gewährleistet sein. Die mittlere Tagesdosis beträgt in der Regel 0,5-2,5 mg. Die im Vergleich zu Oxazepam und Temazepam geringere Dosis zeigt, dass Lorazepam eine höhere Affinität zur „Benzodiazepin-Bindungsstelle“ am GABA_A-Rezeptor besitzt. Nach oraler Gabe wird Lorazepam rasch und nahezu vollständig resorbiert, und der für die Bioverfügbarkeit ermittelten Wert im Vergleich zur i.v. Gabe lag bei 94 % (Fachinformation: Tavor[®]). Hauptmetabolite des Lorazepams, das praktisch vollständig biotransformiert wird, sind die diastereomeren R- und S-Glucuronide. Versuche mit radioaktiv markiertem Lorazepam zeigten, dass ca. 88 % im Harn und nur 7 % im Fäzes ausgeschieden werden (Fachinformation: Tavor[®]).

1.5 Opiate

Als Opiate bezeichnet man die Alkaloide, die im Opium, dem getrockneten Milchsafte des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), vorkommen, darunter Morphin und Codein. Unter dem Terminus Opioide werden definitionsgemäß alle Stoffe verstanden, die morphinartige Eigenschaften aufweisen und an Opioidrezeptoren wirksam sind, was neben den Opiaten auch körpereigene Opioide (z.B. Endorphine) und halb- bzw. vollsynthetische Stoffe umfasst. Alle Opioidrezeptoren hemmen bei Stimulation, G-Protein-gekoppelt, Adenylatzyklasen und bewirken dadurch eine Öffnung von Kaliumkanälen und/oder eine Schließung von Calciumkanälen. Opiatrezeptoren kommen sowohl im ZNS als auch peripher vor. Es gibt verschiedene Subtypen, die man als μ -, κ - und δ -Rezeptoren bezeichnet (Mignat et al., 1995), und die für die verschiedenen Wirkungen verantwortlich sind. Die zentrale Analgesie, Atemdepression und Abhängigkeit sind auf eine Aktivierung der μ -Rezeptoren zurückzuführen. Weitere zentrale Wirkungen sind Sedierung, Euphorie, Tranquillisierung und Dämpfung des Hustenzentrums. Die wichtigste periphere Nebenwirkung der Opiate ist die spastische Obstipation. Bei der Opiat-Vergiftung tritt infolge einer zentralen Atemlähmung der Tod ein. Nach einer längeren Einnahme von Opiaten kann es zur psychischen und physischen Abhängigkeit sowie zu einer Toleranzentwicklung kommen. Bei kontrollierter, korrekter und kurzer Anwendung unter ärztlicher Aufsicht ist diese Gefahr allerdings relativ gering.

1.5.1 Morphin

Morphin (MST[®]) ist das Hauptalkaloid des Opiums. Es bindet fast ausschließlich an μ -Rezeptoren. Als stark wirksames Analgetikum wird es bei starken und stärksten Schmerzzuständen wie unfallbedingten, intra- und postoperativen Schmerzen sowie Tumorschmerzen angewendet. Oral oder rektal beträgt die mittlere Tagesdosis 60-120 mg, parenteral 10-60 mg. Die Resorption von Morphin aus dem Gastrointestinaltrakt erfolgt relativ langsam, außerdem unterliegt es einem ausgeprägten First-Pass-Effekt. Die Bioverfügbarkeit beträgt nur 20-40 %. Morphin wird hauptsächlich in der Leber, aber auch im Darmepithel metabolisiert. Der Hauptmetabolit ist zu 65 % das unwirksame Morphin-3-Glucuronid (M3G), außerdem entsteht das analgetisch stark wirksame Morphin-6-Glucuronid (M6G) (Aderjan und Skopp 1998). Das Verhältnis von Morphin-3- zu Morphin-6-Glucuronid ist ca. 10:1 (King et al., 2000a). Außerdem entstehen unter anderem Sulfatkonjugate sowie oxidative Stoffwechselprodukte wie Normorphin (4 %), Morphin-N-oxid und ein in 2-Stellung hydroxyliertes Morphin (Hand et al., 1987). Ca. 10 % des Morphins wird unverändert ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal und zu ca. 10 % über die Galle. Die Eliminationshalbwertszeit von Morphin ist individuell sehr unterschiedlich und beträgt zwischen 1,7 und 4,5 Stunden.

1.5.2 Codein

Codein (3-Methylmorphin) kommt wie Morphin im Opium vor. Als Analgetikum ist es sehr viel schwächer wirksam als Morphin und wird nahezu ausschließlich in Kombination mit nicht-opioiden Analgetika eingesetzt wie z.B. mit Paracetamol (Dolomo TN[®]). Aufgrund seiner antitussiven Wirkung wird es auch als Hustenreizdämpfendes Mittel angewendet (Codicaps mono[®]). Ebenso ist es nach der BtMVV (2005) zur Substitutionstherapie bei Opiatabhängigkeit zugelassen. Die Dosierung als Schmerzmittel in Kombination mit Paracetamol und bei Husten liegt üblicherweise bei 30-60 mg als Einzeldosis, die Tagesmaximaldosis beträgt 200 mg. Die letale Dosis beim Erwachsenen liegt bei 0,5-1,0 g. In der Substitutionstherapie dürfen innerhalb von 30 Tagen maximal 40 g verschrieben werden (BtMVV 2005), was einer Tagesdosis von ca. 1,33 g entspricht. Die Toleranzentwicklung bewirkt eine schnelle Gewöhnung an hohe Dosen. Codein wird nach oraler, intramuskulärer oder rektaler Gabe rasch resorbiert. Es wird in der Leber extensiv metabolisiert, wobei es große interindividuelle Unterschiede gibt. Hauptmetabolit ist mit 50 % das Codein-6-Glucuronid (CG), welches zwar schwächer als Codein, aber ebenfalls analgetisch wirksam ist (He et al., 1998; Vree et al., 2000). Weitere Metaboliten sind Morphin und dessen Konjugate (Glucuronide, Sulfate) sowie Norcodein. Wie auch bei Morphin werden ca. 10 % des Codeins unverändert ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgt im wesentlichen renal. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 3-5 Stunden.

2 Motivation und Zielsetzung

2.1 Motivation

Benzodiazepine sind die am häufigsten verordneten Psychopharmaka weltweit. Das sehr häufig verordnete pharmakologisch aktive Diazepam wird im Phase-I-Metabolismus durch Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs) zu den ebenfalls aktiven Metaboliten N-Desmethyldiazepam (Nordiazepam), Temazepam und Oxazepam umgesetzt. Im Phase-II-Metabolismus werden Oxazepam und Temazepam durch enzymatische Kopplung mit aktivierter Glucuronsäure in ihre entsprechenden Glucuronide überführt. Obwohl Glucuronidierungsreaktionen die wichtigsten Kopplungsreaktionen im Phase-II-Metabolismus darstellen, gibt es über die Benzodiazepin-Glucuronide nur wenige in der Literatur beschriebene Studien zur Wirkung und Wechselwirkung mit anderen Substanzen. Dies könnte u.a. auf das Fehlen geeigneter Referenzsubstanzen zurück zu führen sein.

Insbesondere ältere, multimorbide und chronisch kranke Menschen, die sehr häufig auf die gleichzeitige Einnahme einer Vielzahl von Medikamenten angewiesen sind, erhalten u.a. Benzodiazepine. Zudem werden Benzodiazepine auch häufig missbräuchlich von verschiedensten Personengruppen in Kombination mit Alkohol, Opiaten und Opioiden oder anderen Substanzklassen mit Suchtpotential eingenommen. Dies kann den zentral wirksamen Effekt zusätzlich verstärken. Bereits nach wenigen Tagen bis Wochen kann es zur psychischen und physischen Abhängigkeit kommen. Da eine Vielzahl von Arzneistoffen, einschließlich der Benzodiazepine und Opiate, erst nach Glucuronidierung vom Körper ausgeschieden werden können, sind bei Dauermedikationen mit Benzodiazepinen und Opiaten Wechselwirkungsstudien im Phase-II-Metabolismus erforderlich. Bei gemeinsamer Einnahme von Substanzen, die glucuronidiert werden, ist eine Konkurrenz sowohl um die konjugierenden Enzyme, die UDP-Glucuronyltransferasen als auch um den Co-Faktor UDPGA zu erwarten. Dies kann zur Kumulation der Substanzen im Körper und damit zu einer möglichen Wirkungsverlängerung oder verstärkten Nebenwirkungen führen. Eine Wechselwirkung von Substanzen ist um so wahrscheinlicher, wenn sie von derselben Isoform umgesetzt werden. Ähnlich wie bei den CYPs ist es deshalb von großer Bedeutung, das Ausmaß von Substanzinteraktionen im Phase-II-Metabolismus sowie die Beteiligung bestimmter UGT-Isoenzyme an der Glucuronidierung von klinisch und forensisch relevanten Arzneistoffen genauer zu erfassen. Aufgrund der Verordnungs- und der Missbrauchshäufigkeit der Benzodiazepine, insbesondere des Diazepams, soll im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf die Diazepammetabolite Temazepam und Oxazepam im Hinblick auf deren Wechselwirkungen mit den Opiaten Morphin und Codein gelegt werden.

Hinsichtlich der pharmakologischen Aktivität der Glucuronide wird zumeist angenommen, dass sie biologisch inaktiv sind, da der Phase-II-Metabolismus einen

wichtigen Entgiftungsmechanismus des Körpers darstellt. Im Fall des Morphin-6-Glucuronids konnte jedoch gezeigt werden, dass es stärker analgetisch wirksam ist als die Muttersubstanz Morphin. Sollten auch die Glucuronide der Benzodiazepine eine pharmakologisch-toxikologisch relevante Aktivität besitzen, könnte dies zu einer verlängerten Wirkdauer und Nebenwirkungen führen. Aufgrund genetischer Polymorphismen können interindividuelle Unterschiede bezüglich der Konjugation auftreten, die im Einzelfall zu einer sehr viel länger andauernden Wirkung der Benzodiazepine und Opiate führen könnten.

Zulassungsbehörden, wie z.B. die Food and Drug Administration (FDA), USA, fordern im Rahmen von Wirkungs- und Unbedenklichkeitsstudien pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen, sowohl der Muttersubstanz als auch von allen aus dieser Substanz im Körper entstehenden Metaboliten. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte anhand der Modellsubstanz Temazepam und ihrer diastereomeren Glucuronide gezeigt werden, dass mit Hilfe eines auf Neuronen basierenden Biosensors deren Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen werden kann, und somit Aussagen über die Wirksamkeit dieses Arzneistoffes und dessen Metabolite getroffen werden können.

Für alle Wechselwirkungsstudien im Phase-II-Metabolismus der Benzodiazepine und Untersuchungen hinsichtlich der Wirksamkeit ihrer Glucuronide ist der Einsatz von Benzodiazepin-Glucuroniden als Standardsubstanzen für analytische Zwecke notwendig. Trotz der häufigen Verordnung und des hohen Suchtpotentials von Benzodiazepinen wurde bisher kein Syntheseweg zur Darstellung der Benzodiazepin-Glucuronide in der einschlägigen Fachliteratur publiziert. Ein Teilziel dieser Arbeit war, eine geeignete Methode zur Darstellung von Benzodiazepin-Glucuroniden als Referenzsubstanzen zu entwickeln.

Aus ethischen Gründen und Aspekten des Tierschutzes ist es von großer Wichtigkeit, geeignete in vitro-Modelle zu entwickeln. Dies gilt nicht nur für Metabolismus- und Interaktionsstudien, sondern auch für Studien zur pharmakologischen Wirksamkeit von Substanzen. Solche Modelle sollten in der Lage sein, Arzneistoffkandidaten und deren Metabolite in einem frühen Stadium der pharmazeutischen Entwicklung und in großem Umfang auf potenziell induzierbare Eigenschaften zu testen. So können sowohl Vorhersagen zu möglichen Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen als auch zur Wirkung auf neuronaler Ebene getroffen werden. Mit dieser Arbeit kann hierzu ein Beitrag geleistet werden.

2.2 Zielsetzung

- 1) Darstellung der diastereomerenreinen Phase-II-Metabolite, den Benzodiazepin-Glucuroniden, von (R,S)-Oxazepam, (R,S)-Temazepam und (R,S)-Lorazepam.
- 2) Bestimmung der Enzymkinetik und Testung des Interaktionspotentials der Benzodiazepine im Phase-II-Metabolismus. Ein besonderer Fokus lag dabei auf den mit Benzodiazepinen häufig verordneten oder missbräuchlich eingesetzten Opiaten, wie Morphin und Codein.
- 3) Testung von Temazepam und seiner diastereomerenreinen Glucuronide hinsichtlich ihrer pharmakologischen Aktivität am GABA_A-Rezeptor.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Acetanhydrid	Sigma, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acetonitril-d ₃ , 99,96 %	Merck, Darmstadt
Alamethicin	Sigma, Steinheim
BCA Kit (Uptima)	Montiucon Cedex, Frankreich
Lösung A (BCA Entwickler)	
Lösung B (4 % Kupfersulfat)	
Brij 58	Sigma, Steinheim
Bromwasserstoff 33 % in Essigsäure	Merck, Darmstadt
Celite	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform-d ₃ , 99,96 %	Merck, Darmstadt
Codein	Sigma, Steinheim
Codeinphosphat-Hemihydrat	Caesar&Loretz, Hilden
Codein-Glucuronid	Lipomed, Arlesheim, Schweiz
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
D-Glucofuranurono-6,3-lacton	Sigma, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Hexamethyltriethyltetramin	Sigma, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma, Steinheim
Lorazepam	Cambrex Profarmaco, Milano, Italien
Lormetazepam	Cambrex Profarmaco, Milano, Italien
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol-d ₃ , 99,5 %	Merck, Darmstadt
3-Methoxyphenol	ABCR, Karlsruhe
Humane Lebermikrosomen	BD Bioscience, Heidelberg
UGT-Isoformen (UGT Supersomes™)	BD Bioscience, Heidelberg
Molekularsieb 4A	Merck, Darmstadt
Morphinhydrochlorid	Caesar&Loretz, Hilden
Morphin-3-Glucuronid	LCG Promochem, Wesel
Morphin-6-Glucuronid	Lipomed, Arlesheim, Schweiz
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oxazepam	Boehringer Ingelheim, Biberach
Phenacetin	Sigma, Steinheim
Perchlorsäure 70 %	Merck, Darmstadt
Ortho-Phosphorsäure 99 %, kristallin	Merck, Darmstadt
Pivaloylchlorid	Fluka Chemie, Schweiz
Pyridin	Sigma, Steinheim
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 95-98 %	Merck, Darmstadt
Temazepam	Cambrex Profarmaco, Milano, Italien
Tris	Merck, Darmstadt
Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure	Sigma, Steinheim
Wasser-d ₁ , 99,5 %	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

pH-Meter Portamess 651,2	Knick, Berlin
Zentrifugen	
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
J2-HS Centrifuge Rotor JLA-10.500	Beckman Coulter, Fullerton, USA
L7-55 Centrifuge Rotor SW41TI	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Osterode

Waagen

824-32	Kern, Balingen-Frommern
Analysenwaage BP 121 S	Sartorius, Göttingen
UV/VIS Spectrophotometer Model 7800	Jasco, Easton, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
DC-Platten	Alugram SIL G/UV ₂₅₄ , Aluminium, 0,25 mm, Macherey-Nagel, Düren
Heißluftpistole HG 3002 LCD	Steinel, Herzebrock-Clarholz
Ultra-Turrax TP18/10	IKA-Werke, Janke&Kunkel, Staufen
Potter-Elvehjem-Homogenisator	Sartorius, Göttingen
Elektronischer Signaltimer	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml safety cap	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml safety cap	Brand, Wertheim
Lösungsmittelpipetten	
Mikroman M50, M250, M1000	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Spritzen für HPLC 25 µl, 250 µl	Hamilton Co., Reno, Nevada, USA
Vortex-Mischer Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Thermomixer 5436 und comfort	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Membra Pure, Bodenheim
Strata-C Säulen	Phenomenex, Aschaffenburg
HPLC Gefäße	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC	
1090 Liquid Chromatograph Series II	Hewlett Packard, Waldbronn
LKB Bromma Model 2249	Pharmacia, Freiburg
LCMS	
LTQ Orbitrap™ Hybrid Mass Spectrometer	Thermo, Bremen
NMR	
Bruker Spectrometer 500 und 700 MHz	Bruker, Rheinstetten

Rotationsverdampfer VV 2000	Heidolph, Schwalbach
mit Membranpumpe MZ 2C	Vaccubrand, Wertheim
Microelectrode Array (MEA)	Multi Channel Systems, Reutlingen

3.1.3 Lösungen

Kochsalzlösung (Leber):

9 g Natriumchlorid werden in 1000 ml Reinstwasser gelöst.

Homogenisationsmedium (Schweinelebermikrosomen):

1,863 g Kaliumchlorid (0,025 M) und 0,4765 g Magnesiumchlorid (0,005 M) werden in 1000 ml Tris-HCl-Puffer 10 mM, pH 7,2 gelöst. 85,58 g Saccharose (0,25 M) werden unmittelbar vor Versuchsbeginn zugegeben.

Tris-Puffer 10 mM, pH 7,2:

1,211 g Tris werden in ca. 800 ml Reinstwasser gelöst, mit 5 M HCl auf den gewünschten pH eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Tris-Puffer 100 mM, pH 7,4:

12,114 g Tris werden in ca. 800 ml Reinstwasser gelöst, mit 5 M HCl auf den gewünschten pH eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Glycinpuffer 50 mM, pH 9,5:

0,375 g Glycin werden in ca. 800 ml Reinstwasser gelöst, mit 5 M NaOH auf den gewünschten pH eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000,0 ml aufgefüllt,.

Phosphatpuffer 100 mM, pH 6,0:

1,361 g KH_2PO_4 werden in ca. 80 ml Reinstwasser gelöst, mit 5 M KOH auf den gewünschten pH eingestellt und mit Reinstwasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

50 mM Magnesiumchlorid-Lösung:

50,85 mg MgCl_2 werden mit Reinstwasser auf 5,0 ml aufgefüllt.

25 mM Oxazepam-Stammlösung:

35,75 mg Oxazepam werden mit Methanol auf 5,0 ml aufgefüllt.

40 mM Temazepam-Stammlösung:

60,15 mg Temazepam werden mit Methanol auf 5,0 ml aufgefüllt.

100 mM Morphin-Stammlösung:

75,2 mg Morphinhydrochlorid werden mit Tris-Puffer 100 mM, pH 7,4 auf 2,0 ml aufgefüllt.

100 mM Codein-Stammlösung:

81,3 mg Codeinphosphat-Hemihydrat werden mit Tris-Puffer 100 mM, pH 7,4 auf 2,0 ml aufgefüllt.

7 % HClO_4 :

1 ml konzentrierte HClO_4 (70 %) wird mit Reinstwasser auf 10,0 ml verdünnt.

0,3 % H_3PO_4 :

3,0 g H_3PO_4 werden mit Reinstwasser auf 1000,0 ml verdünnt.

10 mM H_3PO_4 , pH 2,7:

0,98 g H_3PO_4 werden in ca. 800 ml Reinstwasser gelöst, mit 5 M NaOH und 5 M H_3PO_4 auf pH 2,7 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

Laufmittel für Benzodiazepin-Glucuronid-Bestimmung und Trennung:

780 ml H_3PO_4 -Lösung (0,3 %) werden mit 160 ml Acetonitril und 60 ml Isopropanol gemischt.

Laufmittel für Morphin-Glucuronid-Bestimmung:

980 ml 10 mM H₃PO₄-Lösung pH 2,7 werden mit 20 ml Acetonitril gemischt.

Laufmittel für Codein-Glucuronid-Bestimmung:

930 ml 10 mM H₃PO₄-Lösung pH 2,7 werden mit 70 ml Acetonitril gemischt.

3.1.4 Humane Lebermikrosomen

Die humanen Lebermikrosomen (HLM) wurden von der Firma BD Bioscience bezogen und waren aus mindestens 20 Spenderlebern gewonnen worden. Der Proteingehalt war 20 mg/ml in 250 mM Saccharoselösung. Die Enzymaktivitäten der einzelnen Isoformen wurden mit Standardsubstanzen von der Firma BD bestimmt und angegeben. Für die Versuchsreihen in dieser Arbeit wurden die Mikrosomen nach Erhalt aliquotiert (400 µg Protein pro 20 µl Suspension) und bei -80 °C bis zu deren Verbrauch gelagert. Für alle Inhibitionsversuche wurde dieselbe Charge (41207) verwendet.

3.1.5 UGT-Isoformen (Supersomes™)

Die derzeit kommerziell verfügbaren humanen UGT-Isoformen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 und UGT2B17 wurden ebenfalls von der Firma BD Bioscience bezogen. Die humanen Isoenzyme wurden durch Expression in Insektenzellen mit dem Bakulovirussystem gewonnen. Bei den UGT-Supersomes handelt es sich um Insektenmikrosomen. Ihr Proteingehalt war 5 mg/ml in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,5. Nach Erhalt wurden sie aliquotiert (100 µg Protein pro 20 µl Suspension) und bis zu deren Verbrauch ebenfalls bei -80 °C gelagert.

3.1.6 Lösungsmittel

Die für die enzymatische Synthese und die Enzymassays verwendeten Chemikalien waren alle von höchster Qualität. Die eingesetzten Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol und Isopropanol besaßen alle HPLC-Reinheitsgrad.

Die für die chemische Synthesen verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor mit geeigneten Verfahren getrocknet:

Methanol: Magnesiumspäne wurden zunächst mit Jod angeätzt, anschließend wurde langsam Methanol zugetropft.

Acetonitril und Toluol: nach Zugabe von CaH₂ wurden die Lösungsmittel über eine Füllkörperkolonne destilliert. Die Synthesen wurden unter Schutzgasatmosphäre (Argon) und Zusatz von Molekularsieb 4A durchgeführt.

3.2 Chemische Synthese

3.2.1 Dünnschichtchromatographie

DC-Platten	Kieselgelfertigplatten Alugram SIL G/UV ₂₅₄ , Aluminium, 0,25 mm (Macherey-Nagel)
Entwicklung	Petrolether/Diethylether (20:80), Diethylether rein (für acylierte Verbindungen)
Detektion	Fluoreszenzlöschung bei 254 nm Zucker-Reagenz 1:1 Mischung aus 0,2 %iger methanolischer 3-Methoxyphenol-Lösung und 2 N methanolischer Schwefelsäure Die DC-Platten wurden in das Reagenz getaucht und anschließend mit einem Heißluftfön erhitzt.

3.2.2 Präparative Säulenchromatographie

Die präparativen säulenchromatographischen Trennungen wurden mit Glassäulen unterschiedlicher Dimension bezüglich Länge und Durchmesser und Kieselgel 60 (Merck), Korngröße 63-200 µm durchgeführt.

3.2.3 Schmelzpunkt

Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach THIELE

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

3.2.4 NMR-Spektroskopie

Bruker Spectrometer 250, 300, 500 und 700 MHz

Die ¹H-NMR-Spektren der Vorstufen sind im Anhang abgebildet. Als Lösungsmittel für die Vorstufen wurde CDCl₃ verwendet.

3.3 Enzymatische Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide

3.3.1 Gewinnung der Mikrosomen

Für die Gewinnung der Schweinelebermikrosomen wurde die Leber von einem frisch geschlachteten Tier aus dem Schlachthof Fleischversorgung Köln verwendet. Die Schweineleber wurde im Schlachthof mit ca. 1000 ml isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und die Waschflüssigkeit verworfen. Die Leber wurde dann in ca. 500 ml

isotonischer Kochsalzlösung auf Eis in das Labor transportiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zunächst wurde die Leber mit einer Schere in kleine Gewebestücke (ca. 3 g) geschnitten. Das zerkleinerte Gewebe wurde dreimal mit Homogenisationsmedium (Herstellung siehe Absatz 3.1.3, im Folgenden kurz Medium genannt) gewaschen und die Waschflüssigkeit dekantiert. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einem Ultra-Turrax zerkleinert und in einen 30 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt und mit Medium auf 25 ml aufgefüllt. Die Homogenisation erfolgte mit einem bei 1000-1200 UpM rotierenden Teflonstempel.

3.3.2 Zentrifugation des Homogenats

Im ersten Zentrifugationsschritt wurde das Homogenat in einem 100 ml Kunststoffzentrifugenbecher bei 500 x g (1900 UpM) 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) über dem locker sitzenden Sediment wurde durch vorsichtiges Dekantieren abgossen. Das Sediment wurde in 5 ml Medium resuspendiert, in einem 15 ml Potter homogenisiert und erneut zentrifugiert (500 x g, 10 Minuten). Der Überstand wurde mit Ü1 vereinigt.

Im zweiten Schritt wurden die vereinigten Überstände 10 min bei 7000 x g (9800 UpM) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion bei 100.000 x g 45 Minuten ultrazentrifugiert. Hierzu wurde ein Beckman-Rotor SW41TI mit Polycarbonatröhrchen verwendet (Drehzahl: 35.000 UpM).

Die nach der Ultrazentrifugation entstandenen Sedimente wurden in 1,5 ml Medium resuspendiert und vereinigt. Die Mikrosomenfraktionen wurden zu je 1 ml in Reagiergefäße aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

3.3.3 Proteinbestimmung der Mikrosomen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Mikrosomenfraktionen erfolgte mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Reagent Kit (Firma Uptima). Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Reaktion nach Biuret. Der resultierende violette Farbstoff wurde bei $\lambda = 562$ nm photometrisch gemessen. Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe von bekannten Rinderserumalbumin-Konzentrationen (Bovine Serum Albumin = BSA) (0,02-2 mg/ml). Dazu wurden zu 100 μ l jeder BSA-Verdünnung 2 ml BCA Reagenz B:A = 1:50 zugesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde gegen einen Reagenzienleerwert bei 562 nm photometrisch gemessen. Die zu bestimmenden Mikrosomenproben wurden 1:5 und 1:10 mit Wasser verdünnt und ebenfalls wie oben beschrieben vermessen. Die Messwerte wurden unter Anwendung der linearen Regression mit der Software Microsoft Excel ausgewertet.

3.3.4 Optimierung der enzymatischen Synthese

Tabelle 3.1 Bestandteile des Enzymassays der enzymkatalytischen Synthese.

Assaybestandteil	Konzentration	Funktion
Schweinelebermikrosomen	36 mg/ml	enthalten u.a. UGT-Enzyme
Brij 58	0,12 mg	Detergenz, erhöht die Membrandurchlässigkeit und macht die Enzyme zugänglicher
MgCl ₂	5 mM	Mg-Ionen erhöhen die Aktivität der Enzyme
UDPGA	5 mM	Co-Substrat
Benzodiazepine (Oxazepam, Temazepam oder Lorazepam)	1 mM in 3 ml Methanol	Substrat
Tris-Puffer pH 7,4	100 mM	Inkubationsmedium

Um eine optimale Ausbeute zu erreichen, wurden einige Parameter optimiert. Besonders schwierig gestaltete sich die Optimierung der Benzodiazepin-Konzentrationen, da die Benzodiazepine in wässrigem Medium eine geringere Löslichkeit besitzen. Als Lösungsmittel wurde daher Methanol verwendet. Die Konzentration von Methanol musste so gewählt werden, dass eine Denaturierung der Enzyme während der Umsetzung auszuschließen war (Kuورانne et al., 2002). Bei einer Konzentration von über 10 % Methanol im Ansatz verringerte sich die Ausbeute erheblich, weshalb eine Konzentration von höchstens 10 % eingesetzt wurde. DMSO erwies sich als Lösungsmittel nicht geeignet, da es bei der anschließenden Trennung der Benzodiazepin-Glucuronide mittels präparativer HPLC störte. Die Syntheseansätze (30 ml) wurden im Trockenschrank bei 37 °C unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers inkubiert.

3.3.5 Isolierung der Benzodiazepin-Glucuronide

Die enzymatische Reaktion jedes 30 ml Syntheseansatzes wurde durch dreimalige Extraktion mit je 30 ml Dichlormethan gestoppt. Dadurch wurde einerseits eine Denaturierung der Mikrosomen erreicht und andererseits nicht umgesetztes Benzodiazepin sowie weitere unpolare Bestandteile (z.B. Lipide) aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die Benzodiazepin-Glucuronide gehen nicht in die Dichlormethan-Phase über. Dies wurde durch Injektion in die HPLC überprüft. Polare Bestandteile des Assays wurden mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) von den Benzodiazepin-Glucuroniden abgetrennt. Dies diente auch der Aufkonzentration der Glucuronide vor der präparativen Trennung mittels HPLC.

Hierfür wurden Strata-C Säulen (Phenomenex) verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit 1,5 ml Methanol und 1,5 ml destilliertem Wasser konditioniert. Nachdem der Reaktionsansatz (ca. 30 ml) auf die Säule gegeben wurde, konnten die stärker polaren Bestandteile anschließend durch zweimaliges Spülen mit 1,5 ml destilliertem Wasser entfernt werden. Die aufgereinigten und aufkonzentrierten Benzodiazepin-Glucuronide wurden mit 1,5 ml Methanol von der Säule eluiert.

3.4 Präparative Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide

Die Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide erfolgte mittels präparativer HPLC/DAD. Die verwendete Anlage setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Pumpe	Binäre Pumpe, LKB Bromma, Model 2249, Amersham Pharmacia, Freiburg
Entgaser	Degasys DG-310, Uniflows, Tokyo, Japan
Detektor	DAD, Pharmacia Model 2249
Injektor	Rheodyne Probenventil
Injektionsschleife	manuell, 250 µl
Stationäre Phase	RP18, ec, 250 x 10 mm, Spherisorb ODS2, Partikelgröße 5 µm, Vorsäule Spherisorb Partikelgröße 5 µm, Trentec, Gerlingen
Mobile Phase	0,3 % H ₃ PO ₄ /Acetonitril/Isopropanol 78:16:6 (V/V/V)
Flussrate	7,5 ml/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20-25 °C)
Detektion	UV, 230 nm
Injektionsvolumen	250 µl

Die einzelnen Fraktionen (0,5-1,0 ml) wurden gesammelt und mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, um eine Hydrolyse der Benzodiazepin-Glucuronide in der mobilen Phase zu verhindern. Zur Gewinnung der Benzodiazepin-Glucuronide aus der Lösung wurden die einzelnen Fraktionen der jeweiligen Diastereomere nach hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Überprüfung der Reinheit vereinigt, und erneut mittels SPE (siehe oben) aufkonzentriert bzw. die wässrige Phase abgetrennt. Das in Methanol vorliegende jeweilige diastereomerenreine Glucuronid wurde anschließend durch Evaporieren der Methanolphase gewonnen und zur vollständigen Entfernung der Lösungsmittelreste im Vakuum getrocknet.

3.5 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide

3.5.1 Massenspektroskopie

Die Untersuchungen wurden mit einem LTQ Orbitrap Hybrid Massenspektrometer (Firma Thermo) an der Sporthochschule Köln (Prof. M. Thevis) durchgeführt. Die sehr hohe Massenauflösung dieses Spektrometers kann die Molekülmasse von Substanzen mit einer Massengenauigkeit von < 3 ppm (parts per million) ermitteln, aufgrund dessen eine Strukturaufklärung durch die Molekülmasse erfolgen kann. Mit der Ionisierungstechnik ESI (Elektrospray-Ionisierung) wurden die Massen im positiven Elektronenmodus gemessen. Bei dieser Technik handelt es sich um ein sehr schonendes Ionisierungsverfahren, weshalb in der Regel keine Fragmente auftreten. Somit ist es möglich, die Moleküle gezielt zur Fragmentierung anzuregen. Dies geschieht in sogenannten Tandem-Massenspektrometern. Man benutzt 2 Stufen der Massanalyse. In der ersten wird eine detektierte Ionensorte aus der Mischung ausgewählt (hier die Molekülmasse der Benzodiazepin-Glucuronide) und in der zweiten Stufe fragmentiert. Die entstandenen, charakteristischen Fragmente ergeben so genannte Fragmentierungsmuster. Dadurch lassen sich Aussagen über den Aufbau der Moleküle treffen. Die Massen der Fragmente lassen sich ebenfalls mit einer Massengenauigkeit von < 3 ppm bestimmen. Diese Experimente werden als MS^n - Experimente bezeichnet, wobei n für die Anzahl der hintereinander geschalteten massenspektrometrischen Datensammlungen steht.

3.5.2 1H -NMR-Spektroskopie

Die 1H -NMR-Spektren der Benzodiazepin-Glucuronide wurden mit einem Bruker Spectrometer 300, 500 und 700 MHz am Max Planck-Institut für Polymerforschung Mainz (Dr. M. Wagner) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus CD_3CN/D_2O bzw. $MeOD/D_2O$ 70:30 verwendet. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. TMS (Trimethylsilan) diente dabei als interner Standard für alle Messungen. Die Signale sind durch folgende Abkürzungen charakterisiert: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, m = Multipllett.

Die Kernresonanzspektroskopie ist eine spektroskopische Methode, die auf der magnetischen Wechselwirkung von Atomkernen miteinander, mit der Elektronenhülle des Moleküls und mit äußeren Magnetfeldern beruht. Das NMR liefert einen eindeutigen „Fingerabdruck“ eines beliebigen Moleküls. Durch die Verwendung von zwei unabhängigen Messmethoden wie NMR und LC/MS kann eine eindeutige Strukturaufklärung einer unbekanntes Substanz erreicht werden.

Auswertung von 1H -NMR Spektren

Für die Auswertung von 1H -NMR Spektren sind drei Parameter von entscheidender Bedeutung:

Signalintensitäten

In der ¹H-NMR-Spektroskopie wird die Fläche unter der Signalkurve als Intensität eines Resonanzsignals bezeichnet. Der Vergleich der Flächen in einem Spektrum ergibt das Protonenverhältnis im Molekül.

Die chemische Verschiebung (δ)

Die Ursache für die chemische Verschiebung liegt in der magnetischen Abschirmung der Kerne durch ihre Umgebung, vor allem durch Elektronen. Die Resonanzfrequenzen sind feldabhängig, daher definiert man eine dimensionslose Größe, den δ -Wert. Er gibt die Lage des Signals bezüglich einer Referenzsubstanz (meist TMS) und auf die Messfrequenz bezogen an. δ -Werte sind daher unabhängig vom verwendeten Gerät und lassen sich direkt vergleichen.

Kopplungskonstanten (J)

Die Spin-Spin-Kopplungskonstante J ist ein Maß für die Wechselwirkung der Kerndipole und führt zu einer Feinstruktur der Resonanzfrequenzen. Die Kopplung erfolgt durch chemische Bindungen. Aufspaltungsmuster und Intensitätsverteilung sind mit einfachen Regeln voraussagbar. Hat ein Proton kein Proton in direkter Nachbarschaft so tritt das Resonanzsignal als Singulett (s) auf. Ist am benachbarten Atom ein Proton in Nachbarschaft, so tritt ein Dublett (d), bei zwei Protonen in Nachbarschaft ein Triplett (t) auf. Ist die chemische Umgebung von Protonen sehr ähnlich, kann es sein, dass es zu Überlagerungen und somit zu Multipletts (m) kommt. Kopplungskonstanten sind unabhängig vom äußeren Feld, weshalb J in Hz (Hertz) angegeben wird.

3.6 Analytik der Enzymassays und Wechselwirkungsstudien

3.6.1 HPLC

Die quantitative Bestimmung der Glucuronide aus allen Versuchen erfolgte mittels HPLC/DAD. Der experimentelle Aufbau besteht aus folgenden Komponenten:

Pumpe	Binäre Pumpe, 1090 Liquid Chromatograph Series II Hewlett Packard, Waldbronn
Entgaser	Degasys DG-310, Uniflows, Tokyo, Japan
Detektor	1090AX DAD, Hewlett Packard, Waldbronn
Automatischer Probengeber	Hewlett Packard, Waldbronn
Injektionsschleife	Injektionsvolumen max. 25 μ l
Stationäre Phase	RP18, ec, 250 x 4 mm, Spherisorb ODS2, Partikelgröße 5 μ m, Vorsäule Spherisorb

	ODS2, Partikelgröße 5 µm, Trentec, Gerlingen
Mobile Phase	Bestimmung der Benzodiazepin-Glucuronide 0,3 % H ₃ PO ₄ /Acetonitril/Isopropanol 78:16:6 (V/V/V) Bestimmung der Morphin-Glucuronide 10 mM H ₃ PO ₄ pH 2,7/Acetonitril 98:2 (V/V) Bestimmung von Codein-Glucuronid 10 mM H ₃ PO ₄ pH 2,7/Acetonitril 93:7 (V/V)
Flussrate	1,7 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Detektion	Detektionswellenlänge: Benzodiazepin-Glucuronide: 230 nm Opiat-Glucuronide: 210 nm
Injektionsvolumen	20 µl

3.6.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung für die Benzodiazepin-Glucuronide erfolgte unter Berücksichtigung ihrer Molmassen mit zertifizierten Standardlösungen der Benzodiazepin-Muttersubstanzen (Promochem), da von den Glucuroniden keine zertifizierten Standardlösungen verfügbar sind. Die in dieser Arbeit synthetisierten Benzodiazepin-Glucuronide waren nicht als Kalibratoren geeignet, da keine für analytische Zwecke geeigneten Lösungen mit exakt definiertem Gehalt hergestellt werden konnten. Die Glucuronide wiesen eine zu "klebrige" Konsistenz auf. Zur qualitativen Analyse, d.h. zur Identifizierung und eindeutigen Zuordnung der Substanzpeaks, konnten die synthetisierten Glucuronide genutzt werden. Die Benzodiazepin-Glucuronide unterscheiden sich in ihren Absorptionseigenschaften nicht von den Benzodiazepinen. Sie unterscheiden sich allerdings deutlich von ihren Muttersubstanzen in Bezug auf die Retentionszeiten. Durch die unterschiedliche Lipophilie haben die Benzodiazepine in den gewählten Chromatographiebedingungen eine 10-15 Minuten höhere Retentionszeit als die zugehörigen Glucuronide. Die Bestimmung quantitativer Werte hängt auch von der Peakgeometrie ab: Je schmaler die Peakform desto genauer lassen sich die Flächen bestimmen. Bei höheren Retentionszeiten verbreitern sich die Peaks immer weiter. Deshalb waren von den Glucuroniden geringere Mengen nachweisbar als von den

Benzodiazepinen. Die Bestimmungsgrenze lag also niedriger als für die Benzodiazepine.

Zur quantitativen Bestimmung wurden Kalibrationsgeraden der einzelnen Benzodiazepine unter Verwendung folgender Stammlösungen erstellt:

Oxazepam	3,50 mM	(entspricht 1,0 mg/ml)
Temazepam	3,33 mM	(entspricht 1,0 mg/ml)

Die Erstellung der Kalibrationsgeraden für die quantitative Bestimmung der Opiat-Glucuronide erfolgte mit kalibrierten Standardlösungen, die in folgenden Konzentrationen zur Verfügung standen:

Morphin-3-Glucuronid	2,17 mM	(entspricht 1,0 mg/ml)
Morphin-6-Glucuronid	0,217 mM	(entspricht 1,0 mg/10ml)
Codein-Glucuronid	0,210 mM	(entspricht 1,0 mg/10ml)

Durch entsprechende Verdünnung wurden die jeweiligen Kalibratoren erhalten. Die Kalibrierungen wurden in folgenden Bereichen durchgeführt:

Oxazepam	10-300 pmol
Temazepam	20-500 pmol
Morphin-3-Glucuronid	271-3390 pmol
Morphin-6-Glucuronid	81-1355 pmol
Codein-Glucuronid	262-2626 pmol

Von jeder Verdünnungsstufe wurden drei identische Lösungen angefertigt. Diese enthielten neben dem jeweiligen Glucuronid oder dem Benzodiazepin in der entsprechenden Verdünnung auch alle restlichen Substanzen der Inkubationslösungen (Tabelle 3.4), mit Ausnahme der Mikrosomen. Für je eine Konzentration wurden Mikrosomen zugesetzt, um zu zeigen, dass kein Unterschied zu den Kalibrationsassays ohne Mikrosomen besteht. Für die Kalibration der Benzodiazepine wurde wie bei den Enzymassays der interne Standard Phenacetin (1 µg/10 µl) nach Zugabe des Stopp-Reagenz (Abschnitt 3.7.1, S.42) zugesetzt und mit in die Berechnung einbezogen. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl, wie bei den Inkubationslösungen.

Die gemessenen Peakflächen (bei den Benzodiazepinen Benzodiazepin/interner Standard) wurden gegen die injizierte Menge Glucuronid bzw. Benzodiazepin aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Anhand der erstellten Kalibrationsgeraden mit einem Korrelationskoeffizienten r wurden die Konzentrationen der gebildeten Glucuronide in allen Enzymassays bestimmt.

3.6.3 Validierung

Im Rahmen der Validierung wurden für Oxazepam-, Temazepam-, Morphin-3-, Morphin-6- und Codein-Glucuronid Untersuchungen zur Selektivität, Stabilität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision durchgeführt, ebenso erfolgten Maßnahmen zur Qualitätssicherung. Zugrunde gelegt wurden die SOP-Richtlinien von CESAR (2003). Da keine zertifizierten Standardlösungen der Benzodiazepin-Glucuronide zur Verfügung stehen, konnten die Untersuchungen zur Wiederfindung und Richtigkeit nur für die Opiat-Glucuronide durchgeführt werden.

Selektivität/Spezifität

Selektivität ist die Fähigkeit der Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen. Zur Überprüfung der Selektivität wurden verschiedene Lösungen hergestellt, wobei für alle Assaybestandteile dieselben Konzentrationen wie in Tabelle 3.5 (S.44) eingesetzt wurden. Für die Benzodiazepine wurde eine Konzentration von 100 μM , für die Opiate eine Konzentration von 2,5 mM gewählt. In L1, L2, L3, L4 und L5 (Tabelle 3.2, S.38) waren jeweils Oxazepam-, Temazepam-, Morphin-3-, Morphin-6- und Codein-Glucuronid und alle restlichen Substanzen des Assays (Tabelle 3.5, S.44) wodurch überprüft werden sollte, ob die restlichen Substanzen die Detektion der Glucuronide stören. Die Glucuronide der Benzodiazepine wurden neben den Glucuroniden der Opiate bestimmt, d.h. aus einer Inkubationslösung, aber mit unterschiedlichen Laufmitteln. Deshalb wurden weitere vier Lösungen (L6-L9) (Tabelle 3.5, S.44) hergestellt: erstens mit den Oxazepam-Glucuroniden oder Temazepam-Glucuroniden und Morphin-3- und 6-Glucuronid, und zweitens mit den Oxazepam-Glucuroniden oder Temazepam-Glucuroniden und Codein-Glucuronid.

Tabelle 3.2 Überprüfung der Selektivität zur störungsfreien Detektion der Glucuronide. L = Lösung, OG = Oxazepam-Glucuronid, TG = Temazepam-Glucuronid, M3G = Morphin-3-Glucuronid, M6G = Morphin-6-Glucuronid, CG = Codein-Glucuronid.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
R- und S-OG	X					X		X	
R- und S-TG		X					X		X
M3G			X			X	X		
M6G				X		X	X		
CG					X			X	X

Zusätzlich musste bestätigt werden, dass die Glucuronide nur auf enzymatischem Wege entstehen konnten (Tabelle 3.3). Dazu wurde jeweils ein Gemisch aus Oxazepam, Temazepam, Morphin, Codein und allen restlichen Substanzen hergestellt, allerdings ohne Mikrosomen (L10, L11, L12 und L13). Eine weitere Lösung mit Mikrosomen enthielt alle Substanzen bis auf die Substrate (L14). Ebenso erfolgten Ansätze ohne das Co-Substrat UDPGA mit Oxazepam, Temazepam, Morphin, Codein und Mikrosomen (L15, L16, L17 und L18). Die Lösungen L10 - L18 wurden 4 Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert, anschließend 50 µl Methanol als Stopp-Reagenz zugegeben und nach 5minütigem Eisbad 3 Minuten bei 2235 g zentrifugiert. Anschließend wurden alle Lösungen an der HPLC vermessen. Die Konzentrationen der übrigen Assaybestandteile sind in Tabelle 3.5 (S.44) angegeben.

Tabelle 3.3 Überprüfung der Selektivität zur Bildung der Glucuronide auf enzymatischem Weg.

	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18
Oxazepam	X					X			
Temazepam		X					X		
Morphin			X					X	
Codein				X					X
MgCl ₂	X	X	X	X	X	X	X	X	X
UDPGA	X	X	X	X	X				
Alamethicin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
HLM					X	X	X	X	X

Stabilität

Eine wichtige Voraussetzung für die fehlerfreie Bestimmung der Konzentration der Glucuronide ist ihre ausreichende Stabilität über den gesamten Messzeitraum. Es musste ausgeschlossen werden, dass sich die Glucuronide bis zu ihrer Bestimmung zersetzen. Die Stabilität errechnete sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Stabilität [\%]} = \frac{\text{Peakfläche Glucuronid zum Zeitpunkt } x}{\text{Peakfläche Glucuronid zum Zeitpunkt } 0} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Zur Bestimmung der Stabilität wurden vier Inkubationslösungen in Triplika mit jeweils Oxazepam, Temazepam, Morphin oder Codein und allen restlichen Substanzen des Assays mit Mikrosomen hergestellt und 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle wurden sofort, also zum Zeitpunkt $t = 0$ gemessen. Die Inkubationslösungen mit den Benzodiazepin-Glucuroniden wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen zum Zeitpunkt $t = 2$ h, $t = 24$ h, $t = 48$ h und $t = 120$ h vermessen. Da die Benzodiazepin-Glucuronide immer nach den Opiat-Glucuroniden mit einem anderen Laufmittel bestimmt wurden, mussten sie über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen stabil bleiben. Die Benzodiazepin-Glucuronide und Opiat-Glucuronide unterscheiden sich stark in ihrer Lipophilie. Nebeneinander könnten sie nur mithilfe eines Gradienten bestimmt werden. Dies stellt einen höheren Zeit- und Kostenaufwand dar, als sie mit unterschiedlichen isokratischen Laufmitteln zu quantifizieren. Da mit einem nicht temperierbaren Probengeber gearbeitet wurde, musste ebenfalls gewährleistet sein, dass die Glucuronide bei Raumtemperatur stabil sind. Die Opiat-Glucuronide wurden immer innerhalb von 24 Stunden vermessen und deshalb wurde ihre Stabilität nur über 24 Stunden belegt, zum Zeitpunkt $t = 2$ h, $t = 12$ h und $t = 24$ h. Die Konzentration aller Lösungen durfte max. 10 % abweichen.

Wiederfindung

Die Wiederfindung ist die Ausbeute des Analyten nach allen Aufarbeitungsschritten im Vergleich zu einer nicht aufgearbeiteten Lösung. Idealerweise liegt sie bei 100 %. Die Glucuronide wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt aus der Inkubationslösung bestimmt. Deshalb dienten Pufferstammlösungen mit bekannten Konzentrationen als Vergleichslösungen zu den Inkubationslösungen, die alle Substanzen des Assays, allerdings keine Mikrosomen, enthielten. Die Wiederfindung wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Peakfläche Inkubationslösung}}{\text{Peakfläche Stammlösung}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte für alle Glucuronide bei jeweils zwei Konzentrationen durch Dreifachbestimmung.

Genauigkeit

Genauigkeit ist der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision, und beschreibt die Abweichung der einzelnen Messwerte vom wahren Wert, hervorgerufen durch systematische und durch zufällige Fehler.

Richtigkeit

Die Richtigkeit erlaubt eine Aussage über den systematischen Fehler einer Methode. Sie ist damit das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und einem als richtig angesehenen Wert. Da wahre Werte prinzipiell unbekannt sind, bezieht man sich auf einen definitionsgemäß richtigen Wert (zertifiziertes Referenzmaterial = reale Matrix mit definiertem Gehalt an Analyt). Zur Bestimmung wird die relative Abweichung (Relative Error, RE) zwischen der über die Kalibrierfunktion berechneten ($\text{Gluc}_{\text{calc}}$) und der nominalen (durch zertifiziertes Referenzmaterial (Gluc_{nom})) Glucuronidmenge ermittelt. Die relative Abweichung zwischen dem berechneten und dem nominalen Wert sollte nicht mehr als $\pm 15\%$ sein. Zur Berechnung der relativen Abweichung diene folgende Gleichung:

$$RE [\%] = \frac{\text{Gluc}_{\text{calc}} - \text{Gluc}_{\text{nom}}}{\text{Gluc}_{\text{nom}}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Zur Bestimmung wurden nur Analyt-Lösungen der Opiat-Glucuronide in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die Differenz zwischen gemessenen und nominalen Werten verglichen. Für die Benzodiazepin-Glucuronide war diese Bestimmung nicht möglich, da kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung stand.

Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen bei wiederholten Messungen während eines Tages (Intraday) und über mehrere Tage (Interday). Als Maß dient die relative Standardabweichung (RSD). Diese wurde ermittelt und sollte maximal 15 % betragen.

Die Bestimmung der Präzision erfolgte mit Inkubationslösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Diese wurden an einem Tag mehrfach gemessen (Intraday). Lösungen mit derselben Zusammensetzung wurden an anderen Tagen hergestellt und ebenfalls vermessen (Interday).

Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung ermöglicht es, gute, auswertbare Ergebnisse zu erhalten und Fehler insbesondere im Detektionssystem zu verhindern. Dazu wurden verschiedene Maßnahmen durchgeführt. Zwischen dem Vermessen jeder Probe wurde immer Tris-

Puffer eingespritzt, um mögliche Verunreinigungen bzw. Überlagerungen durch Reste der vorherigen Probe, die eventuell auf der Säule sein könnten, zu verhindern.

Ebenfalls musste sichergestellt werden, dass das Messsystem jeden Tag gleich eingestellt war und dieselben Werte lieferte. Dazu wurde die an einem Messtag als erstes vermessene Probe am darauffolgenden Tag erneut injiziert. Die Peakfläche durfte um maximal 5 % abweichen. So konnte sichergestellt werden, dass alle Proben auf dieselbe Weise gemessen wurden.

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze

Nachweisgrenze, "limit of detection", LOD

Die Nachweisgrenze beschreibt die kleinste nachweisbare Menge/Konzentration. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf mindestens 3:1 festgelegt.

Bestimmungsgrenze, "limit of quantification", LOQ

Die Bestimmungsgrenze beschreibt die kleinste quantifizierbare Menge. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf mindestens 9:1 festgelegt.

3.7 Entwicklung der Enzymassays mit humanen Lebermikrosomen

Tabelle 3.4 Zusammensetzung des Enzymassays zur Glucuronidierung der Benzodiazepine.

Assaybestandteil	Konzentration	Funktion
HLM	100 µg/100 µl	enthalten u.a. UGT-Enzyme
Alamethicin	50 µg/mg Protein	porenformendes Antibiotikum
MgCl ₂	5 mM	Mg-Ionen erhöhen die Aktivität der Enzyme
UDPGA	8 mM	Co-Substrat
Benzodiazepin (Temazepam, Oxazepam oder Lorazepam)	10-1000 µM	Substrat
Tris-Puffer pH 7,4	100 mM	Inkubationsmedium

Die Bestimmung jedes Wertes in den Reaktionsansätzen zur Optimierung der Versuchsbedingungen erfolgte durch drei Parallelansätze gleicher Zusammensetzung. Die Assays wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße in einem Thermomixer durchgeführt. Sie hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 100 µl. Es wurde ein Gemisch aus allen Assaybestandteilen außer den Mikrosomen hergestellt, wobei UDPGA zuletzt zugegeben wurde. Dieser Mix wurde für 3 Minuten im Thermomixer bei 37 °C vorinkubiert. Die Mikrosomen, die bei -80 °C gelagert waren, wurden 3 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und zum Reaktionsansatz gegeben. Dieser wurde für vier Stunden im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Nach dem Stoppen der enzymatischen

Reaktion durch Zugabe von 50 µl Acetonitril wurden 10 µl des internen Standards (1 µg/10 µl Phenacetin) zugesetzt. Dann wurden die Proben 1 Minute im Vortex geschüttelt, 5 Minuten auf Eis gestellt und 3 Minuten bei 2235 g zentrifugiert. 20 µl des resultierenden Überstands wurden in die HPLC injiziert.

3.7.1 Stopp-Reaktion

Nach erfolgter Glucuronidierung musste die Enzymreaktion gestoppt werden. Dazu wurden verschiedene Methoden mit Oxazepam oder Temazepam als Substrat ausprobiert:

- 1) Zugabe von 0,7 % HClO₄
- 2) Zugabe von 0,1 N HCl
- 3) Zugabe von 50 µl Methanol
- 4) Zugabe von 50 µl Acetonitril

Es wurden insgesamt 12 Inkubationsansätze mit einer Substratkonzentration von 100 µM Oxazepam oder Temazepam hergestellt, drei für jede Stopp-Methode. Die Assays hatten dieselbe Zusammensetzung wie in Tabelle 3.4 (S.41) beschrieben. Die Proben wurden 30 Minuten im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das jeweilige Stopp-Reagenz zugesetzt, 1 Minute im Vortex geschüttelt, 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 3 Minuten bei 2235 g zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden über HPLC vermessen (1. Messung), die restliche Probe erneut für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei der zweiten Messung durfte nicht mehr Oxazepam-Glucuronid detektierbar sein als bei der ersten Messung.

Die Stopp-Methoden mit 0,1 N HCl, 50 µl Methanol und 50 µl Acetonitril wurden in gleicher Weise auch für die Inhibitionsversuche mit Morphin oder Codein getestet. Dafür wurde eine Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Assays hatten dieselbe Zusammensetzung wie in Tabelle 3.5 (S.44) beschrieben.

3.7.2 Inkubationszeit

In dieser Versuchsreihe sollte ermittelt werden, wie lange die Proben am besten inkubiert werden, um einen möglichst hohen Umsatz zu Benzodiazepin-Glucuroniden ohne wesentliche Denaturierung der Enzyme zu erhalten. Dazu wurden die Proben, die entweder 100 µM Oxazepam oder 100 µM Temazepam enthielten, unterschiedlich lange inkubiert. Folgende Zeiten wurde getestet:

0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 und 6 Stunden

Zur Bestimmung des Null-Wertes wurde direkt nach Zugabe der Mikrosomen die Reaktion mit Acetonitril gestoppt.

3.7.3 pH-Optimum

Zur Ermittlung des pH-Optimums der UDP-Glucuronyltransferasen wurden ebenfalls Proben mit entweder 100 μM Oxazepam oder 100 μM Temazepam mit Puffern unterschiedlichen pH-Wertes für 4 Stunden inkubiert. Dazu wurden drei verschiedene Puffer hergestellt. Diese wurden dann mit 1 N HCl oder 1 N H_3PO_4 und 1 N NaOH oder 1 N KOH mit Hilfe der Glaselektrode auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Im schwach sauren Bereich wurde mit einem Phosphat-Puffer gearbeitet. Für den leicht alkalischen Bereich wurde Tris-Puffer eingesetzt und im stark alkalischen Glycin-Puffer. Das pH-Spektrum von pH 6,0 bis pH 11,0 konnte mit folgenden Puffern erreicht werden:

Kaliumphosphat-Puffer 100 mM	pH 6,0; 6,5; 7,0
Tris-Puffer 100 mM	pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0
Glycin-Puffer 50 mM	pH 10,0; 11,0

3.7.4 Temperatur-Optimum

Bei dieser Versuchsreihe wurden Inkubationen mit 100 μM Oxazepam oder 100 μM Temazepam bei den folgenden Temperaturen mit 100 mM Tris-Puffer, pH 7,4 durchgeführt.

Inkubation unter Eiskühlung:	0 °C
Inkubation im Kühlschrank:	8 °C
Inkubation bei Raumtemperatur im Thermomixer:	24 °C
Inkubation im Thermomixer:	30 °C, 40 °C; 50 °C; 60 °C

3.7.5 UDPGA-Konzentration

In dieser Versuchsreihe sollte ermittelt werden, welche UDPGA-Konzentration einen möglichst hohen Umsatz an Benzodiazepin-Glucuroniden bildet. Ferner sollte geklärt werden, ob UDPGA in höheren Konzentrationen hemmend auf die Enzyme wirkt, d.h. eine Co-Substrathemmung vorliegt. Dazu wurden folgende UDPGA-Konzentrationen eingesetzt:

0; 1; 2; 4; 8 und 16 mM

3.7.6 Benzodiazepin-Konzentration

Mit diesen Versuchen wurden die enzymkinetischen Daten (K_m und V_{max}) für die R- und S-Enantiomere der Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam ermittelt. Dazu wurden die Substrate in steigender Konzentration zugesetzt. Wie bei UDPGA sollte geklärt werden, ob hohe Konzentrationen zu einer Substrathemmung an den Enzymen führen

kann. (R,S)-Oxazepam und (R,S)-Temazepam wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

0; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 und 1000 μM

3.8 UGT-Isoformen

Die Versuche mit den UGT-Isoformen erfolgten entsprechend der Glucuronidierung mit den HLM. Die Zusammensetzung und Konzentration der Assays entsprach der Tabelle 3.4. Zunächst sollte das Screening mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen zeigen, welche Isoformen an der Umsetzung von R- und S-Tamazepam beteiligt sind. Dazu wurde Temazepam in den Konzentrationen 100 und 1000 μM ($n = 4$) mit allen 12 kommerziell verfügbaren Isoformen inkubiert, und aus den gebildeten Mengen an diastereomeren Glucuroniden die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten berechnet. Die verfügbaren Isoformen sind: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 und UGT2B17. In einem zweiten Versuch wurden dann die K_m - und V_{\max} -Werte der umsetzenden Isoformen bestimmt. Dazu wurde Temazepam in 5 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt ($n = 3$). Die Temazepam-Konzentrationen waren:

50, 100, 250, 500 und 1000 μM .

Die Proteinkonzentration der UGT-Isoformpräparationen betrug wie bei den Versuchen mit den HLM ebenfalls 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.

3.9 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten

Tabelle 3.5 Inhibitionsassay für Oxazepam oder Temazepam und Morphin oder Codein.

Bestandteil	Konzentration
HLM	100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$
Alamethicin	50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein
MgCl_2	5 mM
UDPGA	8 mM
Oxazepam oder Temazepam	25; 50; 100; 250 μM
	50; 100; 250; 500 μM
Opiat (Morphin oder Codein)	2,5; 5; 10 mM
Tris-Puffer pH 7,4	100 mM

Die Inhibitionsversuche mit den Opiaten Morphin und Codein wurden wie im Abschnitt 3.7 (S.41) beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung jedes Wertes in allen Assays mit Oxazepam oder Temazepam und Morphin oder Codein erfolgte in Triplika. Dadurch

war eine ausreichende Absicherung der ermittelten Daten aus den Enzymassays gegeben. Die Zusammensetzung der Inkubationsassays ist in der Tabelle 3.5 aufgelistet. Die Konzentrationen für die Substrate und Inhibitoren wurden so gewählt, dass sie um ihre K_m -Werte lagen. Als Stopp-Reagenz wurde 50 μ l Methanol verwendet. Danach wurden direkt die Opiat-Glucuronide an der HPLC bestimmt (Chromatogramme s. Abbildung 10.93 und Abbildung 10.94, S.190). In einem separaten Lauf wurden dann die diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide bestimmt (Chromatogramme s. Abbildung 10.91 und Abbildung 10.92, S.189 und S.190). Durch Messung der Benzodiazepin-Glucuronide konnte der Einfluss der Inhibitoren Morphin und Codein auf ihre Glucuronidierung bestimmt werden. Dadurch, dass aber auch die Opiat-Glucuronide erfasst wurden, konnte ebenfalls der Einfluss der Benzodiazepine auf die Opiat-Glucuronidierung bestimmt werden. Somit fungierten die Benzodiazepine und Opiate einerseits als Substrate und andererseits als Inhibitoren in den Inkubationslösungen.

3.10 Enzymkinetische Auswertung

Die enzymkinetische Auswertung aller Versuche erfolgte mit dem Programm Enzyme Kinetics Module 1.1/Sigma Plot 2001 von SPSS Science. Mit diesem Programm konnten die erforderlichen enzymkinetischen Parameter berechnet und gleichzeitig statistisch ausgewertet werden. Auch die graphische Darstellung aller Ergebnisse wurde mit diesem Programm vorgenommen.

3.10.1 Parameter

Zur Interpretation der Daten und Diagramme sind verschiedene Parameter notwendig, die im Folgenden kurz erklärt werden sollen.

Abweichung (Residuen, Residuals)

Unter Residuum versteht man die Differenz zwischen geschätztem Wert (Wert, den das Modell liefert) und empirischen Wert. Sie werden durch Subtrahieren der Modellschätzungen von den eigentlichen Daten berechnet. Die Abweichung gibt bei vorgegebenem X und ermitteltem Y den vertikalen Abstand eines Messwertes von der gezogenen Regressionslinie an.

Summe der Abweichungsquadrate (Sum of Squares of Residuals)

Die Summe der Abweichungsquadrate (SS) entsteht aus der Summe der Quadrate von allen Abweichungen der Messungen. Sie erlaubt Aussagen über die Güte der Anpassung. Kurven mit kleineren Werten passen besser zu den Daten als Kurven mit großen Werten. SS wird wie folgt berechnet:

$$SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Standardabweichung der Abweichung ($S_{y,x}$, *Residual Standard Deviation*)

Die Standardabweichung von allen Abweichungen aller Datenpunkte ist ein weiterer statistischer Parameter zur Einschätzung der Präzision der Daten. Je kleiner $S_{y,x}$ ist, desto besser sind die Daten. Die Gleichung lautet wie folgt:

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{SS}{n-p}} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

n Anzahl der Messungen

p Anzahl der statistischen Parameter

3.10.2 Kurvenanpassung

Das Enzymkinetik-Modul bietet detaillierte Reports, um verschiedene Hemmungsmodelle zu vergleichen. Dies schließt eine vollständige statistische Analyse für jedes einzelne Modell ein. Es werden verschiedene Kriterien für die Güte der Anpassung wie z.B. Akaike's AIC berechnet, um damit das "beste" Modell zu bestimmen. Die statistischen Resultate enthalten auch Konfidenzintervalle für die Parameter, einen Residuen Verlaufstest und die Erkennung von Ausreißern. Der Datenreport enthält Durchschnittsgeschwindigkeiten für jede Wiederholung der Geschwindigkeit und deren Standardfehler, die vorhergesagten Werte sowie die Residuen von der angepassten Kurve und schließlich Hinweise auf Ausreißer. Die gewählten Modelle können automatisch in eine Rangfolge nach der Güte der Anpassung gebracht werden.

Die Anpassung der Kurven erfolgte durch nichtlineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate. Die Ausgleichsgerade wurde so bestimmt, dass die Summe der Abstandsquadrate von den Datenpunkten den kleinstmöglichen Wert annehmen. Diese Minimierung der Summe der Abstandsquadrate bezeichnet man als "Least Squares"-Verfahren. Um eine gute Anpassung der Werte an ein Modell zu haben, sollte der Determinationskoeffizient r^2 laut SPSS Handbook Enzyme Kinetics (2001) größer als 0,85 sein.

3.10.3 Vergleich verschiedener Modelle

Das Enzymkinetik-Modul erstellte mehrere Modelle, die aus den Daten erhalten werden konnten. Für jedes Hemmungsmodell wurde sowohl ein detaillierter Report mit den enzymkinetischen Parametern (K_m , V_{max} und K_i) als auch die graphischen Darstellungen (Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm) erstellt. Anschließend wurde geprüft, welches Inhibitionsmodell überhaupt in Frage kommt. Dazu dient der Residuals Runs Test. Welches das am besten passende Inhibitionsmodell ist, wurde mit Hilfe des

Akaike Information Criterion (AIC_c) geklärt. Beide Parameter sollen deshalb erläutert werden.

Residuals Runs Test (Residuen Verlaufstest)

Der Residuen Verlaufstest gibt Auskunft darüber, ob eine Regressionskurve zu den gemessenen Daten passt oder systematisch von diesen abweicht. Die Residuen der Messwerte liegen entweder über oder unter der Regressionskurve und haben somit ein positives oder negatives Vorzeichen. Bei einer guten Modellanpassung kommen positive und negative Residuen gleichermaßen vor und es darf kein Trend erkennbar sein. Als run (Durchlauf) wird eine Folge von Messwerten bezeichnet, bei der ihre Residuen alle positiv oder negativ sind. Ein neuer Durchlauf beginnt mit einem Vorzeichenwechsel. Sind alle Datenpunkte zufällig um die Regressionskurve verteilt, erwartet man bei einer Anzahl von n Messpunkten mindestens $n/2+1$ Durchläufe (Motulsky und Christopoulos 2003). Das gewählte Modell passt nicht zu den Daten, wenn die tatsächliche Anzahl der Durchläufe kleiner ist als die erwartete. Die Prüfgröße des Residuen Verlaufstests ist der p-Wert. Er wird zu jedem Modell angegeben. Wenn es mehr Durchläufe gibt als zu erwarten sind, ist der p-Wert größer 0,05. Der Test ist bestanden. Das Modell sollte verworfen werden, wenn der p-Wert $< 0,05$ ist, da die Daten systematisch von der Regressionskurve abweichen.

Akaike Information Criterion (AIC)

Das Akaike Information Criterion ist ein Kriterium zur Auswahl eines Modells aus einer Modellklasse. Dabei gehen die Anpassungsgüte des geschätzten Modells an die vorliegenden empirischen Daten (Stichprobe) und Komplexität des Modells, gemessen an der Anzahl der Parameter, in die Beurteilung ein. Die Anzahl der Parameter wird dabei "strafend" berücksichtigt, da sonst umfassende Modelle mit vielen Parametern bevorzugt würden. Man erhält AIC aus folgender Gleichung:

$$AIC = n \cdot \ln\left(\frac{SS}{n}\right) + 2K \quad \text{Gleichung 3.9}$$

n Anzahl der Messwerte aus den Inkubationen

SS Summe der Abweichungsquadrate

K Anzahl der errechneten Modellparameter plus 1 (bei den enzymkinetischen Inhibitionsmodellen gibt es drei Modellparameter, V_{\max} , K_m und K_i)

Das AIC_c ist eine sinnvolle Alternative zu AIC und schwächt den Mangel der AIC zum Überfitten ab. Der korrigierte AIC-Wert (AIC_c) lautet wie folgt:

$$AIC_c = AIC + \frac{2K(K+1)}{n-K-1} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Je kleiner das AIC_c , desto besser passt das entsprechende Modell zu den Daten. Das Programm liefert bei jeder enzymkinetischen Auswertung zu jedem Modell das dazugehörige AIC_c . Dies ist ein dimensionsloser Zahlenwert mit positivem oder negativem Vorzeichen. Das Modell mit dem kleinsten AIC_c -Wert passt am besten zu den gemessenen Werten. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Modell das bessere ist, wird über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Wahrscheinlichkeit (\%)} = \frac{e^{0,5\Delta}}{1 + e^{0,5\Delta}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Um die Wahrscheinlichkeit von zwei Modellen miteinander zu vergleichen, muss die Differenz zwischen den beiden AIC_c -Werten gebildet werden. Ist die Differenz gleich Null, sind beide Modelle mit einer 50-prozentigen Wahrscheinlichkeit gleich gut. Unterscheidet sich Modell A von Modell B um zwei Zahlen, wobei Modell A den kleineren Wert hat, so ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeit eine 73-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass Modell A das bessere ist, und eine 27-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass B das bessere Modell ist. Um mit einer ausreichenden Wahrscheinlichkeit (95 %) ein Modell als das besser geeignete auszuwählen, müssen sich die AIC_c -Werte um mindestens sechs Zahlenwerte unterscheiden.

3.10.4 Auswertung der Daten aus den Inkubationsversuchen

Bei den Inhibitionsversuchen wurden alle Datenpunkte durch drei identische Assays bestimmt. Das Enzymkinetik-Programm SPSS hat aus allen Datenpunkten den Mittelwert und den Standardfehler bestimmt. Die so ermittelten enzymkinetischen Daten (K_m , V_{max} und K_i) wurden mit ihrem Standardfehler angegeben. Die Anpassung der Kurven erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate, wobei der Determinationskoeffizient r^2 Aussagen über die Güte zulässt. Weitere ermittelte Parameter waren die Standardabweichung der Residuen ($S_{y,x}$) und das AIC_c mit deren Hilfe das am besten passende Modell ausgewählt werden konnte. Außerdem wurde zu jedem Modell der Residuen Verlaufstest durchgeführt, um zu sehen, welches Modell ausgeschlossen werden konnte. Alle Ergebnisse aus allen Inkubationen wurden graphisch mit dem Michaelis-Menten- und dem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt.

3.11 Pharmakodynamische Testung

Die Präparation und Kultur der neuronalen Zellen sowie die Messungen zur pharmakodynamischen Aktivität von Temazepam und den Temazepam-Glucuroniden mittels der Mikroelektroden-Array-Technik erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Melanie Jungblut (Jungblut 2006) am Max Planck-Institut für Polymerforschung,

Mainz, Arbeitskreis Prof. Knoll. Im Folgenden soll ein Überblick über die verwendeten Materialien und Methoden gegeben werden.

Der Mikroelektroden-Array (MEA)

Ein Standard-MEA Biosensor (Abbildung 3.6) besteht typischerweise aus 60 Elektroden, die sich auf einer rechteckigen Aufnahmeplatte von 700 μm bis 5 mm Länge befinden. Die Elektroden (Durchmesser 30 μm) bestehen aus Titaniumnitrid und sind in einer 8 x 8 Geometrie, mit einem Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt benachbarter Elektroden von 200 μm , auf dem Array angeordnet. Jede Elektrode besteht aus Tausenden Titaniumnitridsäulen (Durchmesser circa 0,1 μm), was die Elektrodenoberfläche drastisch vergrößert und somit zu einer Reduktion des Widerstandes im Vergleich zu flachen Goldelektroden führt.

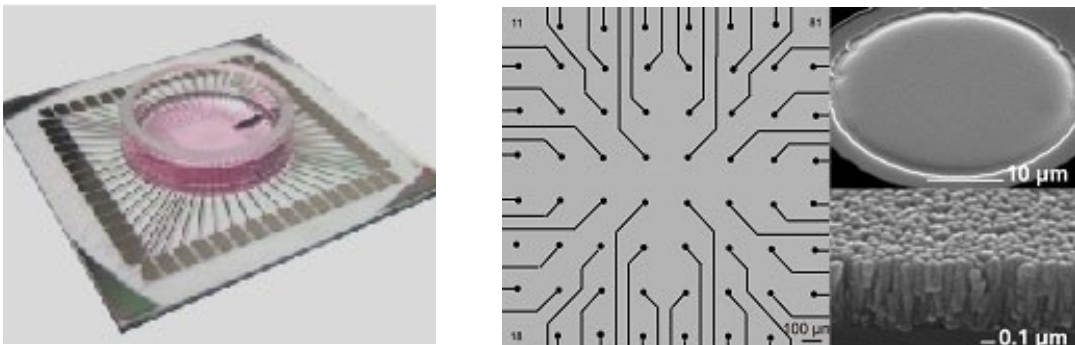


Abbildung 3.6 Links ist ein Mikroelektroden-Array (MEA) zu sehen. In der rechten Abbildung ist links die Anordnung der Elektroden in einer 8 x 8 Geometrie dargestellt. In der rechten Abbildung oben ist eine Elektrode dargestellt und unten eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Elektrodenoberfläche (Abb. von Fa. Multi Channel Systems).

Messanordnung

Zur Messung wurde der MEA in das Verstärkersystem (Fa. Multi Channel Systems) eingespannt (Abbildung 3.7). Die aufgezeichneten Signale wurden durch einen Filterverstärker verstärkt und zur Datenerfassung an einen Computer weitergeleitet.



Abbildung 3.7 Mikroelektroden-Array (MEA): Messanordnung mit Verstärker (Abb. von Fa. Multi Channel Systems).

Sensorpräparation

Im ersten Schritt der Sensorpräparation wurde der MEA einer Dampfsterilisation im Autoklaven (HV25, Wolf, Deutschland) unterzogen. Anschließend wurde die Oberfläche mit Poly-D-Lysin (PDL) (70,000-150,000 MW, Sigma) beschichtet. Dazu wurde PDL in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in MilliQ-Wasser ganzflächig über Nacht bei Raumtemperatur auf die MEA-Oberfläche gegeben. Am nächsten Tag wurde die PDL-Lösung abgenommen und der MEA dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen, um nicht gebundenes PDL zu entfernen. Bevor die Zellsuspension aufgebracht wurde, wurde die Oberfläche im Stickstoffstrom getrocknet. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Werkbank.

Zur Gewinnung der Zellkulturen wurde eine CD Ratte (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) am 18. Trächtigkeitstag nach lokaler Betäubung durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden entnommen und in Calcium- und Magnesium-freie Hanks balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Deutschland) mit 10 mM Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES) (Invitrogen, Deutschland) überführt. Lediglich der prefrontale Teil des Kortex wurde zur enzymatischen Behandlung in Neurobasalmedium (Invitrogen), das mit Cystein-aktiviertem Papain (L-Cystein: 0,2 mg/ml, Papain: 2 U/ml (Sigma, Deutschland) und DNase I (10 mg/ml, Roche, Deutschland) versetzt wurde, überführt. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette wurde das Gewebe vorsichtig zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die genaue Zelldichte zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (Invitrogen) vermischt. Da vitale

Zellen im Gegensatz zu toten Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und somit farblos erscheinen, konnte ihre Dichte nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. In einem Volumen von 50 μl wurden die Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen/ mm^2 auf den MEA aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Kultivierung bei 37 °C über 3 Wochen. Nach 21 Tagen zeigte das entstandene neuronale Netzwerk synchronisierte und periodische Bursts. Eine schematische Darstellung der Sensorpräparation ist in Abbildung 3.8 wiedergegeben.

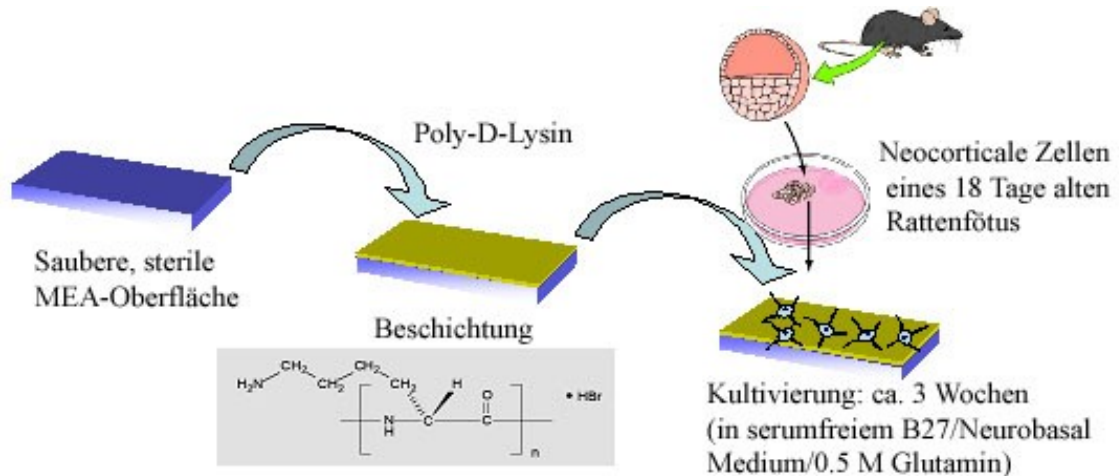


Abbildung 3.8 Mikroelektroden-Array (MEA): Sensorpräparation (Teile der Abbildung wurden übernommen von Geoffrey M. Cooper, *The Cell*, 2nd Edition).

Zellwachstum

Zur Kontrolle des Wachstums der neocorticalen Zellen *in vitro* binnen zwei Wochen wurden verschiedene Färbemethoden angewendet und die resultierenden angefärbten Zellstrukturen mit einem konfokalen Mikroskop des Typs Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss AG, Deutschland) dargestellt. Dazu wurden die Zellen auf runde Deckgläser, die ganzflächig mit PDL beschichtet wurden, ausgesät und nach 7, 14 oder 21 Tagen *in vitro* für 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Die Inkubation mit dem in PBS mit 1 % Ziegenserum und 0,15 % Tween 20 (Sigma) verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zur Visualisierung von neuronalen Somata und Dendriten wurde für das Microtubule-Associated Protein 2 (MAP2) der Primärantikörper polyclonal Rabbit anti-MAP2, für das in den präsynaptischen Endigungen enthaltene Synapsin polyclonal Rabbit anti-Synapsin I und für das „saure Gliafaserprotein (GFAP)“ Mouse anti-GFAP, clone GA5 als Primärantikörper für eine Darstellung der Astrocyten verwendet. Am folgenden Tag wurde der entsprechende fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper nach dreimaligem Waschen mit PBS in einer Verdünnung von 1:100 für 3 bis 12 Stunden zu den Zellen gegeben. Zur Anregung der Rhodamin-markierten Strukturen (rot) (MAP2) wurde ein Helium/Neon-Laser ($\lambda = 543 \text{ nm}$) herangezogen. Zur Anregung der Fluorescein-markierten Strukturen (grün) (Synapsin, GFAP) wurde ein Argon-Laser eingesetzt ($\lambda = 488 \text{ nm}$).

Aufzeichnung der neuronalen Aktivität

Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch einen während einer Messung aufgenommenen Datensatz, wie er von der Auswertungssoftware MCRack (Fa. Multi Channel Systems) dargestellt wird. In jedem Einzelfeld ist die an einer Elektrode gemessene neuronale Aktivität aufgetragen. Dies ist die spontane Aktivität der Neuronen, die sich entweder auf der Elektrode oder in näherer Umgebung zur Elektrode befinden. Die neuronale Aktivität ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Spikes und Bursts. Sind innerhalb eines kurzen Zeitabstandes eine Vielzahl dicht aufeinander folgender Spikes zu verzeichnen, so spricht man von einem Burst. Nach 3 Wochen Kultivierung der neocorticalen Zellen treten synchronisierte und periodische Bursts auf.

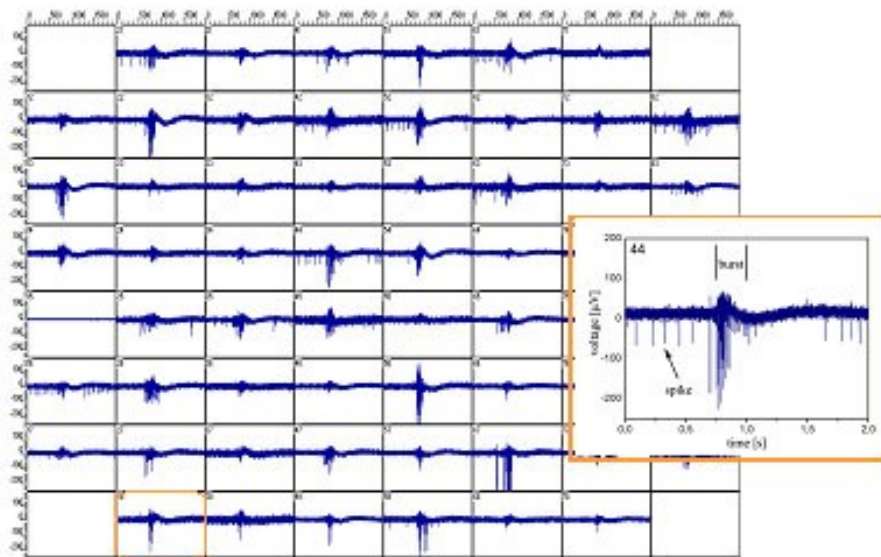


Abbildung 3.9 Mikroelektroden-Array (MEA): Exemplarische Darstellung eines Datensatzes von den 60 Elektroden des MEA. Spontane native Aktivität eines Netzwerkes nach 24 Tagen in vitro. Jedes Fenster zeigt das Signal einer Elektrode über einen Zeitraum von zwei Sekunden.

4 Ergebnisse

4.1 Enzymatische Synthese

Anlehnend an die Synthese verschiedener Arzneistoff-Glucuronide mit Lebermikrosomen von verschiedenen Tierespezies oder isolierten Enzymen wurde eine enzymatische Synthese für die Benzodiazepin-Glucuronide entwickelt.

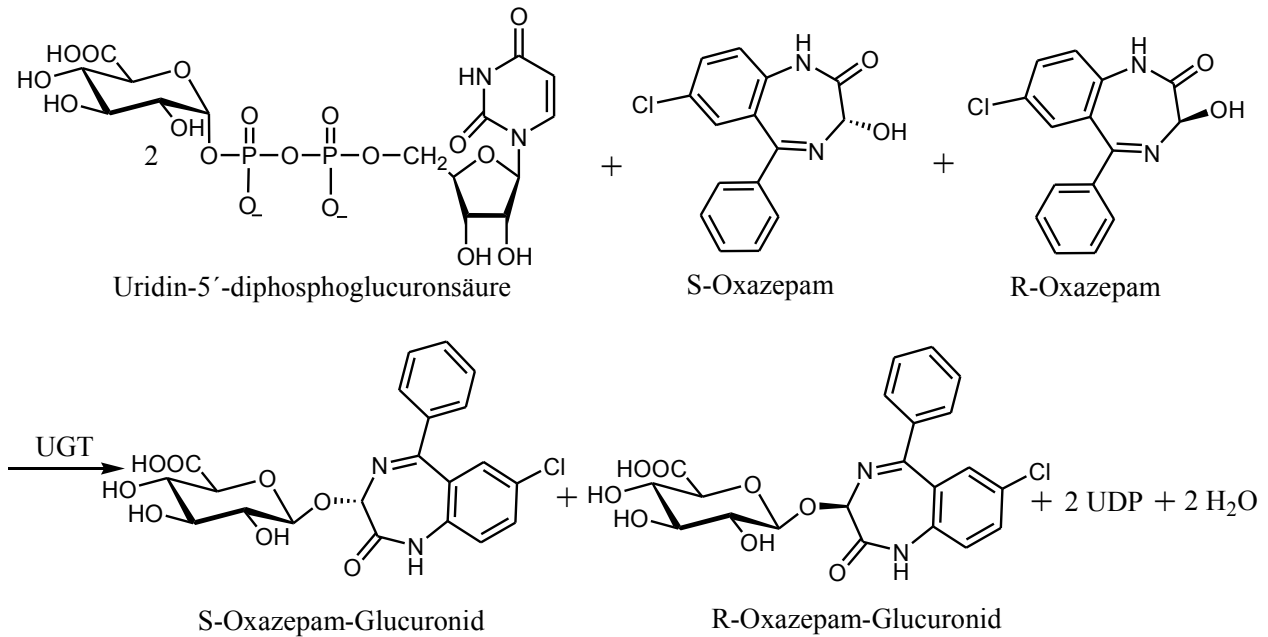


Abbildung 4.10 Glucuronidierung von (R,S)-Oxazepam.

4.1.1 Gewinnung der Mikrosomen

Die Lebermikrosomen wurden aus frischem homogenisiertem Schweinelebergewebe mittels Zentrifugation gewonnen (Experimenteller Teil 3.3.1, S.29 und 3.3.2, S.30). Der Proteingehalt wurde mittels Bicinchoninsäure bestimmt und betrug 36 mg/ml.

4.1.2 Syntheseansatz

Die zugesetzten Mengen der einzelnen Komponenten (Tabelle 3.1, S.31) für die enzymatische Synthese wurden optimiert, um die bestmögliche Ausbeute zu erzielen. Obwohl sich Benzodiazepine im Verhältnis 1:1 mit der Uridin-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) umsetzen, zeigte sich, dass die beste Ausbeute bei einem molaren Verhältnis Benzodiazepin zu Glucuronsäure von 1:5 zu erzielen war. Eine Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C erwies sich als optimal. Auch der Zusatz an Mikrosomen wurde optimiert. So zeigte sich, dass bei Zugabe einer höheren Konzentration an Mikrosomen sich die Ausbeute nicht erhöhte.

Die optimierten Reaktionsansätze enthielten:

1 mM des Benzodiazepins (Oxazepam, Temazepam oder Lorazepam) in 3 ml Methanol, 5 mM UDPGA, 5 mM MgCl₂, 0,12 mg Brij 58 und 36 mg Gesamtprotein der Mikrosomenfraktion (in 1 ml Homogenisationsmedium) in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4. Das Gesamtvolumen betrug 30 ml pro Syntheseansatz.

4.1.3 Aufkonzentrierung der Benzodiazepin-Glucuronide

Vor der präparativen Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide wurden die jeweiligen Ansätze mittels Festphasenextraktion aufkonzentriert.

4.1.4 Präparative Trennung der diastereomeren Benzodiazepin-Glucuronide

Die entstandenen diastereomeren Glucuronide der Benzodiazepine wurden hochleistungsflüssigkeitschromatographisch auf einer RP18 Säule mit dem Laufmittel 0,3 % H₃PO₄/Acetonitril/Isopropanol 78:16:6 (V/V/V) bei einer Flussrate von 7,5 ml/min voneinander getrennt. Anlehnend an die in der Literatur beschriebene Bestimmung von R- und S-Oxazepam-Glucuronid mittels HPLC (Patel et al., 1995b), wurde in dieser Arbeit das Laufmittel mit gleichen Bestandteilen jedoch etwas unterschiedlicher Konzentration für die Bestimmung aller Benzodiazepin-Glucuronide eingesetzt. Die diastereomeren Glucuronide von Oxazepam wurden entsprechend der Literaturangaben durch ihre relativen Retentionszeiten (R- eluiert vor S-Oxazepam-Glucuronid) und ihren relativen Peakhöhen (S- ca. 3-4 mal höher als R-Oxazepam-Glucuronid) bestimmt (Patel et al., 1995a; Patel et al., 1995b; Court et al., 2002).

Die Retentionszeiten waren folgende:

R-Oxazepam-Glucuronid	20-22 min
S-Oxazepam-Glucuronid	23-25 min
R-Tamazepam-Glucuronid	32-34 min
S-Tamazepam-Glucuronid	35-37 min
R-Lorazepam-Glucuronid	26-28 min
S-Lorazepam-Glucuronid	29-31 min

Nach der Trennung wurde jede Fraktion (0,5-1,0 ml) mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und die Reinheit mit Hilfe einer analytischen Säule überprüft. Die diastereomeren reinen Fraktionen der jeweiligen Benzodiazepin-Glucuronide wurden vereinigt. Mittels Festphasenextraktion wurden Salze und andere hydrophile Verunreinigungen entfernt und die Glucuronide in eine Methanolphase überführt. Daraus wurden dann die MS/MS-Messungen durchgeführt (Tabelle 4.7, S.55 und Tabelle 4.8, S.56). Nach vollständiger Trocknung wurden die Ausbeuten bestimmt (Tabelle 4.6) und die ¹H-NMR-Spektren der jeweiligen Glucuronide aufgenommen (Abbildung 4.13 - Abbildung 4.18). Die ¹H-NMR-Daten sind in der Tabelle 4.9 und Tabelle 4.10 wiedergegeben.

Tabelle 4.6 Ausbeute der diastereomeren reinen Glucuronide nach enzymatischer Synthese und hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Trennung und Reinigung.

Substrat	Produkte	Ausbeute [%]	Ausbeute [mg]
(R,S)-Oxazepam	R-Oxazepam-Glucuronid	16	2,22
	S-Oxazepam-Glucuronid	10	1,39
(R,S)-Temazepam	R-Temazepam-Glucuronid	25	3,57
	S-Temazepam-Glucuronid	28	4,00
(R,S)-Lorazepam	R-Lorazepam-Glucuronid	26	3,87
	S-Lorazepam-Glucuronid	10	1,49

4.1.5 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide

4.1.5.1 LC-ESI-MS/MS-Messungen

In der Tabelle 4.7 sind die theoretischen (m/z (theor.)) und die experimentell (m/z (exp.)) bestimmten Massen der synthetisierten Benzodiazepin-Glucuronide sowie die daraus resultierende Fehlerabweichung in ppm aufgezeigt.

Tabelle 4.7 Experimentell (m/z (exp.)) und theoretisch (m/z (theor.)) bestimmte Massen der Benzodiazepin-Glucuronide für (a) = R-Oxazepam-Glucuronid, (b) = S-Oxazepam-Glucuronid, (c) = R-Temazepam-Glucuronid, (d) = S-Temazepam-Glucuronid, (e) = R-Lorazepam-Glucuronid und (f) = S-Lorazepam-Glucuronid.

Substanz	Elementare Zusammensetzung	m/z (theor.)	m/z (exp.)	Fehler (ppm)
(a)	$C_{21}H_{20}O_8N_2^{35}Cl$	463,0903	463,0906	0,7
(b)			463,0902	0,2
(c)	$C_{22}H_{22}O_8N_2^{35}Cl$	477,1059	477,1061	0,5
(d)			477,1061	0,4
(e)	$C_{21}H_{19}O_8N_2^{35}Cl_2$	497,0513	497,0515	0,4
(f)			497,0511	0,5

In den nachfolgenden MS²-Experimenten (siehe Tabelle 4.8) zeigte sich für alle Benzodiazepin-Glucuronide dieselbe charakteristische Fragmentierung. Zuerst erfolgte die Abspaltung des Glucuronsäurerests (-176u), was in einem Massenpeak des zugehörigen Benzodiazepins resultiert $[M+H-Gluc]^+$. Weitere charakteristische Peaks entstehen durch Wasserabspaltung (-18u) $[M+H-Gluc-H_2O]^+$ und Abspaltung von

Kohlenmonoxid (-28u) $[M+H-Gluc-H_2O-CO]^+$. Die Beschriftung Gluc steht für die Glucuronsäureeinheit.

Tabelle 4.8 Fragmentationen der MS/MS-Experimente für (a) = R-Oxazepam-Glucuronid, (b) = S-Oxazepam-Glucuronid, (c) = R-Temazepam-Glucuronid, (d) = S-Temazepam-Glucuronid, (e) = R-Lorazepam-Glucuronid und (f) = S-Lorazepam-Glucuronid; Gluc = Glucuronsäureeinheit.

Fragment-ion	(a),(b) m/z (theor.)	(a) m/z (exp.)	(b) m/z (exp.)	(c),(d) m/z (theor.)	(c) m/z (exp.)	(d) m/z (exp.)	(e),(f) m/z (theor.)	(e) m/z (exp.)	(f) m/z (exp.)
$[M+H-Gluc]^+$	287,0582	287,0583	287,0583	301,0738	301,0740	301,0738	321,0192	321,0192	321,0190
$[M+H-Gluc-H_2O]^+$	269,0476	269,0476	269,0478	283,0633	283,0632	283,0632	303,0086	303,0085	303,0086
$[M+H-Gluc-H_2O-CO]^+$	241,0527	241,0527	241,0526	255,0684	255,0683	255,0683	275,0137	275,0136	275,0136

Im Anhang sind alle MS/MS-Spektren der Benzodiazepin-Glucuronide abgebildet (Abbildung 10.85 - Abbildung 10.90, S.186 - S.189).

Exemplarisch sind zwei Spektren der durchgeführten MS³-Experimente dargestellt:

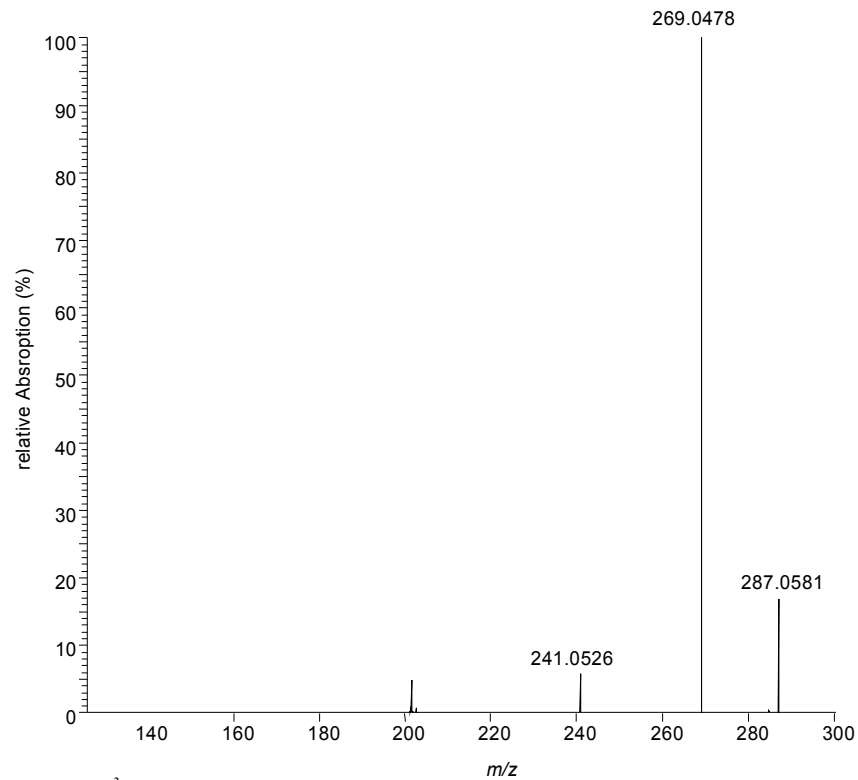


Abbildung 4.11 MS^3 von *S*-Oxazepam-Glucuronid nach Glucuronsäureabspaltung.

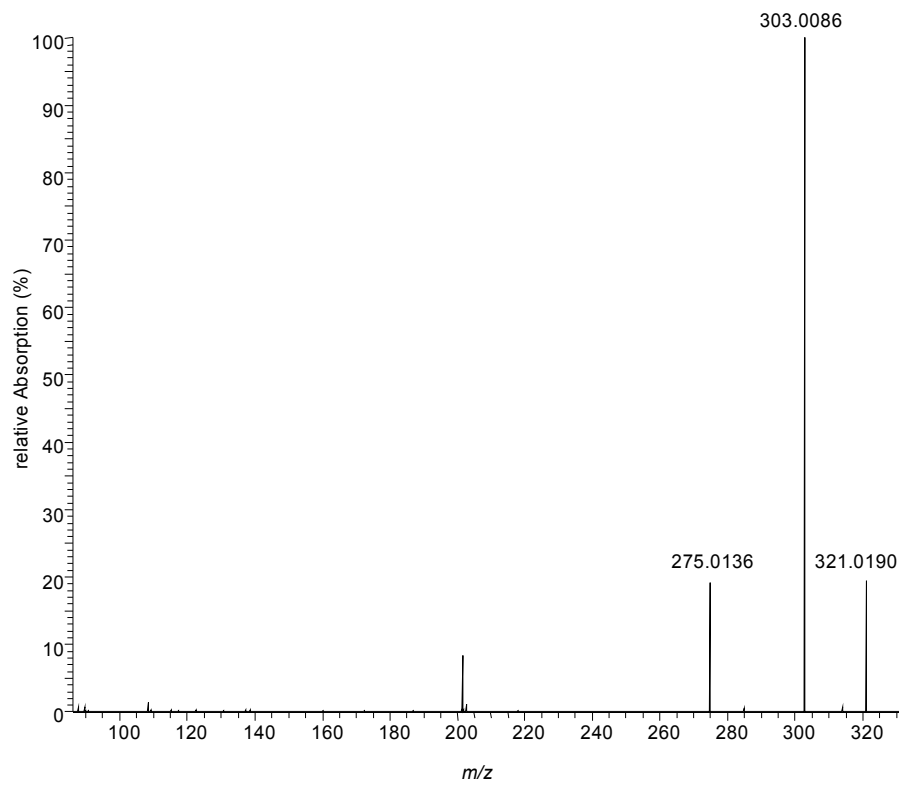


Abbildung 4.12 MS^3 von *S*-Lorazepam-Glucuronid nach Glucuronsäureabspaltung.

4.1.5.2 NMR-Messungen

Die NMR-Messungen wurden mit einem 300, 500 und 700 MHz NMR Spektrometer (Firma Bruker) in Kooperation mit Herrn Dr. Manfred Wagner am Max Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, Arbeitskreis Prof. Müllen durchgeführt. Von allen Glucuroniden wurden Protonenspektren gemessen (Abbildung 4.13 - Abbildung 4.18). Die Spektren von R- und S-Temazepam-Glucuronid und das Gemisch der Diastereomere wurde in einer Mischung aus MeOD/D₂O 70/30 gemessen. Da der Lösungsmittelpeak im Spektrum von R-Temazepam-Glucuronid störte, wurden die übrigen Glucuronide in einer Mischung aus CD₃CN/D₂O 70/30 gemessen. Diese erwies sich als besser geeignet für die zu untersuchenden Substanzen.

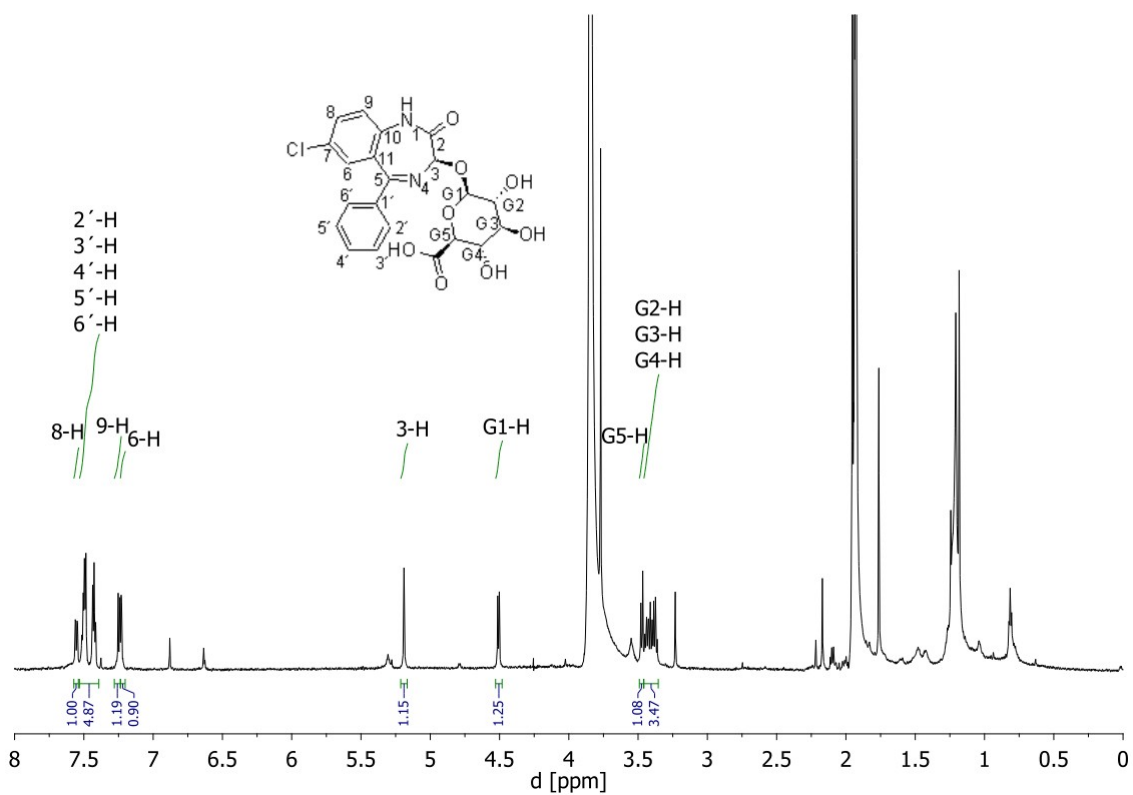


Abbildung 4.13 ¹H-NMR-Spektrum von R-Oxazepam-Glucuronid (700 MHz, CD₃CN/D₂O 70/30).

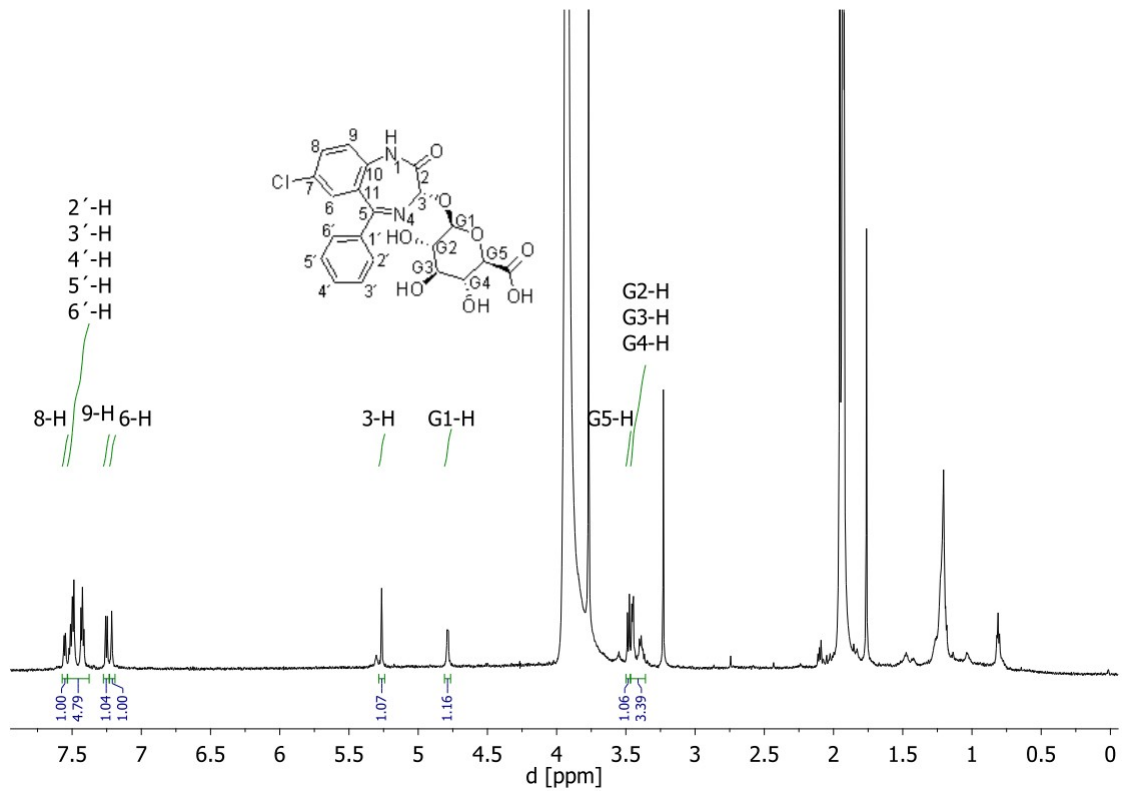


Abbildung 4.14 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von S-Oxazepam-Glucuronid (700 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 70/30).

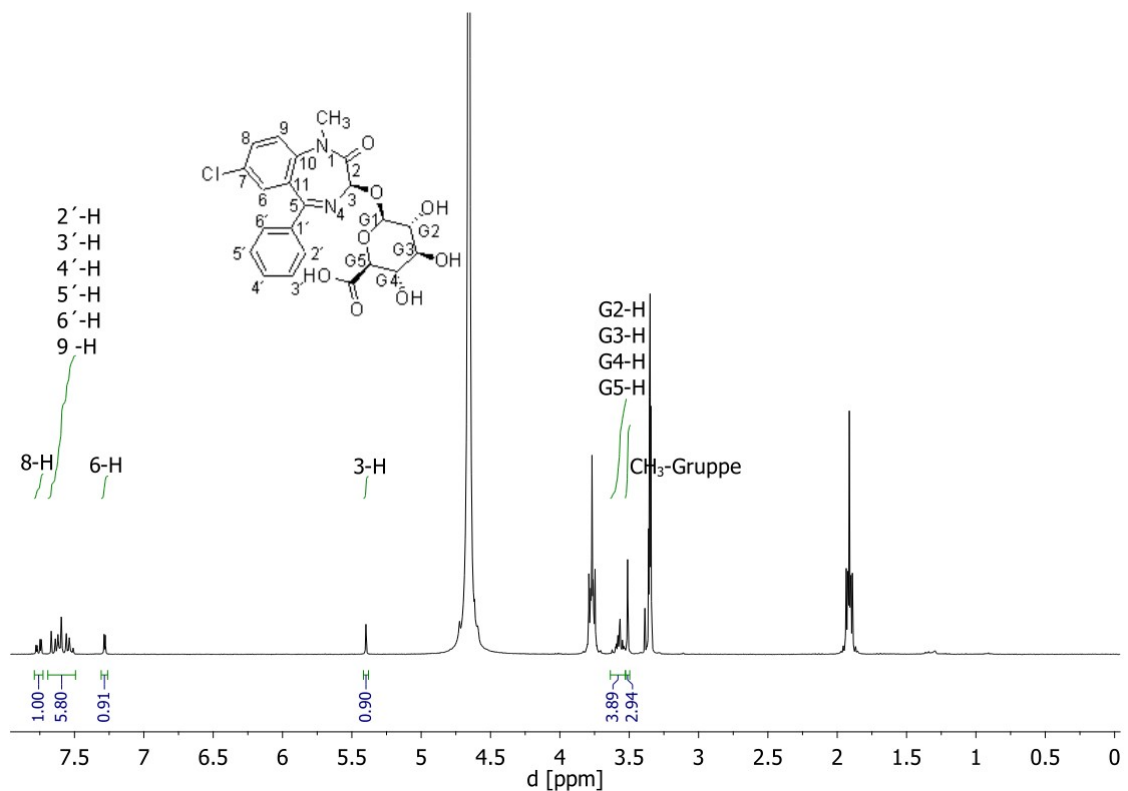


Abbildung 4.15 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von R-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, $\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$ 70/30).

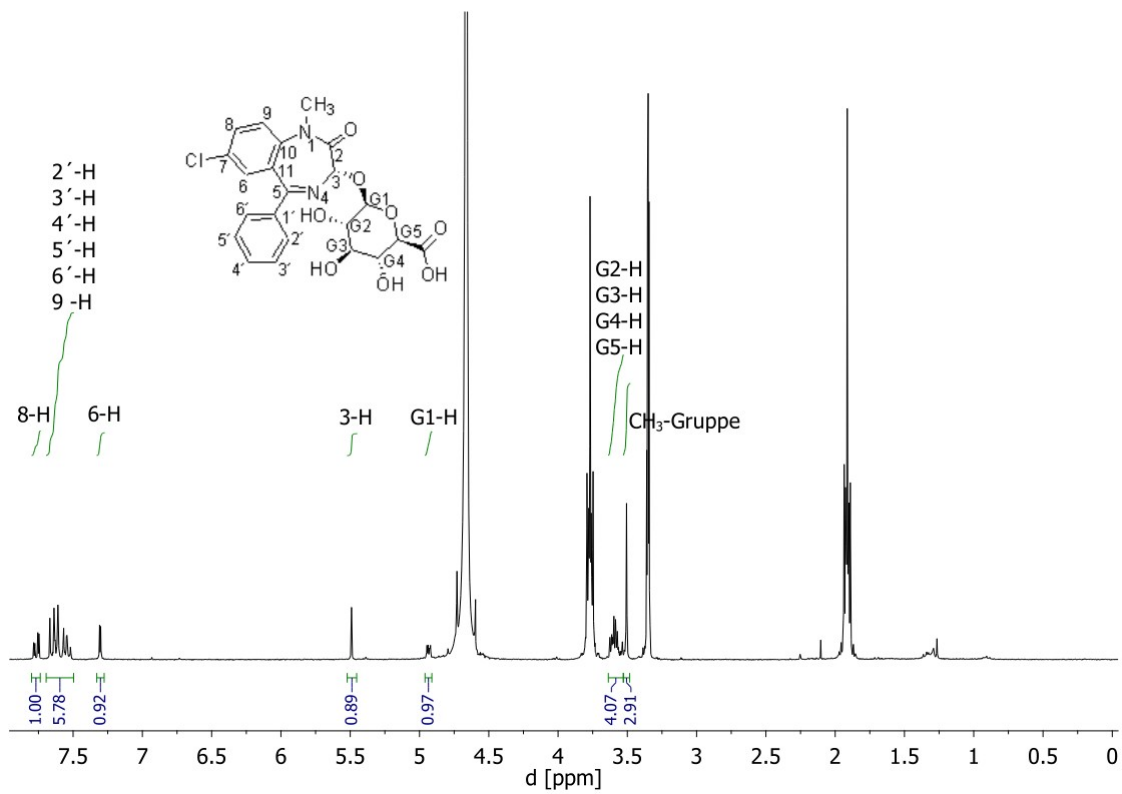


Abbildung 4.16 ¹H-NMR-Spektrum von *S*-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, MeOD/D₂O 70/30).

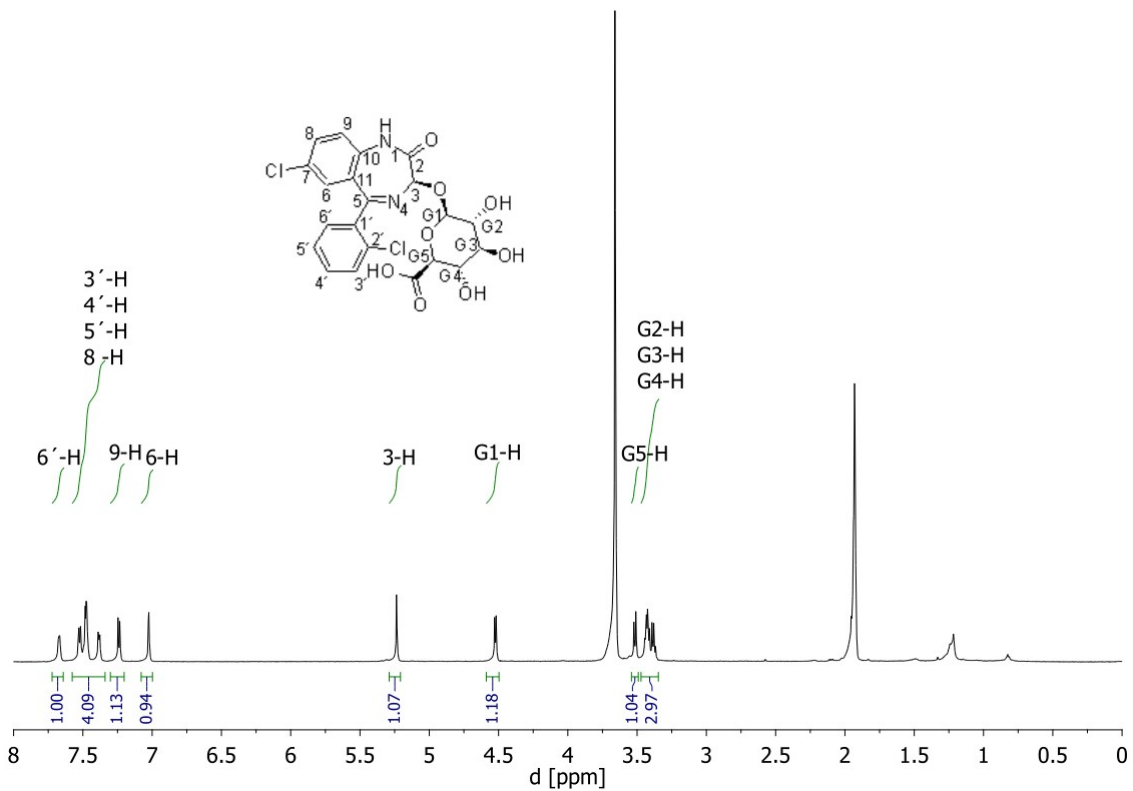


Abbildung 4.17 ¹H-NMR-Spektrum von *R*-Lorazepam-Glucuronid (700 MHz, CD₃CN/D₂O 70/30).

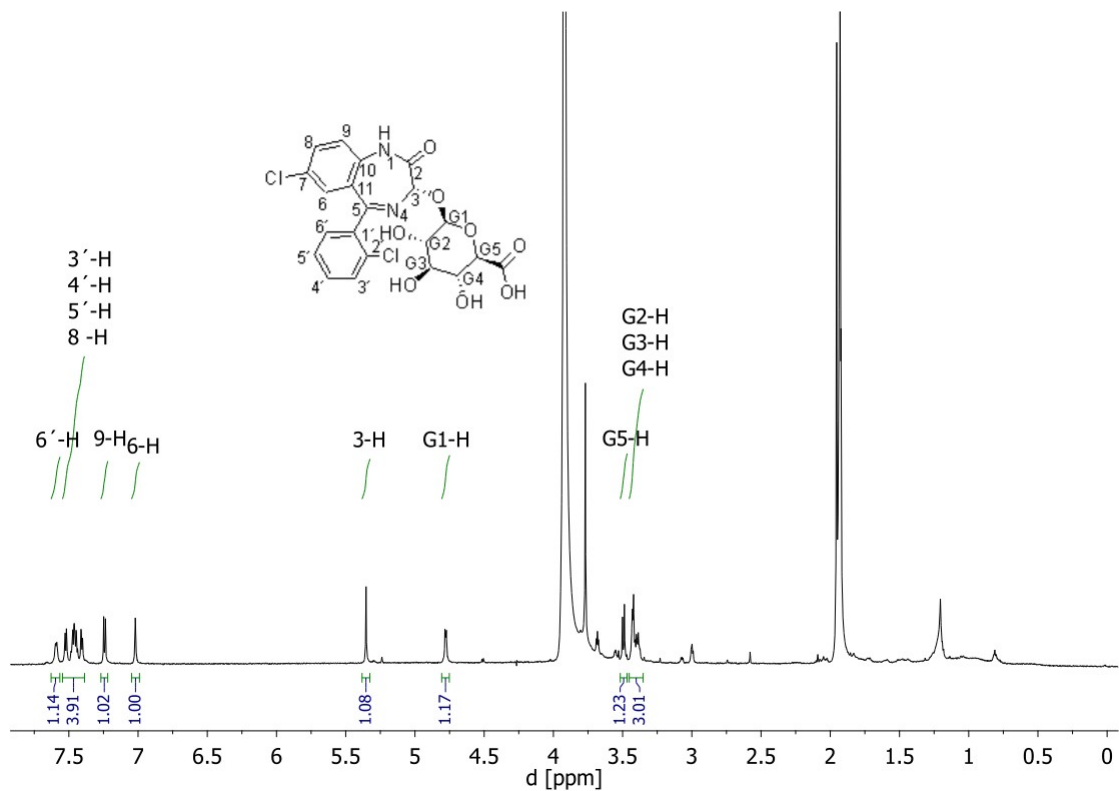


Abbildung 4.18 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *S*-Lorazepam-Glucuronid (700 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ 70/30).

Die aromatischen Protonen der Benzodiazepin-Glucuronide sind im Bereich 7-8 ppm zu sehen. Bei den Oxazepam- und Temazepam-Glucuroniden handelt es sich durch die einfache Chlorsubstitution an der Position C-7 um 8 Protonen. Bei den Lorazepam-Glucuroniden sind durch die zusätzliche Chlorsubstitution am C-2' Atom 7 aromatische Protonen zu sehen. Die Aufspaltung der Resonanzsignale und die chemische Verschiebung zeigen die genaue Lage der einzelnen Protonen im Molekül. Im Bereich zwischen 5,1-5,4 ppm ist das Proton der C-3 Position des asymmetrischen C-Atoms als Singulett zu sehen (Abbildung 4.19). Im Bereich 4,4-4,8 ppm tritt das Proton der Position G1 des Zuckers als Dublett auf (Abbildung 4.19). Durch die benachbarten Heteroatome ist dieses Proton stark ins tiefe Feld, d.h. zu höheren ppm-Werten verschoben. Beim Vermessen des Gemisches aus R- und S-Temazepam-Glucuronid (Abbildung 4.19, (a)+(b)) zeigen sich im Bereich 4,4-5,4 ppm vier Peaks mit jeweils ungefähr halber Signalintensität im Vergleich zu den Einzelpeaks der beiden getrennten Substanzen. Beim Temazepam entstehen beide Glucuronide in ungefähr derselben Ausbeute. Wie Abbildung 4.19 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die jeweiligen Diastereomere in ihrer chemischen Verschiebung und dem Aufspaltungsmuster der beiden beschriebenen Protonen in G1- und 3-Stellung. Dabei verhalten sich die Gruppe der R-Glucuronide und die der S-Glucuronide der Benzodiazepine untereinander sehr ähnlich.

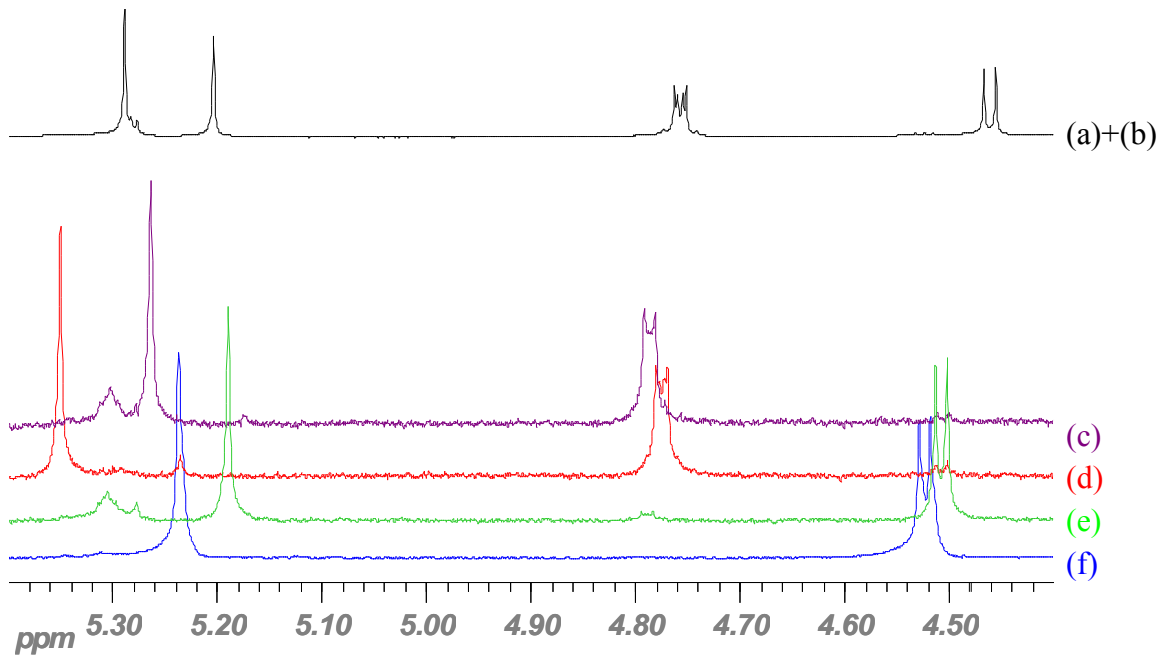


Abbildung 4.19 ¹H-NMR-Spektren: (a)+(b) Gemisch R- und S-Temazepam-Glucuronid, (c) S-Oxazepam-Glucuronid, (d) S-Lorazepam-Glucuronid, (e) R-Oxazepam-Glucuronid, (f) R-Lorazepam-Glucuronid.

Tabelle 4.9 ¹H-NMR-Daten der R-Benzodiazepin-Glucuronide.

	R-Oxazepam-Glucuronid			R-Temazepam-Glucuronid			R-Lorazepam-Glucuronid		
H	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]
Aromat									
8	7,55 (1H)	dd	8,8/2,3	7,62 (1H)	dd	8,9/2,5	7,52 (1H)	dd	8,7/2,3
6'	7,52- 7,38 (5H)	m	-	7,55- 7,48 (5H)	m	-	7,67 (1H)	d	5,7
2', 3', 4', 5'							7,48-7,34 (3H)	m	-
9	7,25 (1H)	d	8,8	7,25 (1H)	d	8,8	7,24 (1H)	d	8,7
6	7,23 (1H)	d	2,3	7,23 (1H)	d	2,5	7,03 (1H)	d	2,2
3	5,24 (1H)	s		5,20 (1H)	s		5,24 (1H)	s	
Zucker									
G1	4,51 (1H)	d	7,8	4,46 (1H)	d	7,8	4,52 (1H)	d	7,8
G5	3,47 (1H)	d	9,5	3,46 (1H)	d	9,8	3,52 (1H)	d	9,7
G2, G3, G4	3,46-3,35 (3H)	m	-	3,46-3,36 (3H)	m	-	3,46-3,35 (3H)	m	-
CH ₃ - Gruppe	-	-	-	3,34 (3H)	s		-	-	-

Tabelle 4.10 ¹H-NMR-Daten der S-Benzodiazepin-Glucuronide.

	S-Oxazepam-Glucuronid			S-Temazepam-Glucuronid			S-Lorazepam-Glucuronid		
H	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]	δ [ppm]	Multiziplität	J [Hz]
Aromat									
8	7,55 (1H)	dd	8,8/2,3	7,55 (1H)	dd	8,8/2,3	7,52 (1H)	dd	8,7/2,4
6'	7,52- 7,41 (5H)	m	-	7,52- 7,44 (5H)	m	-	7,59 (1H)	d	6,4
2', 3', 4', 5'							7,49-7,40 (3H)	m	-
9	7,25 (1H)	d	8,7	7,25 (1H)	d	8,7	7,24 (1H)	d	8,7
6	7,21 (1H)	d	2,3	7,21 (1H)	d	2,3	7,02 (1H)	d	2,3
3	5,27 (1H)	s		5,29 (1H)	s		5,35 (1H)	s	
Zucker									
G1	4,79 (1H)	d	7,5	4,76 (1H)	d	7,5	4,79 (1H)	d	7,5
G5	3,48 (1H)	d	9,8	3,46 (1H)	d	9,8	3,49 (1H)	d	9,6
G2, G3, G4	3,46-3,35 (3H)	m	-	3,46-3,36 (3H)	m	-	3,46-3,35 (3H)	m	-
CH ₃ - Gruppe	-	-	-	3,35 (3H)	s		-	-	-

4.1.6 Zusammenfassung

Die Benzodiazepin-Glucuronide waren in ausreichender Menge als Referenzsubstanzen durch eine enzymatische Synthese mit Schweinelebermikrosomen darstellbar. Nach präparativer Trennung der diastereomeren Glucuronide mittels HPLC wurden die spektrometrischen Daten der jeweiligen Diastereomere mittels LC/MS und $^1\text{H-NMR}$ ermittelt. Bei den LC/MS Messungen zeigen die experimentell bestimmten Massen der Glucuronide eine Fehlerabweichung von $< 0,7$ ppm im Vergleich zu den theoretischen Massen. MS^2 -Experimente belegen für alle Benzodiazepin-Glucuronide dieselbe charakteristische Fragmentierung. Die diastereomeren Glucuronide der jeweiligen Benzodiazepine zeigen keinerlei Unterschiede bei den LC/MS Messungen. Genauere Aussagen über die Stereochemie konnten also nur mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie getroffen werden. Die jeweiligen Diastereomere zeigen Unterschiede in ihrer chemischen Verschiebung und ihrem Aufspaltungsmuster an den Protonen der Position G1 und 3. Die R-Glucuronide und S-Glucuronide verhalten sich aber untereinander gleich. Für alle R-Glucuronide liegt die chemische Verschiebung von G1-H zwischen 4,46 und 4,52 ppm und von 3-H zwischen 5,20 und 5,24 ppm. Bei den S-Glucuroniden liegt G1-H zwischen 4,76 und 4,79 ppm und 3-H im Bereich zwischen 5,27 und 5,35 ppm. Auch das Aufspaltungsmuster von G1-H unterscheidet sich bei allen R-Glucuroniden von dem der S-Glucuronide wie Abbildung 4.20 zeigt. Bei den R-Glucuroniden zeigt sich ein Dublett vom Dublett, bei den S-Glucuroniden ist dagegen ein einfaches Dublett zu sehen.

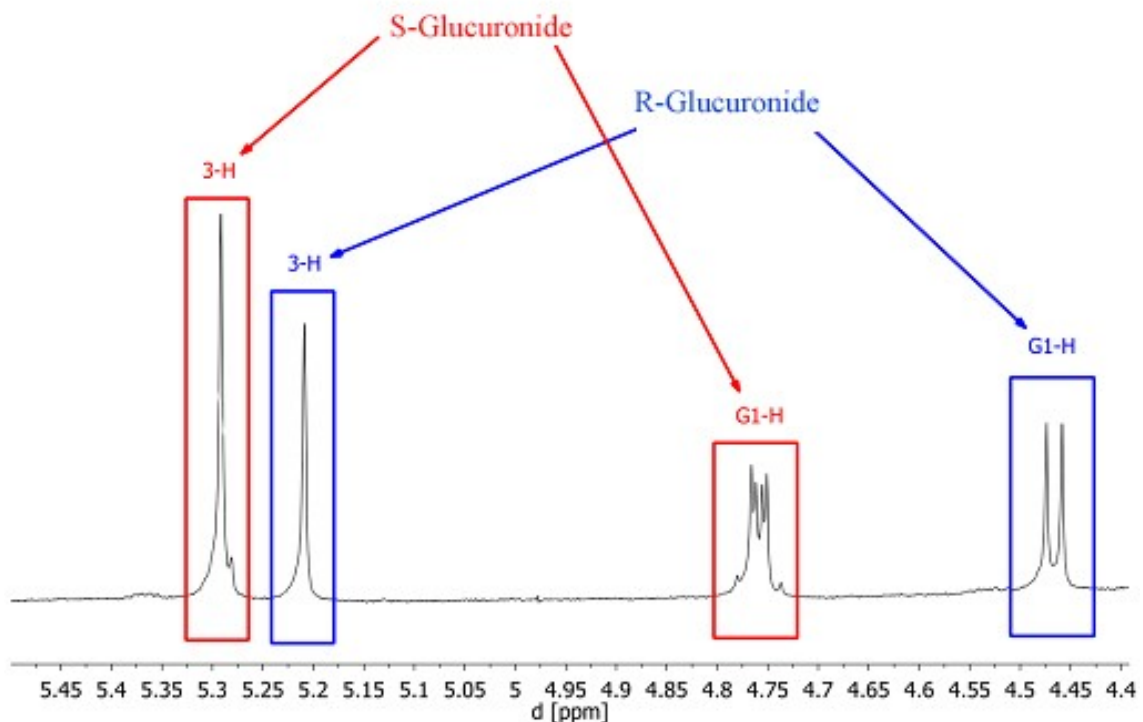


Abbildung 4.20 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Gemisches aus R- und S-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, MeOD/D₂O 70/30).

4.2 Chemische Synthese

4.2.1 Darstellung von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucofuranuronsäuremethylester und 1,2,3,4-Tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucofuranuronsäuremethylester

Als Ausgangssubstanz für die Synthese der Vorstufen diene das D-Glucofuranurono-6,3-lacton (**1**) (Abbildung 4.21). Nach alkalischer Methanolyse entsteht durch Ringerweiterung die an der Carboxylgruppe durch Methyl esterbildung geschützte Glucuronsäure (**2**), der Glucofuranuronsäuremethylester. Ohne weitere Aufarbeitung wurden durch Umsetzung mit Acetanhydrid/Perchlorsäure (Bollenback et al., 1955) oder Pivaloylchlorid/Pyridin (Vlahov und Snatzke 1983) die Hydroxygruppen peracyliert (Abbildung 4.21). Da bei pyridinkatalysierten Acylierungen von Sacchariden die Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom erhalten bleibt (Lehmann 1976) und D-Glucofuranurono-6,3-lacton ein Gemisch beider Anomere darstellt, entstehen bei dieser Reaktion α - und β -konfigurierte, peracylierte Methylglucuronate. Obwohl beide Anomere bei der folgenden Reaktion mit Bromwasserstoff das α -konfigurierte Bromid ergeben (anomerer Effekt), wurden nur die leicht durch Umkristallisation aus Ethanol erhältlichen β -Anomere (**3a**, **3b**) eingesetzt.

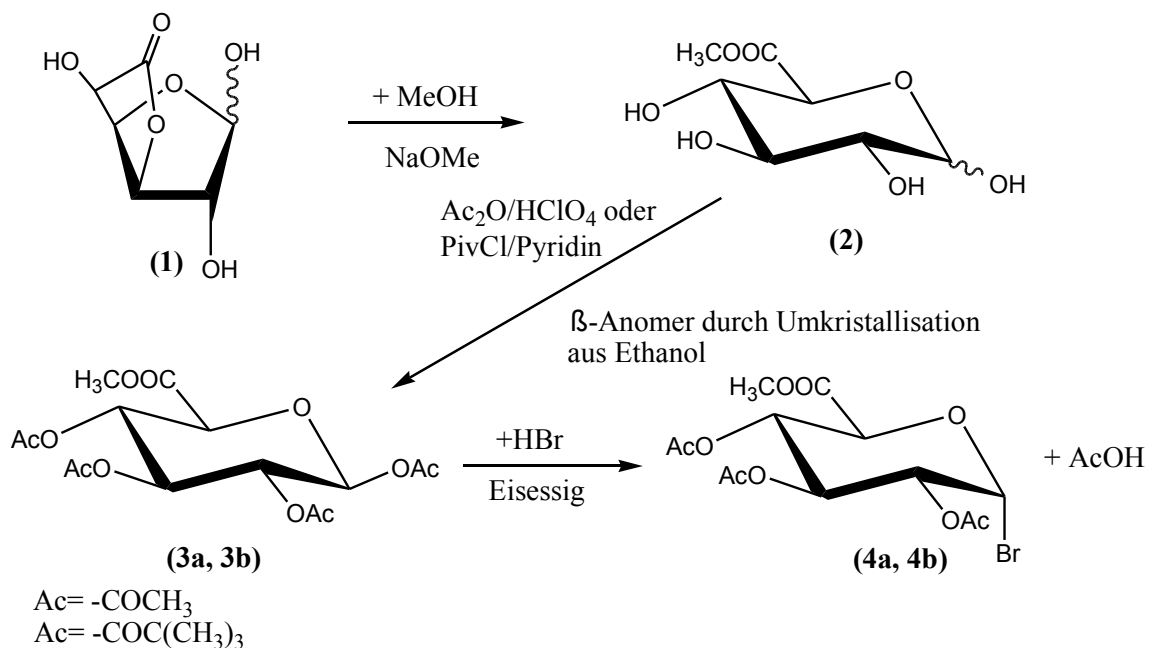


Abbildung 4.21 Methylierung, Peracylierung und Bromierung von Glucuronsäure.

4.2.2 Darstellung der Vorstufen 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethylester und 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-*O*-pivaloyl- α -D-glucopyranuronsäuremethylester

Aus den peracylierten Glucuronsäuremethylestern (**3a**, **3b**) entstehen bei der Umsetzung mit Bromwasserstoff in Eisessig die Acyl- α -D-glucuronosylbromide (**4a**, **4b**) (Abbildung 4.21). Die Bildung von Acyl- β -D-glucuronosylbromiden ist aufgrund des starken anomeren Effektes bei diesen Verbindungen nicht zu erwarten (Beyer und Walter 1991).

4.2.3 Darstellung der Vorstufe 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-hydroxy-1-desoxy- β -D-glucopyranuronsäuremethylester

Aus dem α -D-Glucopyranuronosylbromid (**4a**) entsteht durch Umsetzung mit Aceton (Fischer et al., 1984) der Hydroxyzucker (**5a**) (Abbildung 4.22). Aceton wird vor der Reaktion getrocknet, um Wasser in genauer Menge zugeben zu können. Bei der Reaktion handelt es sich um eine S_N2 Reaktion, bei der das Bromidion gegen die Hydroxygruppe ausgetauscht wird. Silbercarbonat dient hier als Promotor.

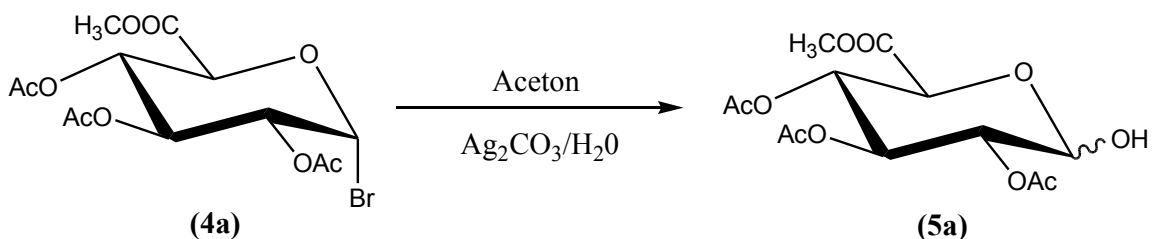


Abbildung 4.22 Austausch des Bromidions des acetylgeschützten Glucopyranuronosylbromids gegen die Hydroxygruppe.

4.2.4 Schmelzpunkte und Ausbeuten der Vorstufen

Folgende Verbindungen wurden nach Literaturvorschriften dargestellt:

- 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranuronsäuremethylester (**3a**) (Bollenback et al., 1955) Ausbeute: 29 % (Lit.: 40 %); Smp.: 176-177 °C (Lit.: 176,5-178 °C)
- 1,2,3,4-Tetra-*O*-pivaloyl- β -D-glucopyranuronsäuremethylester (**3b**) (Vlahov und Snatzke 1983) Ausbeute: 35 % (Lit.: 54 %); Smp.: 152-153 °C (Lit.: 153-155 °C)
- 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethylester (**4a**) (Bollenback et al., 1955) Ausbeute: 20,5 % (Lit.: 85 %); Smp.: 105-106 °C (Lit.: 106-107 °C)

¹H-NMR-Spektrum: s. Abbildung 10.82 (S.185), Tabelle 4.11

- 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-*O*-pivaloyl- α -D-glucofuranuronsäuremethylester (4b) (Vlahov und Snatzke 1983) Ausbeute: 17,6 % (Lit.: 70 %); Smp.: 87-88 °C (Lit.: 89-91 °C)

¹H-NMR-Spektrum: s. Abbildung 10.83 (S.185), Tabelle 4.12

- 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-hydroxy-1-desoxy- β -D-glucofuranuronsäuremethylester (5a) (Fischer et al., 1984) Ausbeute: vor Reinigung: 95,1 %, nach der Reinigung: 76,9 %

¹H-NMR-Spektrum: s. Abbildung 10.84 (S.186), Tabelle 4.13

4.2.5 NMR-Messungen der Vorstufen

Von den synthetisierten Vorstufen 4a, 4b und 5a wurden Protonenspektren aufgenommen. Die ¹H-NMR-Spektren sind im Anhang abgebildet (Abbildung 10.82-Abbildung 10.84, S.185 und S.186). Die ¹H-NMR-Daten sind in Tabelle 4.11 - Tabelle 4.13 aufgeführt.

Tabelle 4.11 ¹H-NMR-Daten von 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucofuranuronsäuremethylester (4a) (250 MHz, CDCl₃); s steht für Singulett, d für Dublett und t für Triplett.

H	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
1	6,64 (1H)	d	4,01
4	5,61 (1H)	t	9,73
3	5,23 (1H)	t	9,89
2	4,85 (1H)	dd	9,98/4,03
5	4,57 (1H)	d	10,29
-COOCH ₃	3,76 (3H)	s	-
Acetyl	2,09 (3H)	s	-
Acetyl	2,05 (6H)	d	1,29

Tabelle 4.12 ¹H-NMR-Daten von 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl-β-D-glucopyranuronsäuremethylester (4b) (250 MHz, CDCl₃); s steht für Singulett, d für Dublett und t für Triplett.

H	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
1	6,65 (1H)	d	4,09
4	5,68 (1H)	t	9,70
3	5,27 (1H)	t	9,90
2	4,85 (1H)	dd	9,87/4,11
5	4,58 (1H)	d	10,33
-COOCH ₃	3,73 (3H)	s	-
Pivaloyl	1,17 (18H)	d	4,42
Pivaloyl	1,13 (9H)	s	-

Tabelle 4.13 ¹H-NMR-Daten von 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hydroxy-1-desoxy-β-D-glucopyranuronsäuremethylester (5a) (250 MHz, CDCl₃); s steht für Singulett, d für Dublett, t für Triplett und m für Multiplett.

H	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
1;4	5,58 (2H)	m	-
3	5,19 (1H)	t	9,7
2	4,92 (1H)	dd	10,12/3,55
5	4,59 (1H)	d	10,06
-COOCH ₃	3,75 (3H)	s	-
Acetyl	2,08 (3H)	s	-
Acetyl	2,04 (6H)	d	1,2

4.2.6 Kopplungsreaktionen

Die oben beschriebenen Zuckerkomponenten wurden in einem weiteren Syntheseschritt mit den entsprechenden Benzodiazepinen in einer Kopplungsreaktion, wie der Königs-Knorr-Synthese (Königs und Knorr 1901) (Abbildung 1.4, S.11) oder der Williamson Ethersynthese (Abbildung 1.5, S.12) umgesetzt. Die am weitesten verbreitete Methode zur Kopplung einer Vielzahl von Arzneistoffen (Stachulski und Jenkins 1998; Thevis et al., 2001; Rho et al., 2004) mit der Glucuronsäure stellt die Königs-Knorr Synthese dar (Einleitung 1.3.1.3). Dabei folgt die Kopplung formal S_N2-Bedingungen, d.h. es kommt zur Konformationsänderung am chiralen C-Atom des Bromzuckers (Abbildung 1.4,

S.11). Als Promotor wird in der Königs-Knorr-Synthese Silbercarbonat eingesetzt. Es wurde aber auch die Lewis-Säure Silbertriflat (Biesalski et al., 1995) eingesetzt, das aufgrund seiner besseren Löslichkeit im Vergleich zum Silbercarbonat einen Vorteil hat. Der Zusatz des tertiären Amins 1,1,4,7,10,10-Hexamethyltriethylentetramin (HMTTA) soll die Komplexbildungseigenschaften der Silberionen erhöhen (Stazi et al., 2004), was ebenfalls getestet wurde. Die gewünschten Benzodiazepin-Glucuronide konnten mittels dieser Kopplungsreaktion und den beschriebenen Variationen nicht gewonnen werden.

Die Williamson Ethersynthese, die eine weitere Kopplungsreaktion darstellt, wurde ebenfalls zur Kopplung der Komponenten angewendet. Im ersten Schritt dieser Eintopfreaktion wurde zunächst durch eine Base die Hydroxyfunktion in ein Alkoholat überführt. Im nächsten Schritt sollte dann der ebenfalls geschützte Zucker mit dem entsprechenden Benzodiazepin gekoppelt werden. Als Basen wurden NaOH und DBU (Diazabicycloundecen) getestet. Auch diese Synthesestrategie führte nicht zu den gewünschten Produkten.

4.2.7 Zusammenfassung

Die für die Kopplungsreaktionen notwendigen geschützten und aktivierten Vorstufen konnten aus Glucuronolacton synthetisiert und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Synthesestrategien mit Hilfe der Königs-Knorr-Synthese und der Williamson Ethersynthese zur Kopplung der Benzodiazepine mit den aktivierten Zuckern führten jedoch nicht zu den gewünschten Produkten.

4.3 Analytik der Enzymassays und Wechselwirkungsstudien

4.3.1 HPLC

Sowohl die diastereomeren Glucuronide der Benzodiazepine Oxazepam, Temazepam und Lorazepam als auch die Glucuronide der Opiate Morphin und Codein erwiesen sich als gut detektierbare Substanzen. Die analytische Bestimmung dieser Substanzen erfolgte mittels HPLC/DAD bei einer Wellenlänge von 230 nm für die Benzodiazepin-Glucuronide und bei 210 nm für die Opiat-Glucuronide. Für die Opiat-Glucuronide Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid und Codein-Glucuronid standen Referenzsubstanzen zur Verfügung, die zur Kalibration verwendet wurden. Zur Bestimmung der Benzodiazepin-Glucuronide wurden die Referenzsubstanzen wie unter Abschnitt 4.1 (S.53) beschrieben synthetisiert und charakterisiert, da diese kommerziell nicht erhältlich waren. Die Kalibration erfolgte mit Hilfe der Benzodiazepine (Experimenteller Teil 3.6.2, S.35). Die quantitative Auswertung erfolgte über die Berechnung der Peakflächen. Für die Bestimmung der Benzodiazepin-Glucuronide und der Opiat-Glucuronide der Wechselwirkungsstudien wurden zwei unterschiedliche Laufmittel gewählt. Eine gleichzeitige Bestimmung unter isokratischen Bedingungen war aufgrund der unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der

Benzodiazepin- und der Opiat-Glucuronide nicht möglich. Zuerst wurden immer die Opiat-Glucuronide bestimmt, da sich diese als weniger stabil im Vergleich zu den Benzodiazepin-Glucuroniden erwiesen. Als interner Standard für die Bestimmung der Benzodiazepin-Glucuronide wurde Phenacetin verwendet.

Die Retentionszeiten der mit dem Benzodiazepin-Laufmittel (0,3 % H₃PO₄/Acetonitril/Isopropanol 78:16:6 (V/V/V)) bestimmten Substanzen waren:

Phenacetin (interner Standard, IS)	5,1 ± 0,3 min
R-Oxazepam-Glucuronid	8,6 ± 0,3 min
S-Oxazepam-Glucuronid	9,5 ± 0,3 min
R-Temazepam-Glucuronid	12,9 ± 0,4 min
S-Temazepam-Glucuronid	13,8 ± 0,4 min
Oxazepam	19,5 ± 0,5 min
Temazepam	28,2 ± 0,6 min

Im Anhang sind exemplarisch ein Chromatogramm der Oxazepam-Glucuronid-Bestimmung (Abbildung 10.91, S.189) und ein Chromatogramm der Temazepam-Glucuronid-Bestimmung (Abbildung 10.92, S.190) dargestellt.

Die Retentionszeiten der mit dem Morphin-Laufmittel (10 mM H₃PO₄ pH 2,7/Acetonitril 98:2 (V/V)) bestimmten Substanzen waren:

Morphin-3-Glucuronid	3,5 ± 0,4 min
Morphin-6-Glucuronid	5,9 ± 0,5 min
Morphin	7,3 ± 0,5 min

Im Anhang ist exemplarisch ein Chromatogramm der Morphin-Glucuronid-Bestimmung (Abbildung 10.93, S.190) dargestellt.

Die Retentionszeiten der mit dem Codein-Laufmittel (10 mM H₃PO₄ pH 2,7/Acetonitril 93:7 (V/V)) bestimmten Substanzen waren:

Codein-Glucuronid	5,8 ± 0,5 min
Codein	9,8 ± 0,7 min

Im Anhang ist exemplarisch ein Chromatogramm der Codein-Glucuronid-Bestimmung (Abbildung 10.94, S.190) dargestellt.

4.3.2 Kalibrierung

Nach Messung der Kalibrierlösungen mittels HPLC erfolgte die Auswertung über die Peakflächen, für die Benzodiazepin-Glucuronide unter Einbeziehung des internen Standards (IS) Phenacetin. Dieser wurde, wie in der Literatur beschrieben (Court et al., 2002), bereits als interner Standard für die Bestimmung der Oxazepam-Glucuronide eingesetzt. Die Peakflächen wurden hierzu direkt (für die Opiat-Glucuronide) oder nach Quotientenbildung (Fläche Analyt/Fläche IS) gegen die Konzentration des Kalibrators aufgetragen. Nach Durchführung einer linearen Regression konnten die Regressionsgleichungen bestimmt werden. Über diese erfolgte die Berechnung der Glucuronid-Konzentrationen in den Assays.

In den Abbildung 4.23 - Abbildung 4.27 sind die Kalibriergeraden von Oxazepam, Temazepam, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid und Codein-Glucuronid dargestellt. Zusätzlich sind der Korrelationskoeffizient r und die Steigung angegeben. Da die Kalibriergeraden durch den Koordinatenursprung gelegt wurden, beträgt der Ordinatenabschnitt Null.

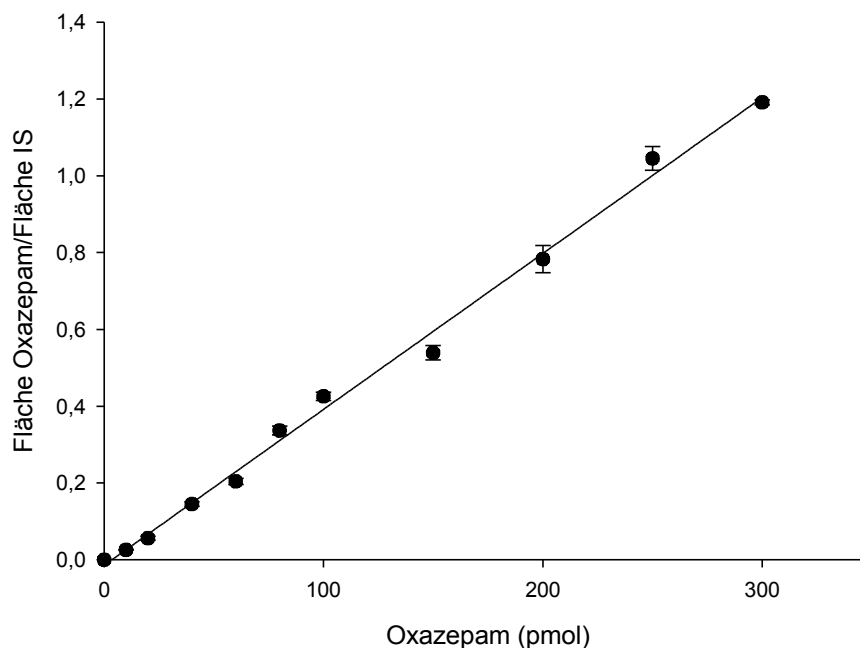


Abbildung 4.23 Kalibriergerade von Oxazepam; r : 0,99179; Steigung: $0,0041 \pm 0,00007$. Als interner Standard (IS) wurde Phenacetin verwendet.

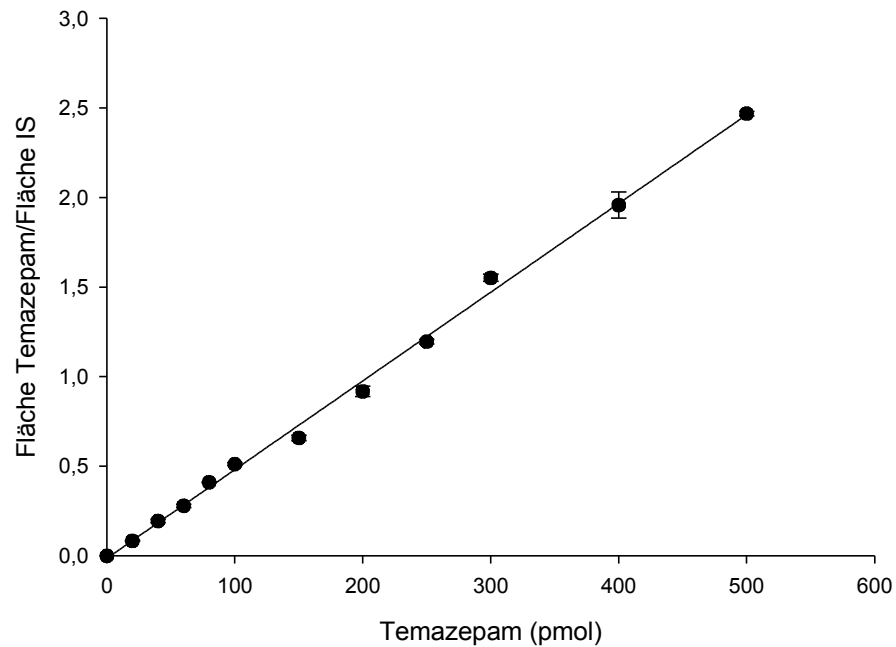


Abbildung 4.24 Kalibriergerade von Temazepam; $r: 0,99529$; Steigung: $0,0050 \pm 0,00006$. Als interner Standard (IS) wurde Phenacetin verwendet.

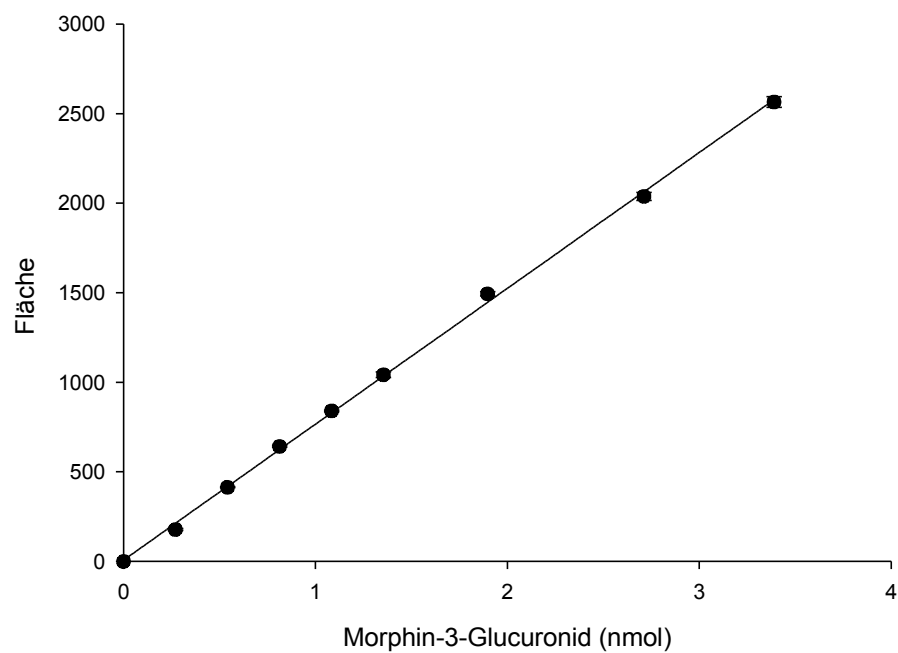


Abbildung 4.25 Kalibriergerade von Morphin-3-Glucuronid; $r: 0,99855$; Steigung: $758,50 \pm 5,78$.

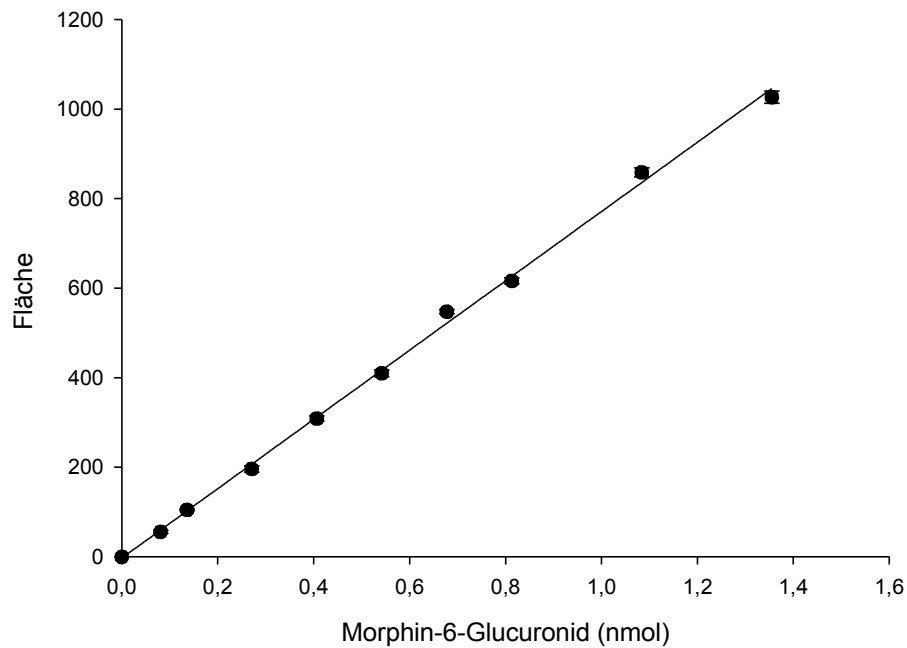


Abbildung 4.26 Kalibriergerade von Morphin-6-Glucuronid; $r: 0,99733$; Steigung: $773,94 \pm 7,57$.

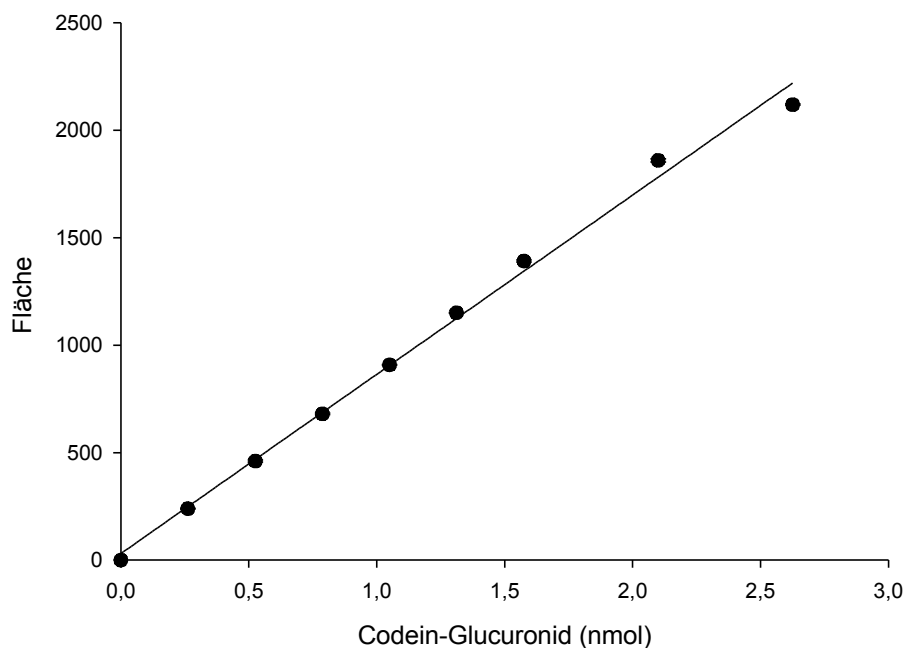


Abbildung 4.27 Kalibriergerade von Codein-Glucuronid; $r: 0,99503$; Steigung: $834,06 \pm 11,46$.

Der Korrelationskoeffizient r lag bei allen Geraden über dem Wert von 0,99. Daher besteht eine gute Korrelation zwischen Peakfläche und der Menge des Glucuronids.

Da die Benzodiazepin-Glucuronide immer erst nach den Opiaten bestimmt wurden, wurde der interne Standard Phenacetin bei der Benzodiazepin-Glucuronid-Bestimmung in die Berechnung miteinbezogen. Für die Bestimmung der Opiat-Glucuronide wurde kein interner Standard verwendet, da diese direkt nach Stoppen der Reaktion (innerhalb von 24 h) bestimmt wurden, und somit zeitabhängige Veränderungen nicht vorlagen.

Die gebildeten Glucuronid-Konzentrationen in den Enzymassays lagen zwischen folgenden Werten:

R-Oxazepam-Glucuronid: 10 pmol-100 pmol

S-Oxazepam-Glucuronid: 25 pmol-220 pmol

R-Temazepam-Glucuronid: 20 pmol-460 pmol

S-Temazepam-Glucuronid: 60 pmol-460 pmol

Morphin-3-Glucuronid: 500 pmol-3000 pmol

Morphin-6-Glucuronid: 100 pmol-1000 pmol

Codein-Glucuronid: 600 pmol-1700 pmol

Alle Werte aus den Messungen befanden sich innerhalb des Kalibrationsbereichs.

4.3.3 Validierung

Selektivität

Zur Überprüfung der Selektivität wurden verschiedene Lösungen hergestellt (Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3, S.38). Nach Vermessen dieser Lösungen konnte eine ausreichende Selektivität festgestellt werden. Die diastereomeren Glucuronide von Oxazepam und Temazepam konnten mit dem gewählten Laufmittel aufgrund der Basislinientrennung nebeneinander detektiert werden.

In den Lösungen ohne Mikrosomen bzw. ohne Substrate oder Co-Substrat konnten keine Glucuronide von Oxazepam, Temazepam, Morphin bzw. Codein nachgewiesen werden. Dadurch konnte belegt werden, dass die Glucuronide nur auf enzymatischem Weg gebildet wurden.

Stabilität

Zur Ermittlung der Stabilität wurden Oxazepam-, Temazepam-, Morphin- und Codein-Glucuronid im Assay (Zusammensetzung s. Tabelle 3.4, S.41) in Triplika an mehreren Tagen gemessen. Die Stabilität der Benzodiazepin-Glucuronide wurde über einen längeren Zeitraum bestimmt, da diese immer nach den Opiat-Glucuroniden in einem separaten Lauf bestimmt wurden. Sie erwiesen sich als bei Raumtemperatur stabile Substanzen. Über fünf Tage nahmen die Konzentrationen an Benzodiazepin-Glucuroniden nicht ab. Die Stabilität der Opiat-Glucuronide wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt. Innerhalb dieses Zeitraums nahm auch ihre Konzentration nicht ab. In der Tabelle 4.14 und Tabelle 4.15 sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt.

Tabelle 4.14 Stabilität der Benzodiazepin-Glucuronide im Assay bei Raumtemperatur ($n = 3$);
OG = Oxazepam-Glucuronid, TG = Temazepam-Glucuronid.

Lagerzeit	R-OG	S-OG	R-TG	S-TG
2 h	98,03 ± 1,05 %	101,13 ± 1,24 %	100,43 ± 1,10 %	100,45 ± 0,88 %
24 h = 1 Tag	97,08 ± 0,88 %	99,84 ± 0,76 %	102,28 ± 0,58 %	98,10 ± 1,52 %
48 h = 2 Tage	98,95 ± 0,37 %	102,11 ± 0,86 %	98,03 ± 0,35 %	98,21 ± 0,44 %
120 h = 5 Tage	98,34 ± 0,67 %	101,02 ± 0,46 %	103,34 ± 1,67 %	98,32 ± 0,61 %

Tabelle 4.15 Stabilität der Opiat-Glucuronide im Assay bei Raumtemperatur ($n = 3$); M3G = Morphin-3-Glucuronid, M6G = Morphin-6-Glucuronid, CG = Codein-Glucuronid.

Lagerzeit	M3G	M6G	CG
2 h	101,23 ± 1,01 %	99,76 ± 1,50 %	98,86 ± 0,83 %
12 h	98,39 ± 0,34 %	103,52 ± 0,19 %	99,40 ± 0,75 %
24 h	98,89 ± 0,52 %	96,89 ± 0,48 %	97,02 ± 0,53 %

Wiederfindung

Für die Untersuchung der Wiederfindung, wurden Lösungen der Opiat-Glucuronide mit allen sich im Assay befindenden Substanzen und Lösungen aus wässrigen Stammlösungen entsprechender Konzentration miteinander verglichen. Die Detektion der Glucuronide wurde nicht durch die restlichen Substanzen gestört. Tabelle 4.16 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.

Tabelle 4.16 Wiederfindung bei der Opiat-Glucuronidbestimmung ($n = 3$).

Substanz	Menge [nmol]	Wiederfindung
Morphin-3-Glucuronid	0,813	100,34 ± 0,48 %
	1,355	101,55 ± 0,73 %
Morphin-6-Glucuronid	0,271	98,05 ± 1,42 %
	0,813	100,73 ± 0,87 %
Codein-Glucuronid	0,525	98,32 ± 0,55 %
	2,625	102,35 ± 1,76 %

Richtigkeit

Durch Messung von Opiat-Glucuronid-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen, konnte die Richtigkeit bestimmt werden. Dabei wurden die Konzentrationen mittels der Kalibrierfunktion berechnet ($Gluc_{calc}$) und mit dem aus zertifiziertem Referenzmaterial bekannten Gehalt ($Gluc_{nom}$) verglichen. Die relative Abweichung lag für alle Glucuronide deutlich unter 10 %. Die Richtigkeit der Messung war somit gewährleistet, da die Abweichung laut CESAR (2003) 15 % nicht übersteigen darf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.17 aufgeführt.

Tabelle 4.17 Richtigkeit mit relativer Abweichung (RE) der Opiat-Glucuronidbestimmung ($n = 4$);
 $Gluc_{calc}$ = aus Kalibrierfunktion berechnete Glucuronidmenge, $Gluc_{nom}$ = aus zertifiziertem Referenzmaterial bestimmte Glucuronidmenge.

Substanz	$Gluc_{nom}$ [nmol]	$Gluc_{calc}$ [nmol]	RE
Morphin-3-Glucuronid	0,813	$0,847 \pm 0,041$	$4,18 \pm 0,32$ %
	1,355	$1,377 \pm 0,064$	$1,63 \pm 0,08$ %
Morphin-6-Glucuronid	0,542	$0,505 \pm 0,052$	$-6,83 \pm 0,52$ %
	0,813	$0,880 \pm 0,073$	$8,24 \pm 0,61$ %
Codein-Glucuronid	1,052	$0,981 \pm 0,082$	$6,75 \pm 0,44$ %
	2,625	$2,684 \pm 0,092$	$2,25 \pm 0,18$ %

Präzision

Die Bestimmung der Präzision erfolgte durch Messung verschiedener Inkubationslösungen an einem Tag (Intraday) und an mehreren Tagen (Interday). Die relative Standardabweichung war bei allen Messungen unter 15 % und entsprach somit den SOP-Leitlinien von CESAR (2003). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.18 und Tabelle 4.19 zusammengefasst.

Tabelle 4.18 Präzision der Benzodiazepin-Glucuronid-Bestimmung; Intraday = Messungen innerhalb eines Tages, Interday = Messungen an verschiedenen Tagen.

Substanz	Menge [pmol]	Intraday		Interday	
		n	RSD	n	RSD
R-Oxazepam- Glucuronid	33	2	4,23 ± 0,13 %	4	2,79 ± 0,31 %
	58	3	2,08 ± 0,05%	6	4,44 ± 0,27 %
S-Oxazepam- Glucuronid	96	2	7,21 ± 0,29 %	4	1,92 ± 0,07 %
	128	3	3,66 ± 0,14 %	6	2,97 ± 0,08 %
R-Temazepam- Glucuronid	51	3	2,12 ± 0,09 %	6	7,32 ± 0,34 %
	146	3	0,93 ± 0,03 %	5	4,36 ± 0,21 %
S-Temazepam- Glucuronid	125	3	3,44 ± 0,20 %	6	3,32 ± 0,12 %
	209	3	1,09 ± 0,04 %	5	1,67 ± 0,05 %

Tabelle 4.19 Präzision der Opiat-Glucuronidbestimmung; Intraday = Messungen innerhalb eines Tages, Interday = Messungen an verschiedenen Tagen.

Substanz	Menge [nmol]	Intraday		Interday	
		n	RSD	n	RSD
Morphin-3- Glucuronid	1,084	2	2,33 ± 0,08 %	4	5,53 ± 0,32 %
	2,167	3	1,05 ± 0,07 %	5	1,90 ± 0,04 %
Morphin-6- Glucuronid	0,542	2	3,64 ± 0,23 %	3	3,28 ± 0,12 %
	0,813	2	1,72 ± 0,05 %	4	4,94 ± 0,21 %
Codein- Glucuronid	1,052	4	4,12 ± 0,18 %	4	1,77 ± 0,04 %
	2,103	2	1,70 ± 0,06 %	6	3,02 ± 0,11 %

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze

Nachweisgrenze, "limit of detection", LOD

Die Nachweisgrenze beschreibt die kleinste nachweisbare Menge/Konzentration. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf mindestens 3:1 festgelegt.

Oxazepam: 2,5 pmol (= 36,6 ng/ml)

Temazepam: 5 pmol (= 75 ng/ml)

Morphin-3-Glucuronid: 7,2 pmol (= 167 ng/ml)

Morphin-6-Glucuronid: 7,2 pmol (= 167 ng/ml)

Codein-Glucuronid: 7 pmol (= 167 ng/ml)

Bestimmungsgrenze, "limit of quantification", LOQ

Die Bestimmungsgrenze beschreibt die kleinste quantifizierbare Menge. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde auf mindestens 9:1 festgelegt.

Oxazepam: 7,5 pmol (= 112,5 ng/ml)

Temazepam: 15 pmol (= 230 ng/ml)

Morphin-3-Glucuronid: 21,7 pmol (= 500 ng/ml)

Morphin-6-Glucuronid: 21,7 pmol (= 500 ng/ml)

Codein-Glucuronid: 2,1 pmol (= 500 ng/ml)

4.4 Entwicklung der Enzymassays mit humanen Lebermikrosomen

4.4.1 Lösungsmittelanteil

Die Stammlösungen der Benzodiazepine wurden in Methanol hergestellt. Dadurch, dass die Benzodiazepine eine schlechte Löslichkeit in wässrigem Medium besitzen, musste zuvor geklärt werden, ab welcher Methanolkonzentration eine Denaturierung der Enzyme erfolgt, d.h. wie hoch die Maximalkonzentration an Methanol in den Inkubationslösungen sein durfte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.20 aufgeführt.

Tabelle 4.20 Anteil an Methanol in den Inkubationslösungen ($n = 3$); OG = Oxazepam-Glucuronid.

Anteil Methanol	R-OG [pmol]	S-OG [pmol]	R-OG [%]	S-OG [%]
1 %	30 ± 1	71 ± 3	$102,0 \pm 2,8$	$102,3 \pm 1,5$
2 %	32 ± 3	68 ± 4	$105,4 \pm 1,7$	$96,3 \pm 1,3$
3 %	30 ± 2	72 ± 5	$101,0 \pm 0,9$	$102,3 \pm 2,9$
5 %	29 ± 2	50 ± 2	$98,7 \pm 2,6$	$71,3 \pm 5,9$
10 %	23 ± 5	17 ± 8	$77,3 \pm 10,5$	$23,9 \pm 13,8$

Eine Konzentration bis zu 3 % Methanol in den Inkubationslösungen hatte keinen Einfluss auf die Glucuronidierung sowohl von R- als auch von S-Oxazepam. Bei einem

Gehalt von 5 % wurde allerdings nur noch ca. 70 % an S-Oxazepam-Glucuronid im Vergleich zu 1 % Methanol gebildet. Die Glucuronidierung von R-Oxazepam dagegen wurde erst ab einer Konzentration von 5 % Methanol relevant beeinflusst, allerdings weniger stark als die von S-Oxazepam. Bei der Herstellung der Inkubationslösungen wurde darauf geachtet, dass maximal 2,5 % Methanol enthalten war.

4.4.2 Stopp-Reaktion

Bevor die wichtigsten Parameter für die Enzymassays optimiert werden konnten, musste eine geeignete Stopp-Reaktion entwickelt werden. Die Enzyme mussten ausreichend inaktiviert werden, um sicher zu stellen, dass die gebildeten Glucuronide ausschließlich während des Inkubationszeitraumes gebildet wurden. In der Zeit zwischen Stoppen der Reaktion und Messung durften keine enzymatischen Aktivitäten mehr vorhanden sein. Ein weiterer wichtiger Punkt war, dass die gebildeten Glucuronide im gewählten Stopp-Reagenz ausreichend stabil waren. Als erster Schritt wurde daher eine geeignete Stopp-Methode zur Bestimmung der Benzodiazepin-Glucuronide entwickelt. Bei dieser Versuchsreihe wurden je drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit 100 μ M Oxazepam oder Temazepam und 5 mM Morphin oder Codein 30 min inkubiert, anschließend das jeweilige Stopp-Reagenz zugesetzt und die Ansätze an der HPLC vermessen (t_1). Nach weiteren 30 min Inkubationszeit wurde erneut gemessen (t_2). Die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung der geeigneten Stopp-Methode sind in Tabelle 4.21 aufgelistet. Dabei wurde jeweils der Mittelwert aus drei Assays gebildet.

Tabelle 4.21 Entwicklung der Stopp-Methode für die Benzodiazepinassays; R-Oxazepam-Glucuronid (R-OG), S-Oxazepam-Glucuronid (S-OG), R-Tamazepam-Glucuronid (R-TG) und S-Tamazepam-Glucuronid (S-TG); 1. Messung nach 30 min (t_1), 2. Messung nach weiteren 30 min (t_2).

Stopp-Methode	pmol/mg							
	R-OG		S-OG		R-TG		S-TG	
	t_1	t_2	t_1	t_2	t_1	t_2	t_1	t_2
HClO ₄	341 ± 17	241 ± 10	1050 ± 41	885 ± 32	698 ± 32	578 ± 37	1257 ± 77	1056 ± 89
HCl	454 ± 22	468 ± 21	1394 ± 29	1423 ± 52	922 ± 40	935 ± 51	1755 ± 84	1734 ± 96
CH ₃ OH	475 ± 28	500 ± 9	1395 ± 36	1464 ± 33	923 ± 68	968 ± 53	1672 ± 72	1703 ± 54
CH ₃ CN	489 ± 17	470 ± 15	1361 ± 43	1480 ± 48	963 ± 43	911 ± 31	1781 ± 94	1839 ± 76

Bis auf die Stopp-Methode mit 7 %iger Perchlorsäure, bei der der Gehalt an Benzodiazepin-Glucuroniden schon nach 30 min stark abnahm, schienen alle anderen Methoden gleichermaßen geeignet. Für die Bestimmung der enzymkinetischen Daten der Benzodiazepin-Glucuronide wurde Acetonitril verwendet. Diese Stopp-Methode wurde ebenfalls bei den Inhibitionsversuchen mit den Opiaten angewendet. Da aber die

Peakfläche der Morphin-Glucuronide mit zugesetztem Acetonitril stark abnahm, wurden erneut die Stopp-Methoden zur Bestimmung aller Glucuronide getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.22 aufgeführt.

Tabelle 4.22 Entwicklung der Stopp-Methode für Inhibitionsversuche; Morphin-3-Glucuronid (M3G), Morphin-6-Glucuronid (M6G) und Codein-Glucuronid (CG); 1. Messung nach 30 min (t_1), 2. Messung nach weiteren 30 min (t_2).

Stopp-Methode	nmol/mg					
	M3G		M6G		CG	
	t_1	t_2	t_1	t_2	t_1	t_2
HCl	$5,3 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,08$	$3,2 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$
CH ₃ OH	$5,4 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,09$	$3,1 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$
CH ₃ CN	$2,1 \pm 0,07$	$1,9 \pm 0,08$	$0,6 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,09$

0,1 N HCl schien als Stopp-Reagenz geeignet zu sein, allerdings mussten die Benzodiazepin-Glucuronide mindestens 1 Woche stabil bleiben, da sie mit einem anderen Laufmittel nach den Opiat-Glucuroniden mittels HPLC analysiert wurden. Die Benzodiazepin-Glucuronide sind im sauren Medium nicht über einen längeren Zeitraum stabil. Nach einer Woche war nur noch zwischen 68-91 % an Glucuronid nachweisbar. Für die Inhibitionsstudien wurde deshalb Methanol als Stopp-Reagenz verwendet. Eine weitere Probenaufarbeitung war nicht notwendig, da die Glucuronide direkt aus der Inkubationslösung analysiert werden konnten.

4.4.3 Inkubationszeit

In dieser Versuchsreihe wurden jeweils drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit einer Substrat-Konzentration von 100 μ M Oxazepam oder 100 μ M Temazepam 0 - 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde direkt nach Zugabe der Mikrosomen die Reaktion mit Acetonitril gestoppt. In dieser Zeit wurden keine detektierbaren Mengen Oxazepam- oder Temazepam-Glucuronid gebildet. In allen anderen Assays waren beide diastereomeren Glucuronide von Temazepam und Oxazepam entstanden. Nach hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Bestimmung wurden die Konzentrationen der Glucuronide in pmol/mg Enzym gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Exemplarisch soll hier das Diagramm von S-Oxazepam (Abbildung 4.28) gezeigt werden. Die übrigen Diagramme sind im Anhang abgebildet (Abbildung 10.95 - Abbildung 10.97, S.191).

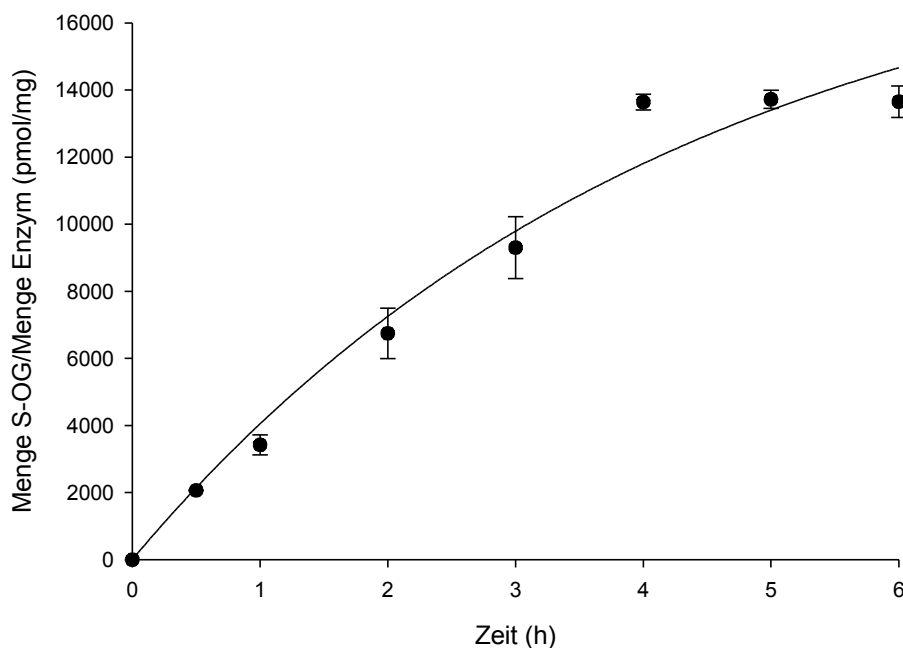


Abbildung 4.28 Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Zeit.

Alle Diagramme zeigen einen typischen zeitlichen Verlauf. Nach vier- bis fünfstündiger Inkubation wird keine relevante Menge des jeweiligen Glucuronids mehr gebildet. Bei der Auswahl der Inkubationszeit war entscheidend, dass sich genügend vom jeweiligen Glucuronid bildet und der Verlauf der Glucuronid-Bildung noch weitgehend linear ist. Dadurch, dass die Benzodiazepine als Racemate eingesetzt werden und somit diastereomere Glucuronide in unterschiedlichem Verhältnis gebildet werden, entsteht z.B. vom R-Oxazepam-Glucuronid sehr wenig. Die Glucuronide müssen aber ausreichend gut an der HPLC detektierbar und quantifizierbar sein. Die beste Korrelation von Linearität und einer gut zu quantifizierenden Menge an Glucuronid wurde bei 4 Stunden Inkubationszeit erreicht. Deshalb wurden alle Assays über 4 Stunden inkubiert.

4.4.4 pH-Optimum

Bei dieser Versuchsreihe sollte das pH-Optimum der UDP-Glucuronyltransferasen bei einer Temperatur von 37 °C ermittelt werden. Dazu wurden drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit einer Konzentration von 100 µM Oxazepam oder 100 µM Temazepam bei verschiedenen pH-Werten (6,0 - 11,0) mit drei verschiedenen Puffern 4 Stunden inkubiert. Die Menge an Glucuronid in pmol, die pro Minute von 1 mg Protein gebildet wurde, entspricht der Umsatzgeschwindigkeit. Diese wurde gegen den pH-Wert des jeweiligen Puffers aufgetragen und graphisch dargestellt. Das daraus resultierende Diagramm bei der Umsetzung von R-Oxazepam ist in Abbildung 4.29 zu sehen. Die weiteren Diagramme sind im Anhang abgebildet (Abbildung 10.98 - Abbildung 10.100, S.192)

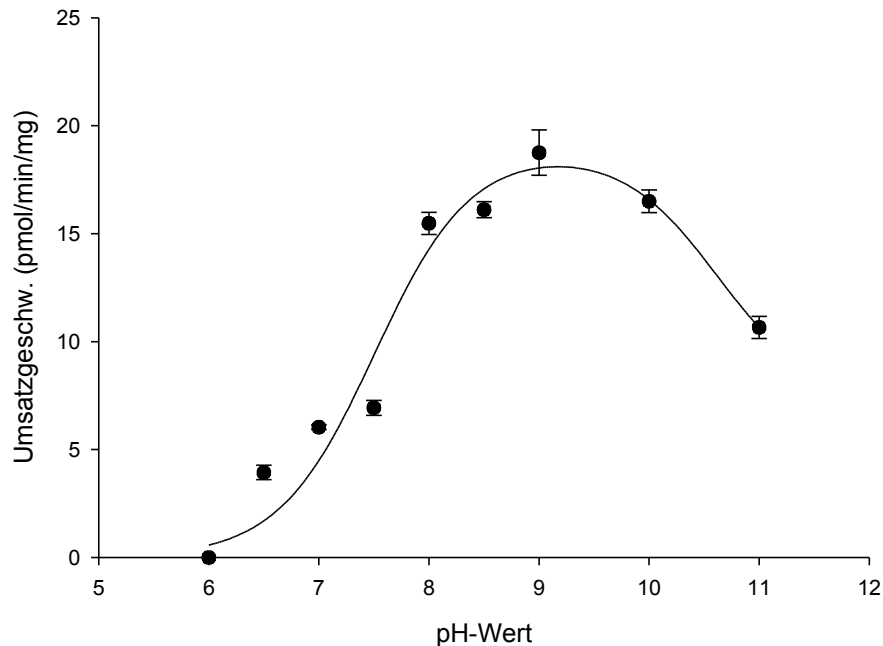


Abbildung 4.29 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Alle Diagramme zeigen einen glockenförmigen Verlauf. Das Maximum der pH-Kurve liegt bei allen Diagrammen bei pH 9,0, d.h. bei diesem pH ist die Umsatzgeschwindigkeit am größten. Bei dem in dieser Versuchsreihe niedrigsten pH-Wert von 6,0 konnte keine Glucuronid-Konzentration gemessen werden. Die Umsatzgeschwindigkeit liegt hier also bei 0 pmol/min/mg. Um aber in einem physiologischen Bereich zu arbeiten und eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien aus der Literatur zu erreichen, wurden alle Assays bei pH 7,4 durchgeführt. Da die Opiate mit steigendem pH-Wert eine schlechtere Löslichkeit zeigten, konnten die Inhibitionsstudien mit den Opiaten nur bei pH 7,4 durchgeführt werden.

4.4.5 Temperatur-Optimum

Da Enzyme neben dem pH-Optimum auch ein Temperatur-Optimum besitzen, sollte hier die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Glucuronidierung näher untersucht werden. Dazu wurden drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit einer Konzentration von 100 μ M Oxazepam oder 100 μ M Temazepam mit Tris-Puffer 100 mM bei pH 7,4 bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die Umsatzgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Exemplarisch soll hier die Umsetzung von R-Oxazepam gezeigt werden (Abbildung 4.30). Die weiteren Diagramme sind im Anhang abgebildet (Abbildung 10.101 - Abbildung 10.103, S.193).

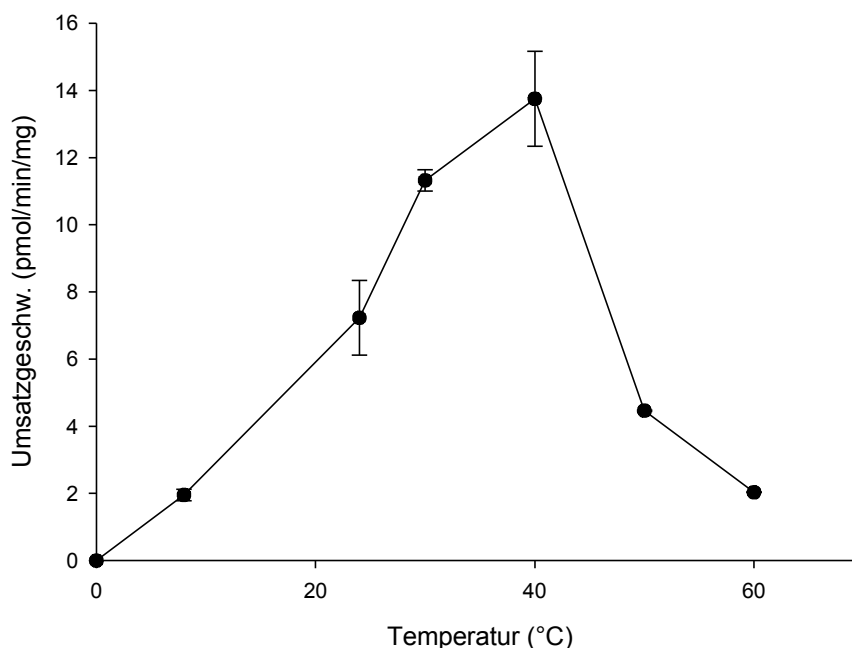


Abbildung 4.30 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.

Auch die Temperatur-Kurven zeigen alle einen glockenförmigen Verlauf. Das Maximum ist je nach Substanz unterschiedlich, liegt aber zwischen um die 40 °C. Der Anstieg der Kurven verläuft flacher als der Abfall nach Durchlaufen des Maximums.

In dieser Versuchsreihe entspricht das Temperaturoptimum der UDP-Glucuronyltransferasen ungefähr den physiologischen Bedingungen. Deshalb wurden alle Inkubationen bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt.

4.4.6 UDPGA-Konzentration

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.1.3 (S.3) dargestellt, wurden in den Studien aus der Literatur verschiedene Konzentrationen des Co-Substrates UDPGA eingesetzt. Mit dieser Versuchsreihe sollte bestimmt werden, bei welcher UDPGA-Konzentration der höchstmögliche Umsatz der Benzodiazepine stattfindet, und ob zu hohe Konzentrationen hemmend auf die Glucuronidierung der Benzodiazepine wirken könnten. Dazu wurden je drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit einer UDPGA-Konzentrationen von 0-16 mM bei einer konstanten Benzodiazepin-Konzentration von 100 μ M Oxazepam oder 100 μ M Temazepam vier Stunden inkubiert. Nach Bestimmung der Glucuronid-Konzentration wurde die Umsatzgeschwindigkeit gegen die UDPGA-Konzentration aufgetragen. Das Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm von der Umsetzung mit R-Oxazepam ist in Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32 dargestellt. Die Diagramme der übrigen Umsetzungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 10.104 - Abbildung 10.109, S.194 - S.196).

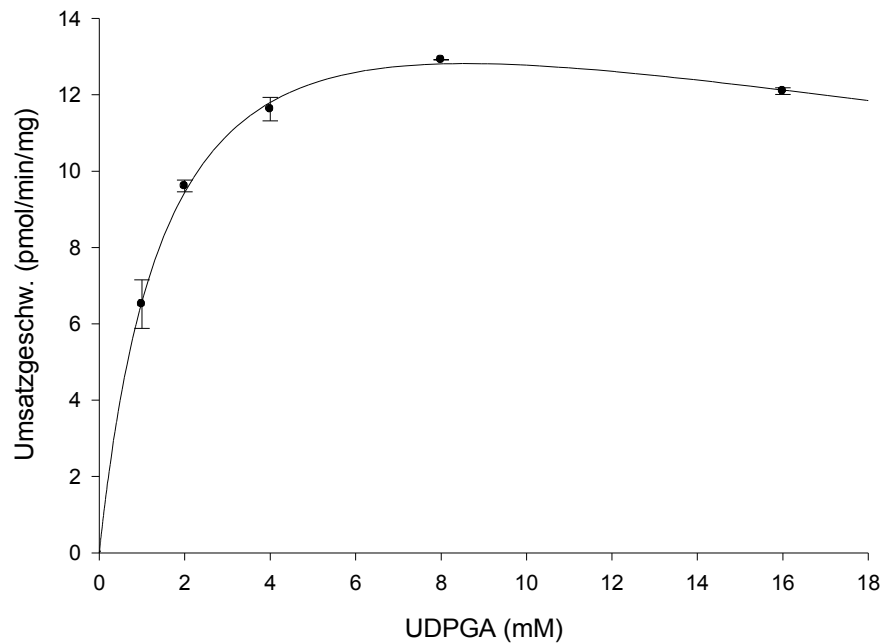


Abbildung 4.31 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *R*-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.

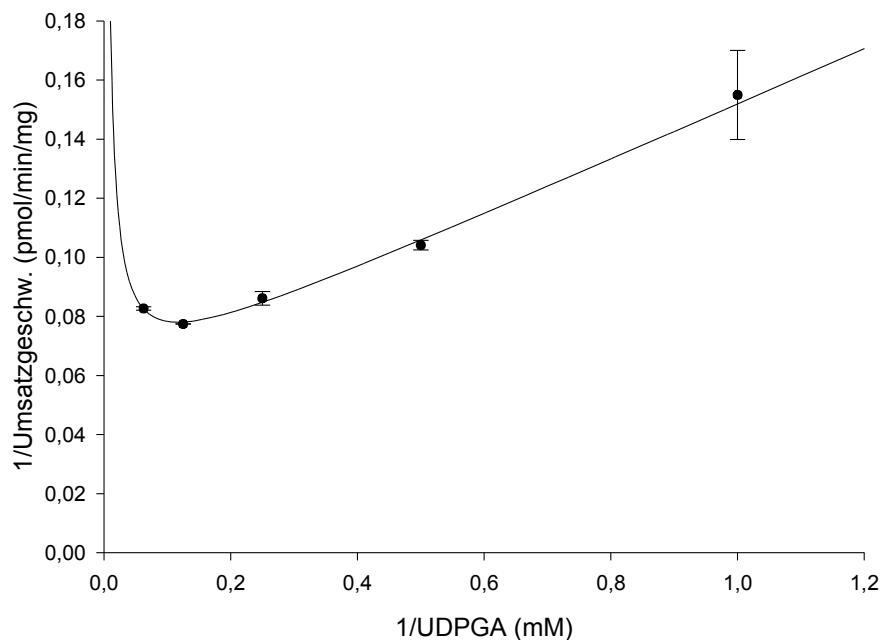


Abbildung 4.32 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *R*-Oxazepam in Abhängigkeit der UDPGA-Konzentration, dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.

Die Ergebnisse aller Umsetzungen zeigen, dass eine Co-Substrathemmung vorliegt. Bis zu einer UDPGA-Konzentration von 8 mM (Abbildung 4.31) steigt der Kurvenverlauf im Michaelis-Menten-Diagramm an. Bei einer höheren Konzentration kommt es zu keiner weiteren Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit bzw. der Umsatz wird durch eine zu hohe Konzentration an Co-Substrat gehemmt. Dies zeigt sich in den Michaelis-

Menten-Diagrammen dadurch, dass die Kurve nicht weiter ansteigt (Co-Substratsättigung) bzw. leicht abfällt (Co-Substrathemmung). Das Lineweaver-Burk-Diagramm der Umsetzung von R-Oxazepam mit UDPGA zeigt den typischen Verlauf einer Substrathemmung. Für die Umsetzungen wurde daher eine Konzentration von 8 mM UDPGA gewählt. In der Tabelle 4.23 sind die K_m -Werte und Umsatzgeschwindigkeiten für UDPGA mit (R,S)-Oxazepam und (R,S)-Temazepam zusammengestellt.

Tabelle 4.23 Enzymkinetische Parameter K_m und V_{max} von der Umsetzung mit UDPGA und den Substraten (R,S)-Oxazepam und (R,S)-Temazepam.

Substrat	K_m [mM]	V_{max} [pmol/min/mg]
R-Oxazepam	$1,7 \pm 0,27$	18 ± 1
S-Oxazepam	$0,4 \pm 0,09$	34 ± 2
R-Temazepam	$2,9 \pm 0,40$	40 ± 3
S-Temazepam	$0,8 \pm 0,26$	66 ± 7

4.4.7 K_m und V_{max} beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam

In dieser Versuchsreihe wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} für R- und S-Oxazepam und R- und S-Temazepam ermittelt. Dazu wurden drei Assays gleicher Zusammensetzung (Tabelle 3.4, S.41) mit zwei verschiedenen Chargen von Mikrosomen (Charge 28 und Charge 41207) mit Oxazepam oder Temazepam in steigender Konzentration 4 Stunden inkubiert. Von besonderem Interesse hierbei war, wie sich die jeweiligen Enantiomere unterscheiden und ob die Stereochemie einen Einfluss auf das Ausmaß der Glucuronidierung besitzt. Es sollte ebenfalls geklärt werden, ob eine Sättigungskinetik oder eine Substrathemmung bei der Glucuronidierung der jeweiligen Enantiomere auftritt. Die Umsatzgeschwindigkeiten bei den jeweiligen Konzentrationen der Benzodiazepine wurden ermittelt und im Michaelis-Menten-Diagramm (Abbildung 4.33 und Abbildung 4.34) und im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 4.35 - Abbildung 4.38) graphisch dargestellt. Dabei wurde immer die Konzentration des Racemats von Oxazepam und Temazepam aufgetragen (Diskussion 5.4.2, S.134).

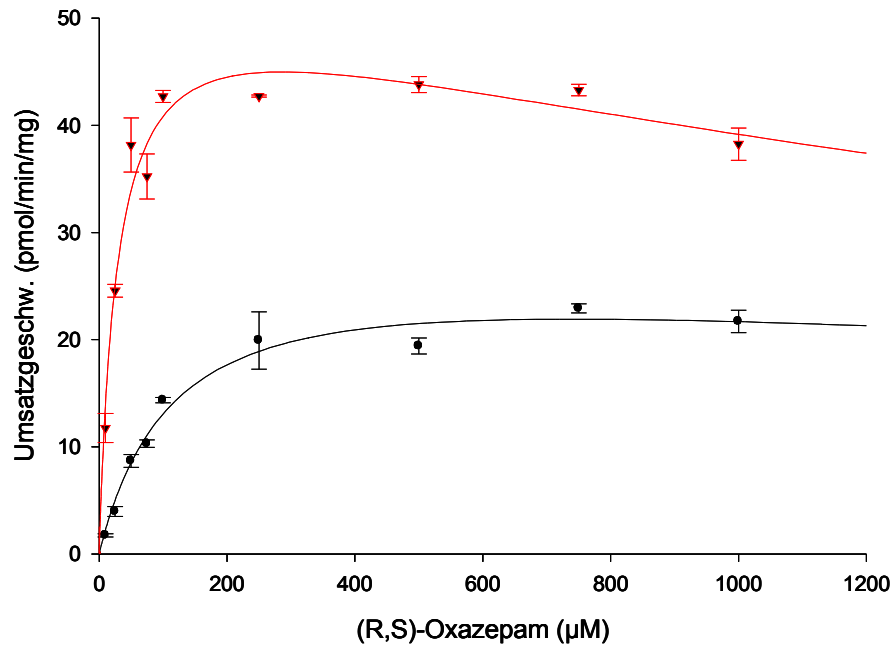


Abbildung 4.33 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam (●) und S-Oxazepam (▼) in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Michaelis-Menten-Diagramm.

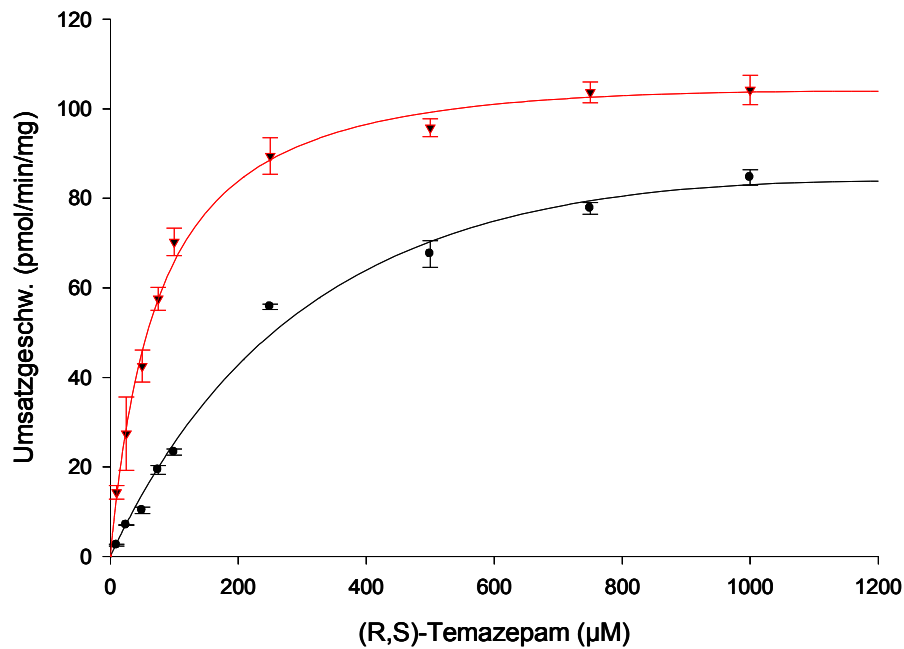


Abbildung 4.34 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam (●) und S-Temazepam (▼) in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Michaelis-Menten-Diagramm.

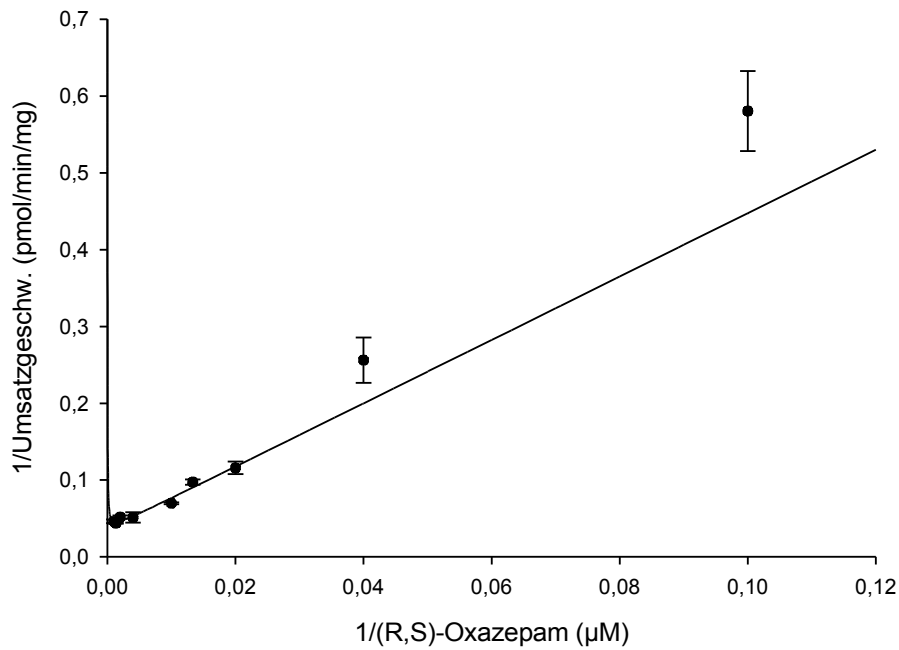


Abbildung 4.35 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.

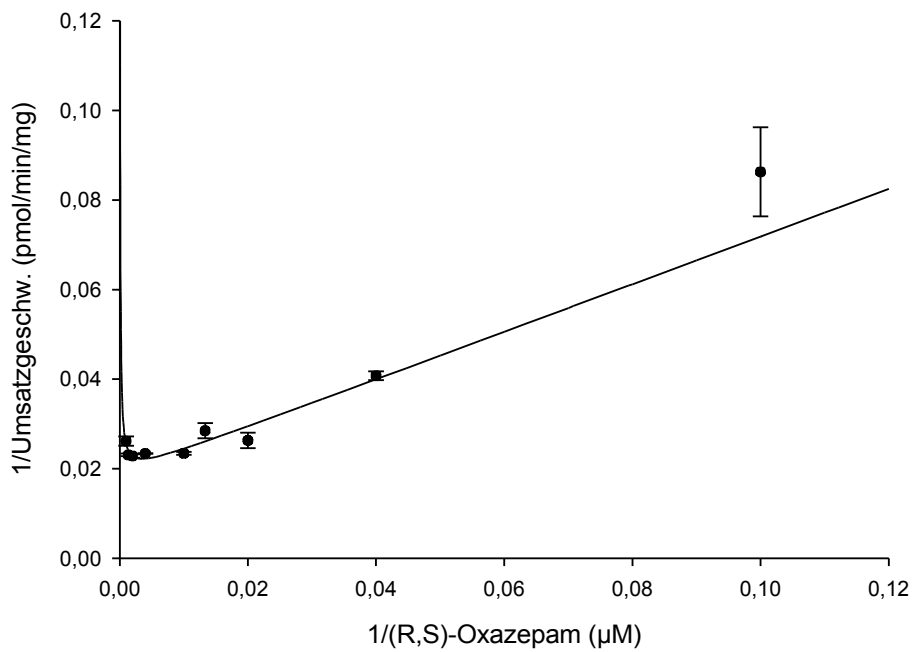


Abbildung 4.36 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.

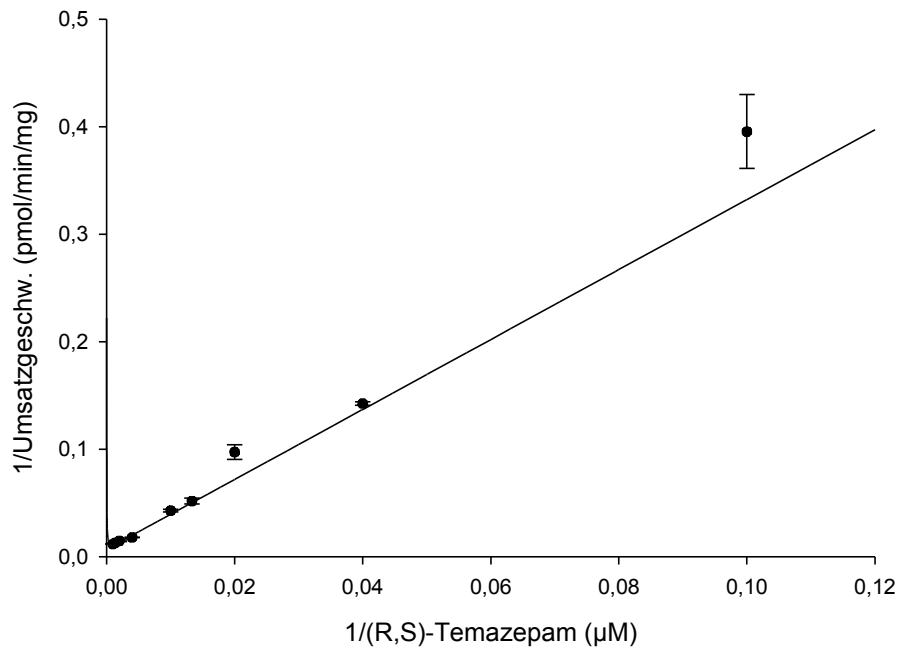


Abbildung 4.37 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.

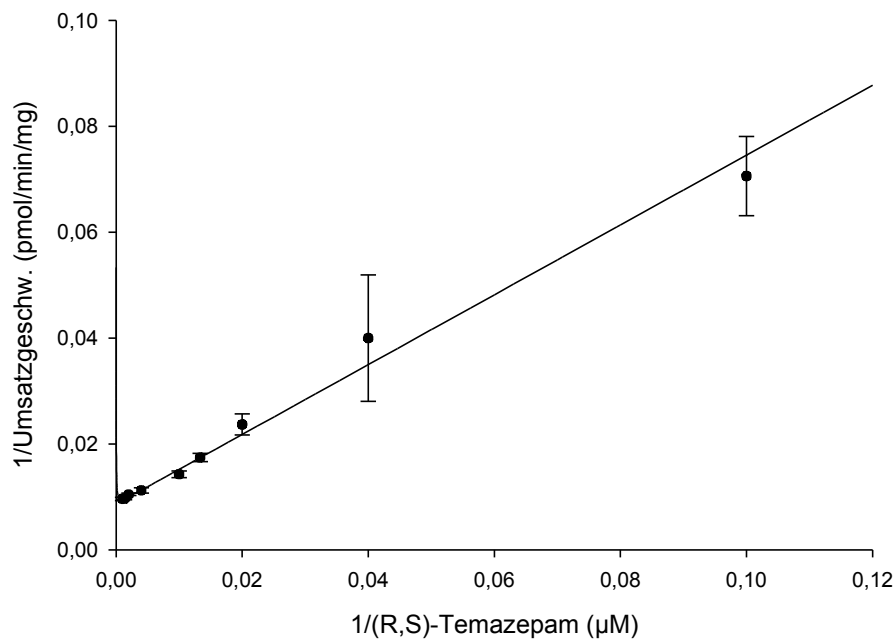


Abbildung 4.38 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Temazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.

Sowohl das Michaelis-Menten-Diagramm als auch das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Umsetzung von S-Oxazepam zeigt den typischen Verlauf einer Substrathemmung. Die Kurve im Michaelis-Menten-Diagramm steigt bis zu einer bestimmten Konzentration stetig an, dann lässt sich die Umsatzgeschwindigkeit nicht weiter steigern und die Kurve fällt wieder leicht ab. Dass eine Substrathemmung vorliegt, wird besonders im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 4.36) deutlich. Allerdings könnte es sich auch um eine Produkthemmung handeln, bei der das Lineweaver-Burk-

Diagramm gleich aussieht. Die Diagramme der Umsetzung von S-Temazepam zeigen nicht eindeutig, dass es sich um eine Substrat- bzw. Produkthemmung handelt, aber sowohl r^2 als auch der AIC_c -Wert sprechen für das Modell der Substrathemmung. Die Umsetzungen von R-Oxazepam und R-Temazepam werden am besten durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. In der folgenden Tabelle sind die K_m und V_{max} -Werte mit beiden Mikrosomenchargen dargestellt.

Tabelle 4.24 Enzymkinetische Daten der Enantiomere von Oxazepam und Temazepam mit zwei Mikrosomenchargen ($n = 3$).

Substrat [μM]	K_m [μM]	V_{max} [pmol/min/mg]
R-Oxazepam (Charge 28)	120 ± 33	26 ± 3
R-Oxazepam (Charge 41207)	119 ± 24	29 ± 4
S-Oxazepam (Charge 28)	29 ± 5	54 ± 3
S-Oxazepam (Charge 41207)	37 ± 10	40 ± 4
R-Temazepam (Charge 28)	336 ± 38	114 ± 5
R-Temazepam (Charge 41207)	370 ± 95	111 ± 12
S-Temazepam (Charge 28)	77 ± 13	117 ± 9
S-Temazepam (Charge 41207)	83 ± 8	85 ± 2

Wie in Tabelle 4.24 zu sehen ist, haben die S-Enantiomere der untersuchten Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam eine stärkere Affinität zu den UGTs, was durch einen kleineren K_m -Wert gekennzeichnet ist. Den niedrigsten K_m -Wert hat S-Oxazepam mit 29 ± 5 bzw. $37 \pm 10 \mu\text{M}$. Einen etwas höheren K_m -Wert besitzt S-Temazepam. Die geringste Affinität zu den UGTs hat R-Temazepam, was sich im höchsten K_m -Wert widerspiegelt.

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist dagegen für Temazepam sehr viel höher als für Oxazepam. Sie liegt für beide Enantiomere von Temazepam in einem ähnlichen Bereich. Die Umsatzgeschwindigkeit für S-Oxazepam ist dagegen höher als die von R-Oxazepam. Vergleicht man dagegen die beiden Mikrosomenchargen fällt auf, dass Charge 28 bei allen Umsetzungen mit der Ausnahme R-Oxazepam höhere Umsatzgeschwindigkeiten liefert als Charge 41207, d.h. dass die Enzymaktivität dieser Charge etwas höher ist.

In dieser Versuchreihe wurde ebenfalls Lorazepam in denselben Konzentrationen wie Oxazepam und Temazepam eingesetzt. Zwar konnte ein Umsatz zu R- und S-Lorazepam-Glucuronid erfasst werden, dieser war aber so gering, dass die Glucuronide nicht quantifiziert werden konnten. Somit war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich mit dem für Oxazepam und Temazepam optimierten Enzymassay

enzymkinetische Daten für Lorazepam zu ermitteln. In Vorversuchen mit Lormetazepam konnte ein höherer Umsatz zu den Lormetazepam-Glucuroniden als zu den Lorazepam-Glucuroniden erfasst werden. Eine Quantifizierung war allerdings aufgrund der fehlenden Basislinientrennung bei der HPLC-Bestimmung mit dem Benzodiazepin-Laufmittel nicht möglich. Deshalb wurden weder Lorazepam noch Lormetazepam in den Inhibitionsversuchen mit den Opiaten eingesetzt.

Aufgrund der in dieser Versuchsreihe ermittelten K_m -Werte, bzw. der ermittelten Substrathemmung für die S-Enantiomere ab unterschiedlichen Konzentrationen für S-Oxazepam und S-Temazepam war es notwendig bei den Inhibitionsversuchen unterschiedliche Konzentrationen für Oxazepam und Temazepam einzusetzen. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass eine Konzentration unterhalb des ermittelten K_m -Wertes, eine im Bereich des K_m -Werts und eine über diesem Wert lag. Bei Oxazepam und Temazepam handelt es sich aber um jeweils zwei Enantiomere, die als Racemat eingesetzt wurden und sehr unterschiedliche K_m -Werte besitzen. Daher wurden bei den Inhibitionsversuchen vier verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Wie aus den Michaelis-Menten-Diagrammen (Abbildung 4.33, S.87 und Abbildung 4.34, S.87) ersichtlich ist, trat bei Oxazepam im Vergleich zu Temazepam schon bei niedrigerer Konzentration eine Substratinhibition auf. Bei S-Oxazepam sank bei einer Konzentrationserhöhung über 250 μM die Umsatzgeschwindigkeit ab. Für die Inhibitionsversuche mit Oxazepam wurden daher die Konzentrationen 25, 50, 100 und 250 μM gewählt. Für Temazepam wurden die Konzentrationen 50, 100, 250 und 500 μM eingesetzt.

4.4.8 Zusammenfassung

Durch die vorhergehenden Versuche wurden enzymkinetische Daten zur Glucuronidierung von Oxazepam und Temazepam gewonnen und die Versuchsbedingungen hinsichtlich Lösungsmittelkonzentration, Inkubationszeit, Inkubationstemperatur, Co-Substratkonzentration und Substratkonzentration optimiert. Auch das pH-Optimum wurde bestimmt. Sowohl die Bestimmungen der enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m als auch die Wechselwirkungsstudien der Benzodiazepine mit den Opiaten erfolgten unter optimierten Bedingungen für die Glucuronidierung der Benzodiazepine. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C und einer UDPGA-Konzentration von 8 mM. Die Bestimmung der K_m und V_{\max} -Werte erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 10-1000 μM . Dadurch konnten die Konzentrationen von 25, 50, 100 und 250 μM für Oxazepam und von 50, 100, 250 und 500 μM für Temazepam für die Wechselwirkungsstudien ausgewählt werden. Der pH-Wert des Inkubationsmediums betrug 7,4 und entsprach somit nicht dem pH-Optimum der UGTs, wurde aber bewusst so gewählt, um im physiologischen Bereich zu arbeiten. Unter diesen Bedingungen wurden alle Inhibitionsversuche mit den Opiaten Morphin und Codein und den Benzodiazepinen Oxazepam und Temazepam durchgeführt.

4.5 UGT-Isoformen

4.5.1 Isoformen-Screening

In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, welche Isoformen der UGTs an der Glucuronidierung von R- und S-Temazepam beteiligt sind. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Isoformen (s. Experimenteller Teil 3.7.1, S.42) mit zwei verschiedenen Konzentrationen (100 und 1000 μM) Temazepam inkubiert. In Abbildung 4.39 und Abbildung 4.40 ist das Screening der Isoformen für Temazepam dargestellt. Beide Konzentrationen wurden ebenfalls mit Mikrosomen der Charge 41207 inkubiert.

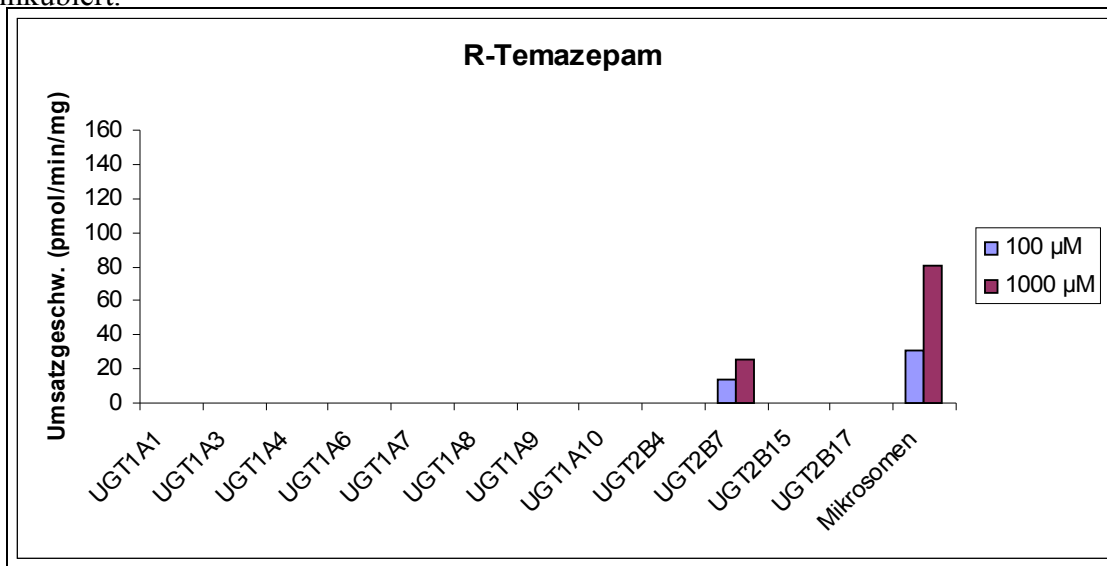


Abbildung 4.39 Screening von R-Temazepam mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen sowie Mikrosomen der Charge 41207.

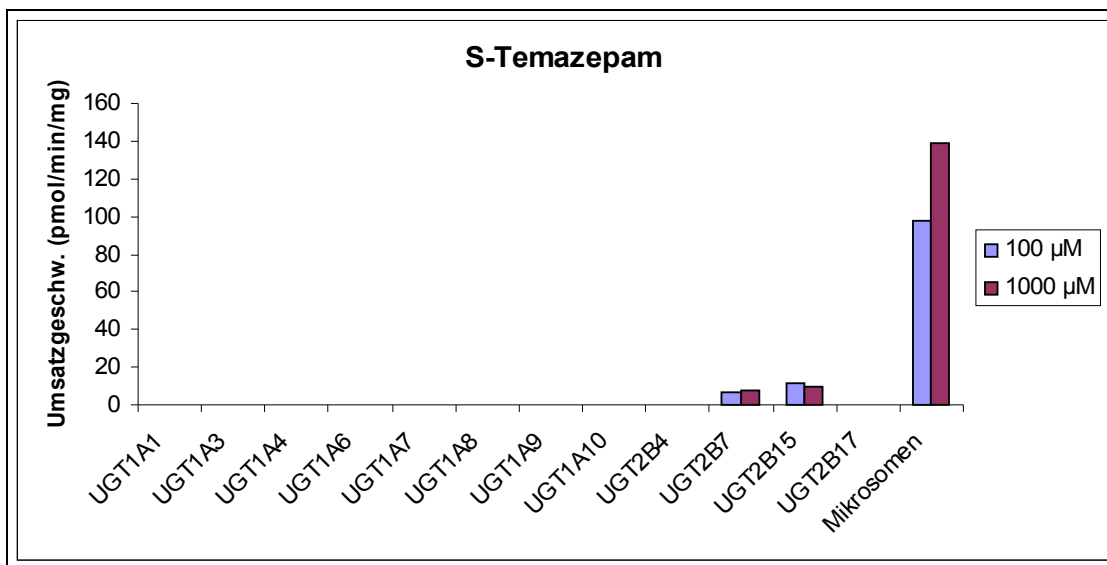


Abbildung 4.40 Screening von S-Temazepam mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen sowie Mikrosomen der Charge 41207.

Wie Abbildung 4.39 und Abbildung 4.40 zeigen, setzt die Isoform UGT2B7 sowohl R- als auch S-Temazepam um. Bei allen anderen Isoformen konnte keine messbare Glucuronid-Konzentration bestimmt werden. S-Temazepam wird zusätzlich von der Isoform UGT2B15 umgesetzt.

4.5.2 UGT2B7

Temazepam wurde in den Konzentrationen 50, 100, 250, 500 und 1000 μM in Vierfachmessungen mit UGT2B7 umgesetzt. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Abbildung 4.41 - Abbildung 4.44 dargestellt.

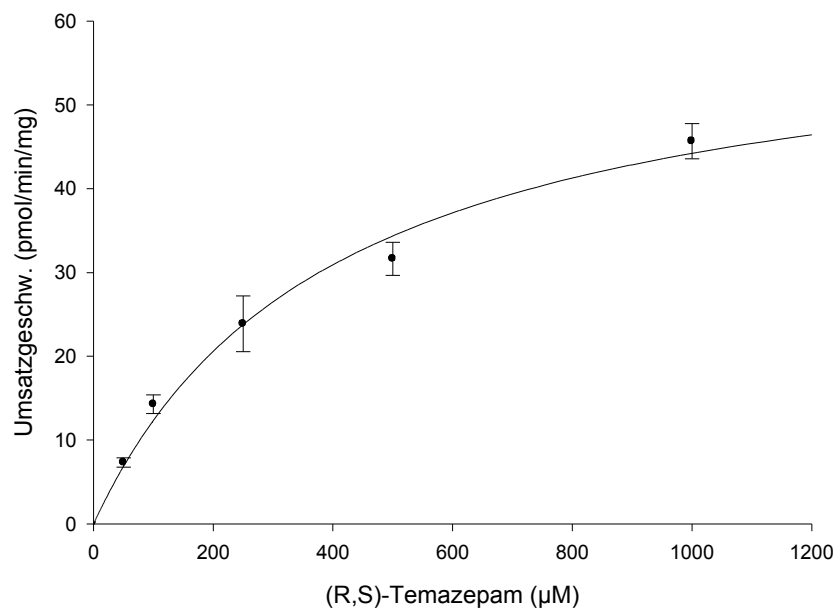


Abbildung 4.41 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam mit UGT2B7 im Michaelis-Menten-Diagramm.

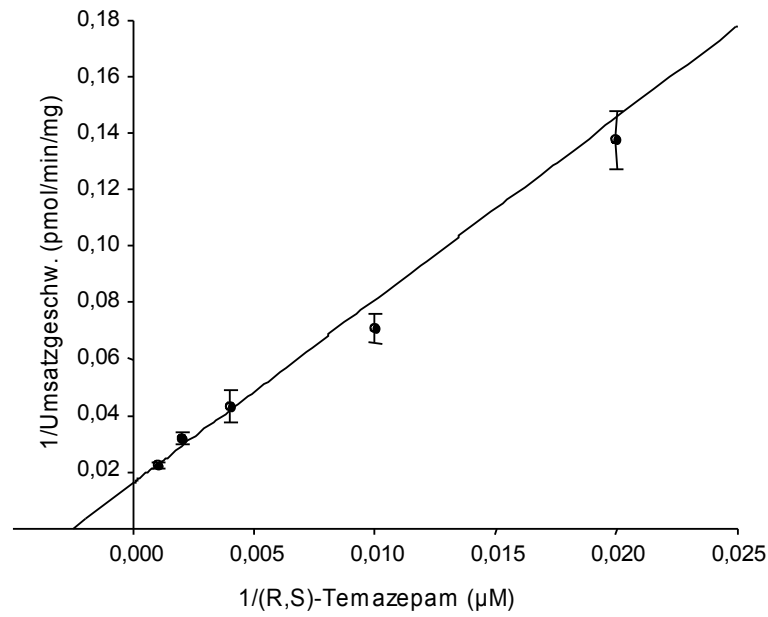


Abbildung 4.42 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam mit UGT2B7 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,941, K_m : $402 \pm 88 \mu\text{M}$, V_{max} : $62 \pm 6 \text{ pmol/min/mg}$.

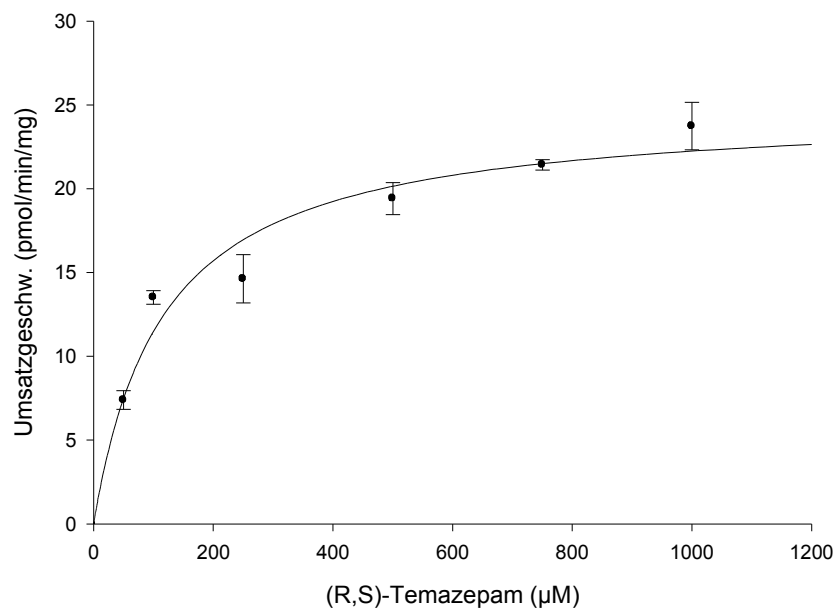


Abbildung 4.43 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B7 im Michaelis-Menten-Diagramm.

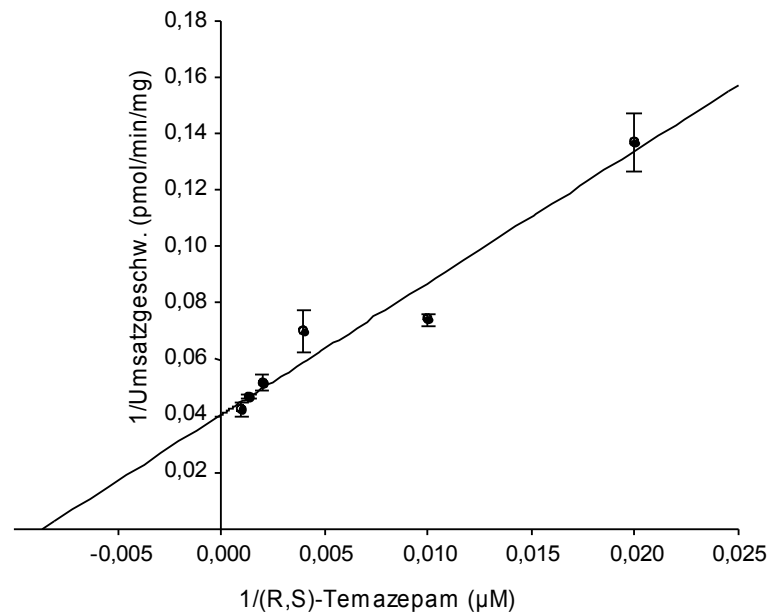


Abbildung 4.44 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B7 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,878, K_m : $116 \pm 22 \mu\text{M}$, V_{max} : $25 \pm 1 \text{ pmol/min/mg}$.

4.5.3 UGT2B15

Temazepam wurde in den Konzentrationen 50, 100, 250, 500 und 1000 μM weiterhin mit der Isoform UGT2B15 umgesetzt. Auch diese Isoform wurde in einer Menge von 100 μg pro Assay eingesetzt. Wie sich schon in den Vorversuchen mit den Konzentrationen 100 und 1000 μM zeigte, wird R-Temazepam nicht von dieser Isoform umgesetzt. In Abbildung 4.45 und Abbildung 4.46 ist das Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramm für die Umsetzung von S-Temazepam mit UGT2B15 dargestellt.

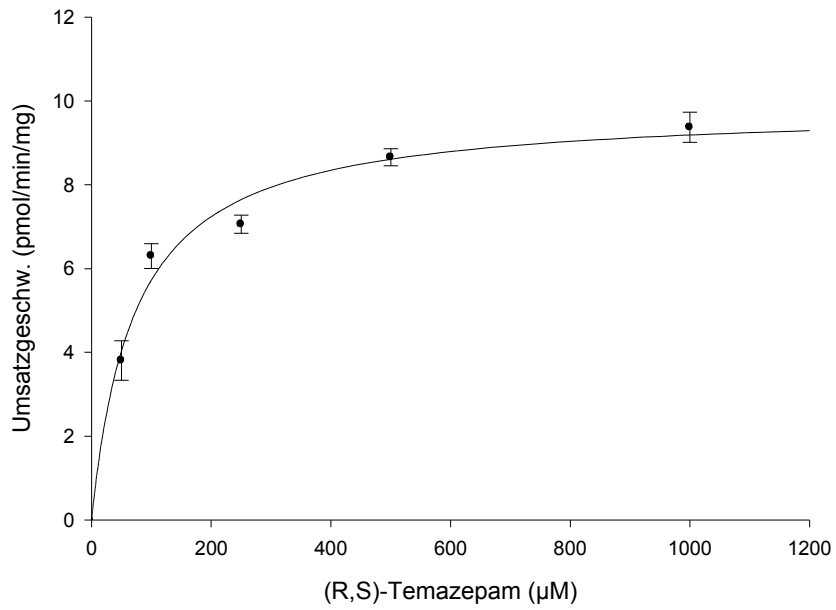


Abbildung 4.45 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Temazepam mit UGT2B15 im Michaelis-Menten-Diagramm.

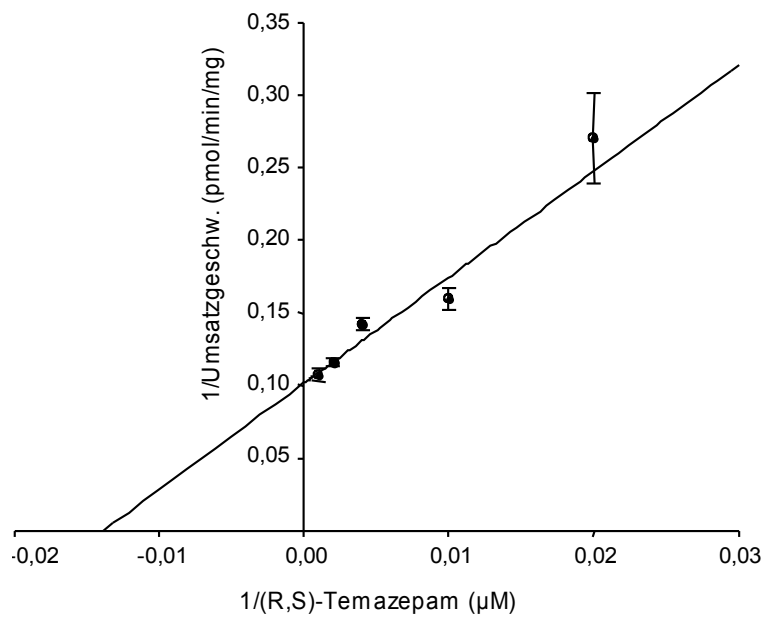


Abbildung 4.46 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Temazepam mit UGT2B15 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,910, K_m : $72 \pm 11 \mu\text{M}$, V_{max} : $10 \pm 0,4 \text{ pmol/min/mg}$.

4.5.4 Zusammenfassung

Bei der Umsetzung von (R,S)-Temazepam mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen zeigte nur die Isoform UGT2B7, dass sie sowohl R- als auch S-Temazepam umsetzt. UGT2B15 katalysiert nur die Umsetzung von S-Temazepam. Für die Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B15 gibt das Michaelis-Menten-Modell die Daten am besten wieder, was sich im höchsten r^2 und niedrigsten AIC_c -Wert zeigte. Für S-Temazepam beträgt der K_m -Wert $72 \pm 11 \mu\text{M}$ und V_{\max} $10 \pm 0,4 \text{ pmol/min/mg}$. Bei der Umsetzung sowohl von R- als auch von S-Temazepam mit der Isoform UGT2B7 war die Kurvenanpassung aller Daten ebenfalls für das Michaelis-Menten-Modell am besten, was sich im höchsten Wert für r^2 und im niedrigsten AIC_c -Wert bei beiden Umsetzungen zeigte. Für R-Temazepam konnte ein K_m -Wert von $402 \pm 88 \mu\text{M}$ und ein V_{\max} von $62 \pm 6 \text{ pmol/min/mg}$ ermittelt werden, und für die Glucuronidierung von S-Temazepam ergab sich ein K_m -Wert von $116 \pm 22 \mu\text{M}$ sowie eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $25 \pm 1 \text{ pmol/min/mg}$. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit für die Umsetzung mit UGT2B15 war fast um das dreifache niedriger als bei der Umsetzung mit UGT2B7.

4.6 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten

Die Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam wurden zusammen mit den Opiaten Morphin oder Codein inkubiert. Aus den gebildeten Mengen an diastereomeren Glucuroniden (R-Oxazepam-Glucuronid, S-Oxazepam-Glucuronid, R-Temazepam-Glucuronid und S-Temazepam-Glucuronid) wurden die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten berechnet und diese gegen die eingesetzte Konzentration an Benzodiazepin im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Damit konnte die Enzymhemmung durch die Opiate graphisch dargestellt, der jeweilige Hemmtyp ermittelt und die K_i -Werte der Opiate bestimmt werden. Dazu wurde das Programm Enzyme Kinetics Module 1.1/Sigma Plot 2001 von SPSS Science verwendet (s. Abschnitt 3.10 Enzymkinetische Auswertung, S.45). Bei der Kurvenanpassung (s. Abschnitt 3.10.2, S.46) sollte die bestmögliche Anpassung aller Daten erfolgen, weshalb nicht jeder ermittelte Messpunkt auf einer Kurve oder Geraden liegen kann. Durch gleichzeitige Messung der Opiat-Glucuronide (Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid bzw. Codein-Glucuronid) konnte ebenfalls der Einfluss der Benzodiazepine auf die Glucuronidierung der Opiate gemessen werden. Auch hier erfolgte eine Umrechnung in die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten und die graphische Darstellung in den Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagrammen. Anhand des Kurvenverlaufs konnten die K_i -Werte und die Hemmtypen, ebenfalls mit dem oben genannten Programm bestimmt werden.

Da die eingesetzten Benzodiazepin-Konzentrationen an vier verschiedenen Punkten der Substratsättigungskurve lagen (für Oxazepam 25, 50, 100 und 250 μM und für Temazepam 50, 100, 250 und 500 μM), war der Verlauf der Enzymhemmung im

Michaelis-Menten-Diagramm sehr deutlich zu erkennen. Die Sättigungskurven unter Einwirkung der Opiate verliefen flacher und lagen unterhalb der Kurve der ungehemmten Reaktion. Die Lage des Schnittpunktes der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm ermöglichte die Bestimmung des Hemmtyps.

Die eingesetzten Konzentrationen der Opiate wurden ebenfalls so gewählt, dass diese den wesentlichen Teil des Verlaufs der Substratsättigungskurve abdeckten. Dafür eigneten sich die Konzentrationen 2,5; 5 und 10 mM.

In den Abbildung 4.47 - Abbildung 4.62 sind die Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme für die Glucuronidierungen der Benzodiazepine unter dem Einfluss der Inhibitoren Morphin und Codein dargestellt. Abbildung 4.63 - Abbildung 4.74 zeigen die Opiat-Glucuronidierungen unter der Einwirkung von Oxazepam und Temazepam als Inhibitoren. Die Inhibitionsversuche erfolgten ausschließlich mit der Mikrosomencharge 41207.

4.6.1 Glucuronidierung der Opiate ohne Inhibitor

Die enzymkinetischen Parameter der Glucuronidierung in Abwesenheit eines Inhibitors sind in Tabelle 4.25 und Tabelle 4.26 zusammengefasst.

Tabelle 4.25 Glucuronidierung der Benzodiazepine ohne Inhibitor (Ox = Oxazepam, Tem = Temazepam) mit Charge 41207 ($n = 6$).

Substanz	K_m [μM]	V_{\max} [pmol/min/mg]
R-Ox	135 ± 20	38 ± 3
S-Ox	59 ± 9	76 ± 4
R-Tem	398 ± 32	140 ± 6
S-Tem	110 ± 11	152 ± 5

In allen Assays wurde eine ausreichende Menge an Benzodiazepinen glucuronidiert, um eine Inhibition durch die Opiate feststellen zu können. Die K_m -Werte ohne Inhibitor sind für R-Oxazepam $135 \pm 20 \mu\text{M}$, für S-Oxazepam $59 \pm 9 \mu\text{M}$. Für R-Temazepam wurde der Wert $398 \pm 32 \mu\text{M}$ bestimmt, für S-Temazepam $110 \pm 11 \mu\text{M}$. Diese Werte liegen im Bereich der jeweils ermittelten K_m -Werten (Tabelle 4.24, S.90) in der Versuchsreihe zur Ermittlung der enzymkinetischen Daten von Oxazepam und Temazepam. V_{\max} ist auch hier für beide Enantiomere von Temazepam sehr viel höher als für Oxazepam. Für R-Temazepam ist V_{\max} 140 ± 6 pmol/min/mg und für S-Temazepam 152 ± 5 pmol/min/mg. V_{\max} ist für R-Oxazepam mit 38 ± 3 pmol/min/mg am geringsten und für S-Oxazepam konnte ein Wert von 76 ± 4 pmol/min/mg ermittelt werden.

Tabelle 4.26 Glucuronidierung der Opiate ohne Inhibitor (Pos.3 = Bildung von Morphin-3-Glucuronid, Pos.6 = Bildung von Morphin-6-Glucuronid) mit der Charge 41207 (n = 6).

Substanz	K_m [mM]	V_{max} [nmol/min/mg]
Morphin, Pos. 3	$7,1 \pm 0,77$	$1,5 \pm 0,09$
Morphin, Pos. 6	$17,2 \pm 3,06$	$0,8 \pm 0,10$
Codein	$2,8 \pm 0,38$	$0,7 \pm 0,03$

In Tabelle 4.26 sind die bei den Inkubationen ohne Inhibitor ermittelten K_m -Werte für die Umsetzung der Opiate aufgeführt. Dabei wurde für die Bildung von Morphin-3-Glucuronid ein K_m -Wert von $7,1 \pm 0,77$ mM ermittelt und V_{max} beträgt $1,5 \pm 0,09$ nmol/min/mg. Für die Bildung von Morphin-6-Glucuronid ist der K_m -Wert mit $17,2 \pm 3,06$ mM deutlich höher und V_{max} ist mit $0,8 \pm 0,10$ nmol/min/mg nur etwa halb so groß. Die größte Affinität zu den Enzymen besaß bei diesen Untersuchungen Codein mit einem K_m -Wert von $2,8 \pm 0,38$ mM. Die Umsatzgeschwindigkeit liegt allerdings deutlich unter der von Morphin bei der Glucuronidierung in Position 3 und ist mit $0,7 \pm 0,03$ nmol/min/mg im Bereich der Umsatzgeschwindigkeit von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid.

4.6.2 Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung

Morphin als Inhibitor der Glucuronidierung von R-Oxazepam

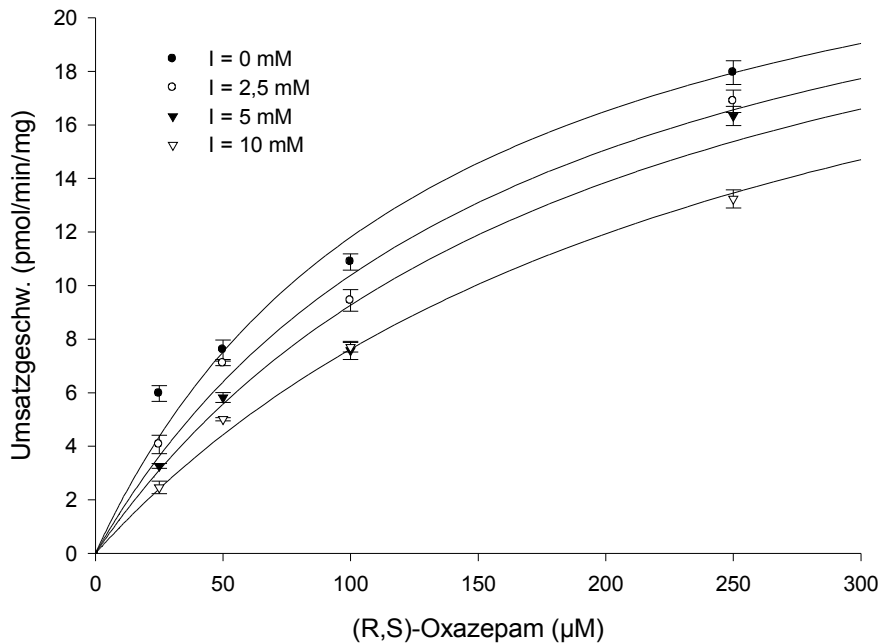


Abbildung 4.47 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

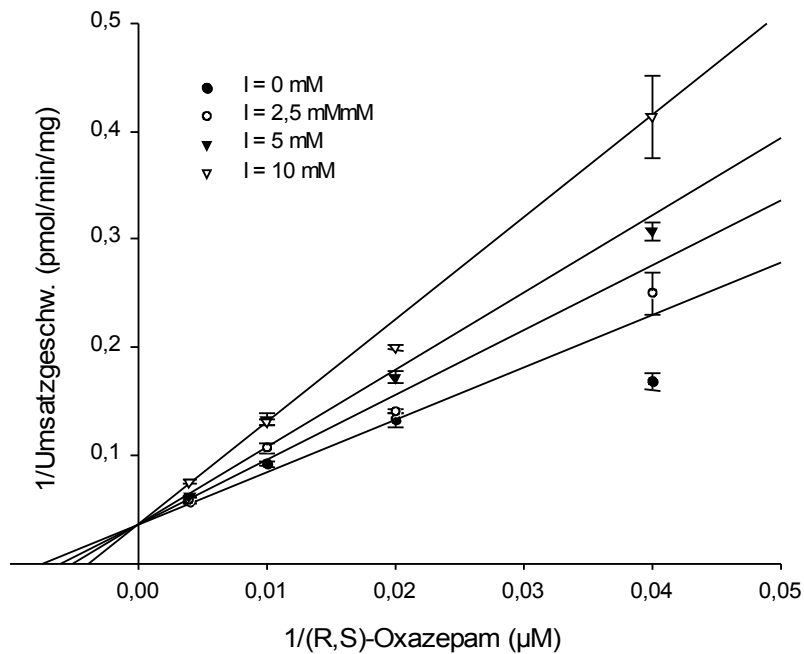


Abbildung 4.48 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM von Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,909, K_i : $10,4 \pm 1,47$ mM, K_m : 133 ± 13 μ M, V_{max} : 27 ± 1 pmol/min/mg.

Morphin als Inhibitor der Glucuronidierung von S-Oxazepam

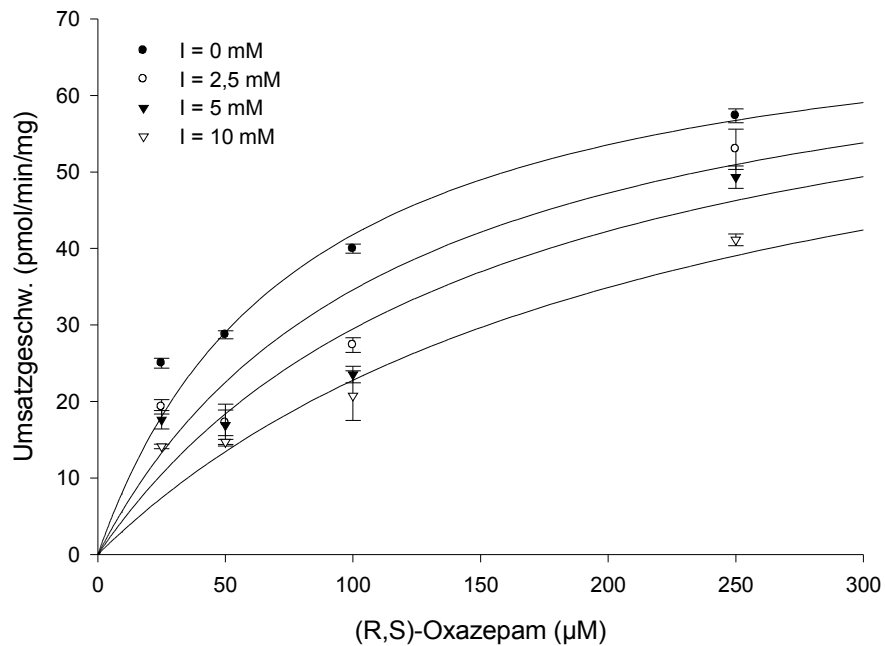


Abbildung 4.49 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

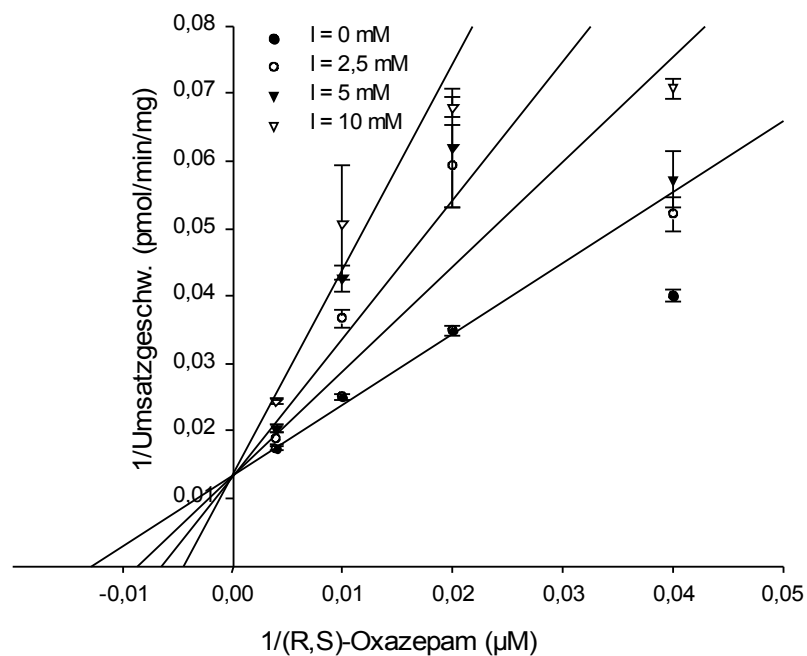


Abbildung 4.50 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,874, K_i : $5,3 \pm 1,12$ mM, K_m : 78 ± 14 μ M, V_{max} : 74 ± 5 pmol/min/mg.

Morphin als Inhibitor der Glucuronidierung von R-Temazepam

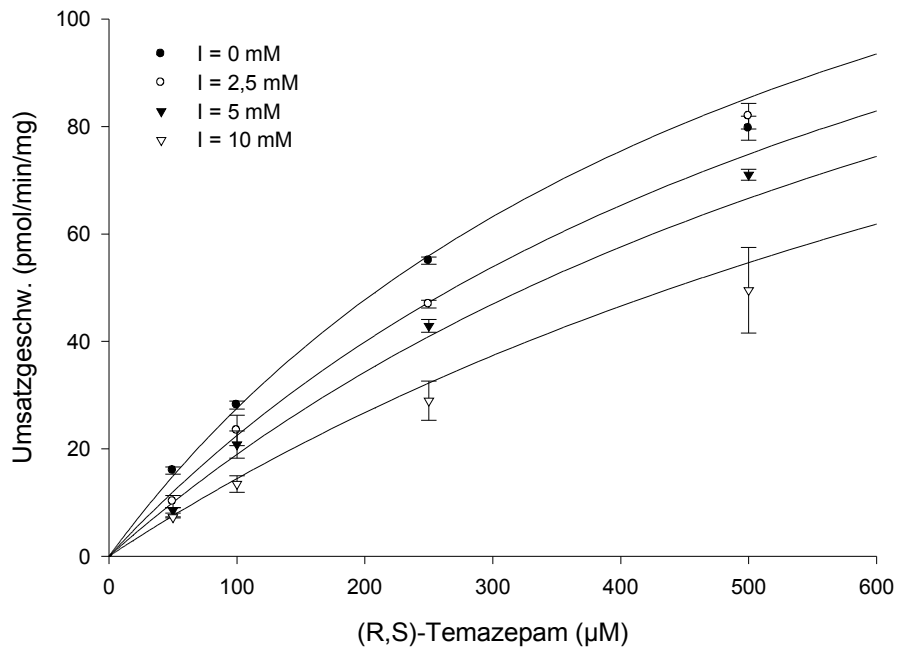


Abbildung 4.51 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

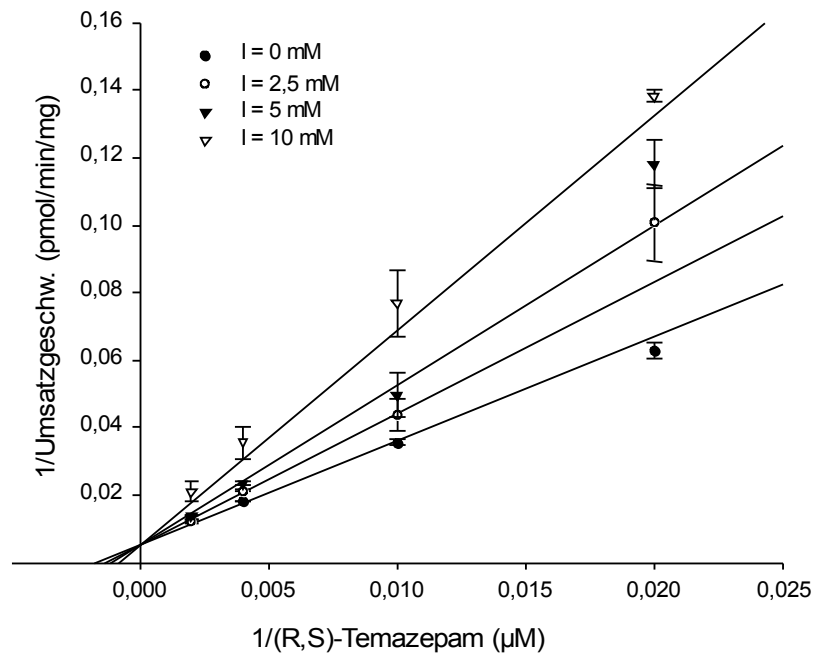


Abbildung 4.52 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,962, K_i : $9,4 \pm 1,37$ mM, K_m : 552 ± 100 µM, V_{max} : 180 ± 20 pmol/min/mg.

Morphin als Inhibitor der Glucuronidierung von S-Temazepam

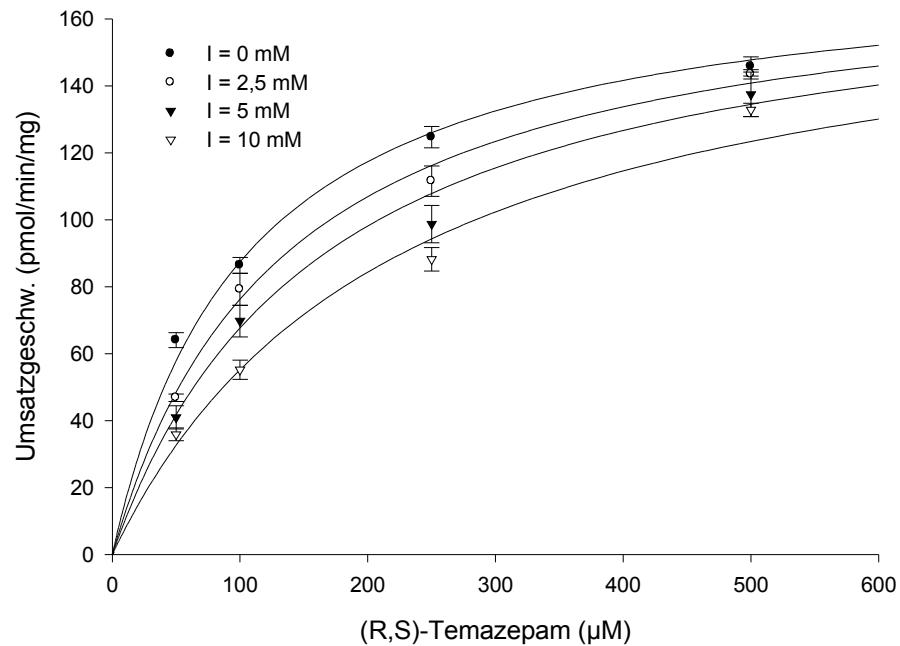


Abbildung 4.53 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

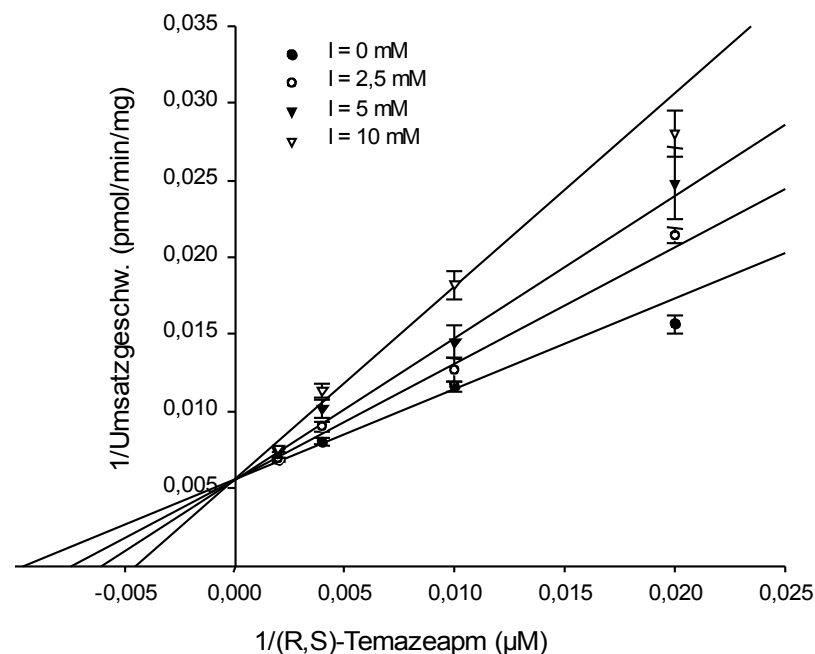


Abbildung 4.54 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,966, K_i : $8,8 \pm 1,24$ mM, K_m : 104 ± 9 μ M, V_{max} : 179 ± 5 pmol/min/mg.

Codein als Inhibitor der Glucuronidierung von R-Oxazepam

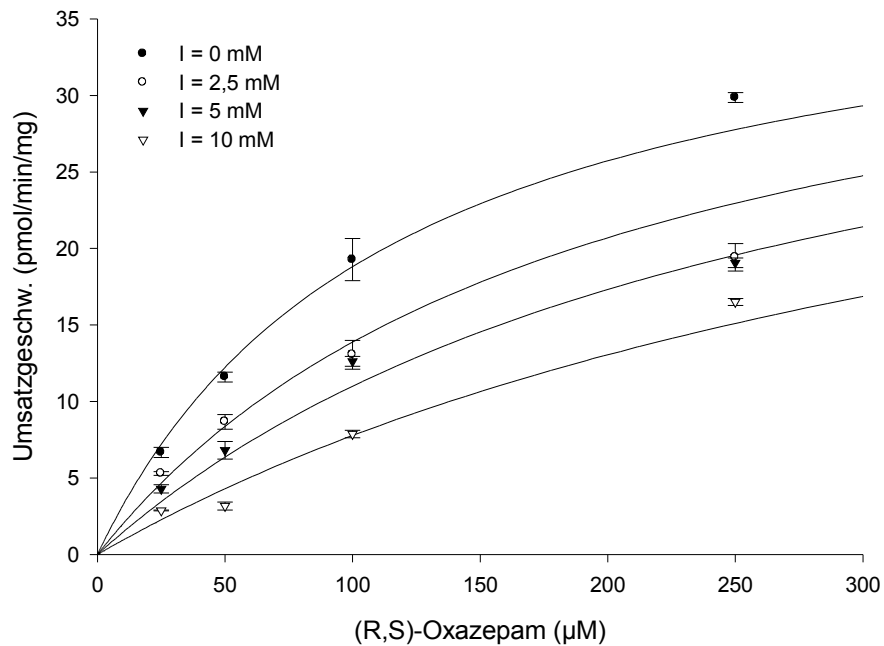


Abbildung 4.55 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

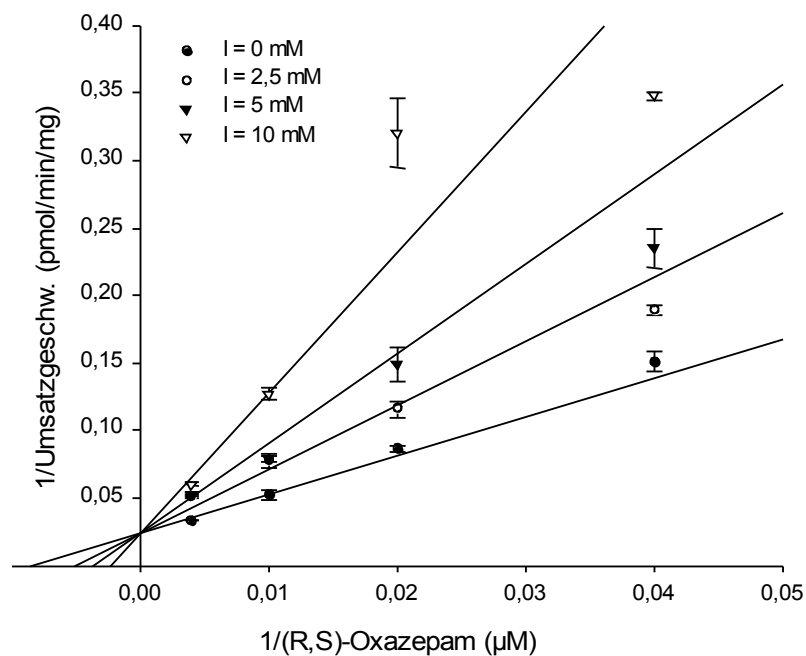


Abbildung 4.56 Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,958, K_i : $3,8 \pm 0,45$ mM, K_m : 116 ± 15 μ M, V_{max} : 41 ± 2 pmol/min/mg.

Codein als Inhibitor der Glucuronidierung von S-Oxazepam

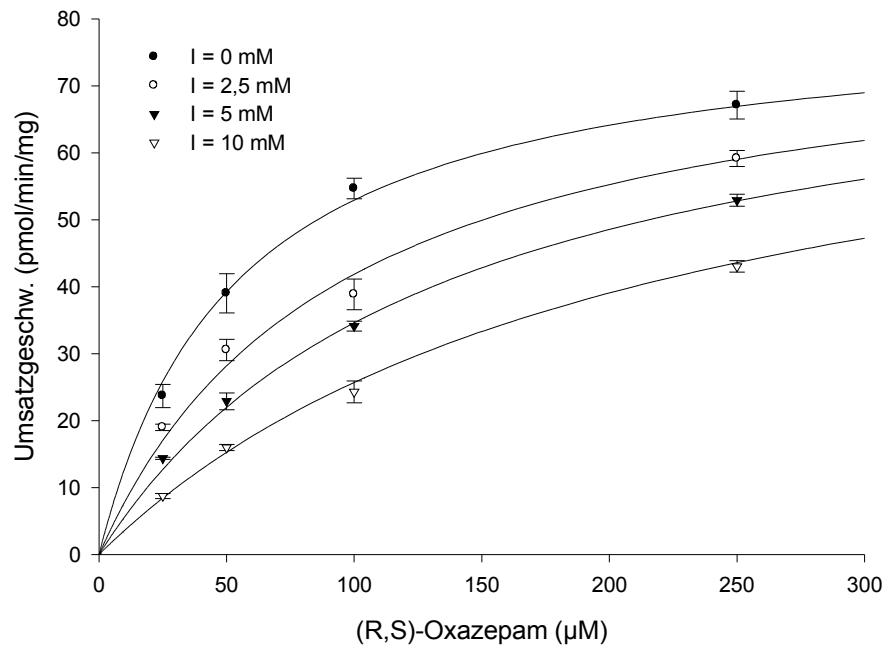


Abbildung 4.57 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

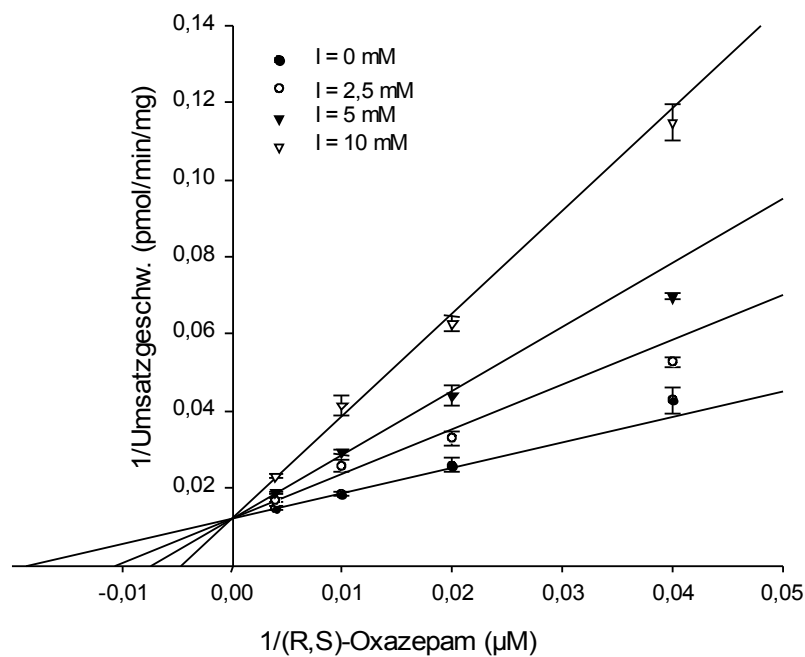


Abbildung 4.58 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,978, K_i : $3,3 \pm 0,28$ mM, K_m : 54 ± 4 μ M, V_{max} : 81 ± 2 pmol/min/mg.

Codein als Inhibitor der Glucuronidierung von R-Temazepam

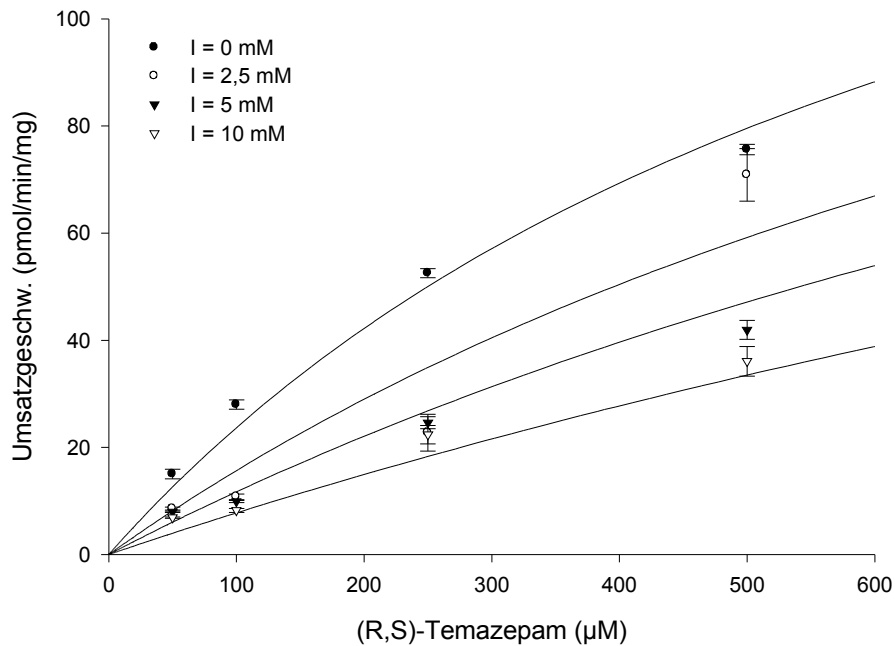


Abbildung 4.59 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

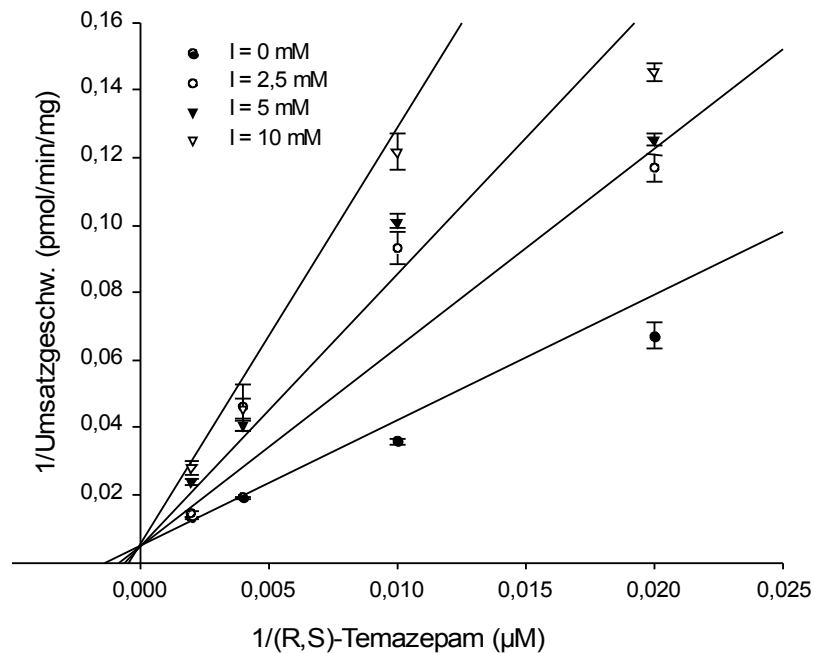


Abbildung 4.60 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,929, K_i : $4,3 \pm 0,70$ mM, K_m : 720 ± 69 μ M, V_{max} : 194 ± 41 pmol/min/mg.

Codein als Inhibitor der Glucuronidierung von S-Temazepam

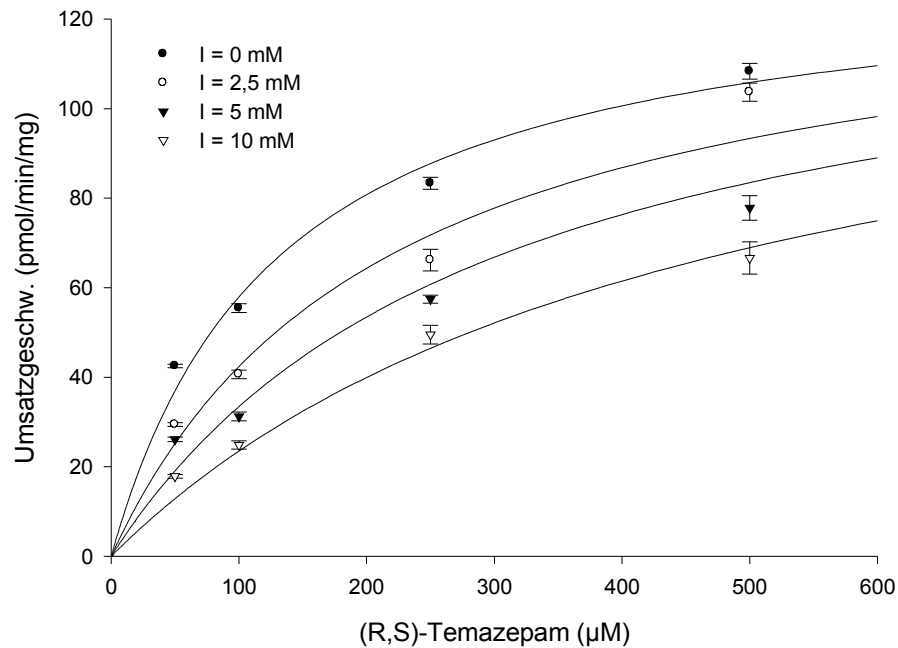


Abbildung 4.61 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

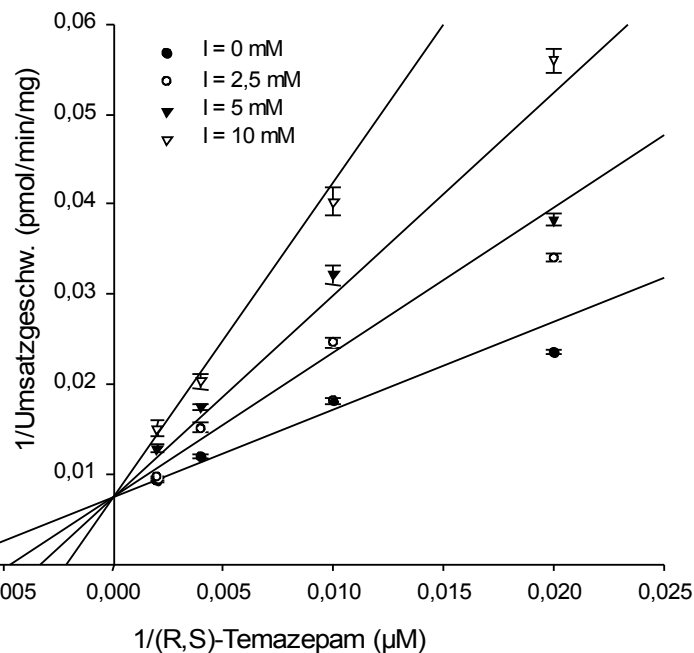


Abbildung 4.62 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,961, K_i : $3,9 \pm 0,44$ mM, K_m : 130 ± 14 μ M, V_{max} : 133 ± 5 pmol/min/mg.

Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung

Die Opiate Morphin und Codein erwiesen sich als kompetitive Hemmstoffe der Oxazepam- und Temazepam-Glucuronidierung. Bei diesem Hemmtyp liegt jeweils das kleinste r^2 vor. Die Schnittpunkte in allen Lineweaver-Burk-Diagrammen liegen sehr nahe bei oder direkt auf der Ordinate und der negative Abszissenabschnitt wird kleiner, was typisch für kompetitive Inhibitoren ist.

Morphin als Inhibitor der Benzodiazepin-Glucuronidierung

Morphin wurde als Inhibitor der Oxazepam- und Temazepam-Glucuronidierung in den Konzentrationen 2,5; 5 und 10 mM eingesetzt. Bereits bei einer Konzentration von 2,5 mM ist eine Hemmung sichtbar, was sich in einer flacheren Sättigungskurve im Vergleich zur ungehemmten Reaktion im Michaelis-Menten-Diagramm zeigt. In den Lineweaver-Burk-Diagrammen nehmen die Steigungen der Geraden ab und der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse verschiebt sich zu kleineren Werten (Abbildung 4.47 - Abbildung 4.54). Die K_i -Werte von Morphin als Inhibitor betragen für die Glucuronidierung von S-Oxazepam $5,3 \pm 1,12$ mM und von R-Oxazepam $10,4 \pm 1,47$ mM. Für die Umsetzung von S-Temazepam beträgt der ermittelte K_i -Wert $8,8 \pm 1,24$ mM und die von R-Temazepam $9,4 \pm 1,37$ mM (Tabelle 4.27, S.116). Diese Werte belegen, dass die Glucuronidierung der S-Enantiomere im Gegensatz zu den der R-Enantiomere der Benzodiazepine stärker durch Morphin gehemmt wird, d.h. die K_i -Werte hier niedriger sind. Am stärksten wird die Glucuronidierung von S-Oxazepam gehemmt.

Codein als Inhibitor der Benzodiazepin-Glucuronidierung

Auch Codein wurde als Inhibitor der Oxazepam- und Temazepam-Glucuronidierung in den Konzentrationen 2,5; 5 und 10 mM eingesetzt. Codein hemmte die Benzodiazepin-Glucuronidierung ebenfalls schon bei einer Konzentration von 2,5 mM. Abbildung 4.55 - Abbildung 4.62 zeigen die graphische Darstellung der gemessenen Werte. Codein hemmt die Glucuronidierung beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam stärker als Morphin, was sich in niedrigeren K_i -Werten widerspiegelt. Die K_i -Werte von Codein für die Glucuronidierung von Oxazepam betragen für S-Oxazepam $3,3 \pm 0,28$ mM und für R-Oxazepam $3,8 \pm 0,45$ mM, für S-Temazepam $3,9 \pm 0,44$ mM und $4,3 \pm 0,70$ mM (Tabelle 4.27, S.116). Auch hier war die Hemmung der S-Enantiomere stärker als die der R-Enantiomere, jedoch deutlich weniger ausgeprägt als bei Morphin. Auch der Unterschied der Hemmung zwischen Oxazepam und Temazepam in Gegenwart von Codein im Vergleich zu Morphin war deutlich geringer.

4.6.3 Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung

Oxazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin an Position 3

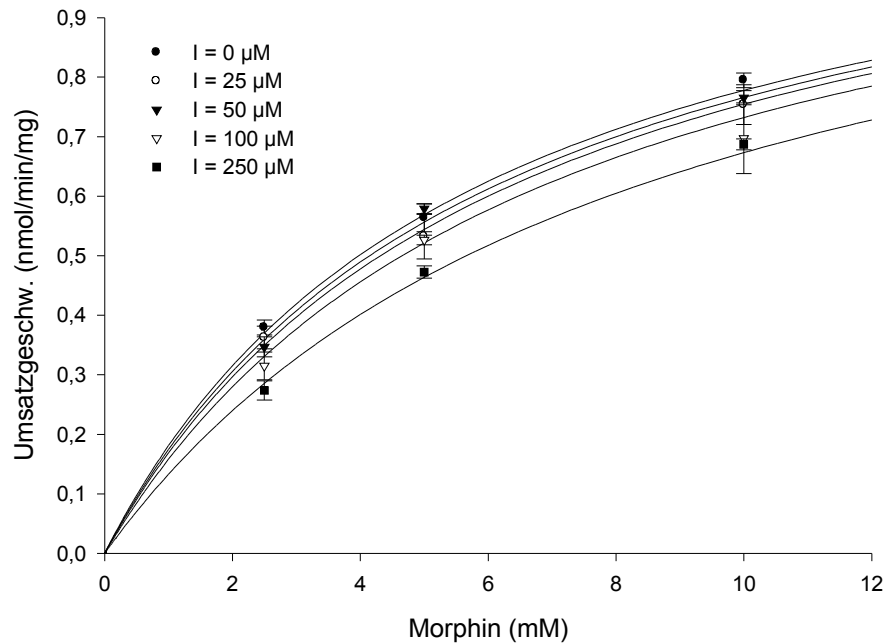


Abbildung 4.63 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

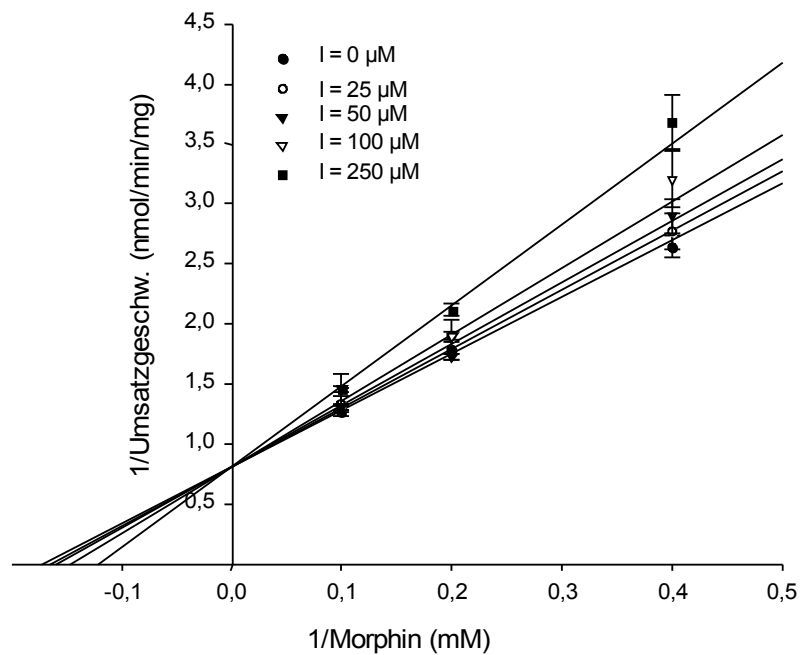


Abbildung 4.64 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,951, K_i : $590 \pm 123 \mu\text{M}$, K_m : $5,8 \pm 0,56 \text{ mM}$, V_{max} : $1,23 \pm 0,06 \text{ nmol/min/mg}$.

Oxazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin an Position 6

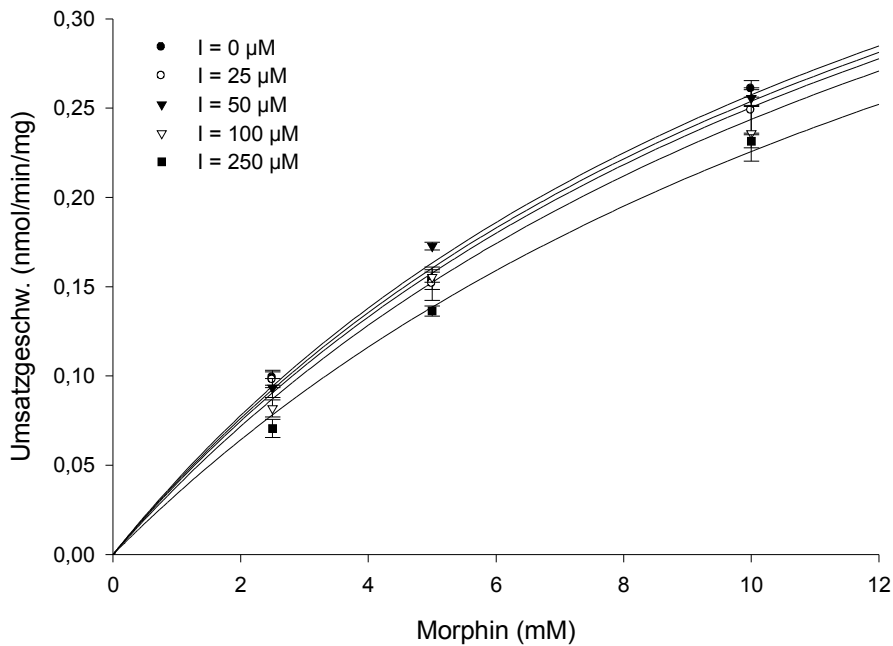


Abbildung 4.65 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

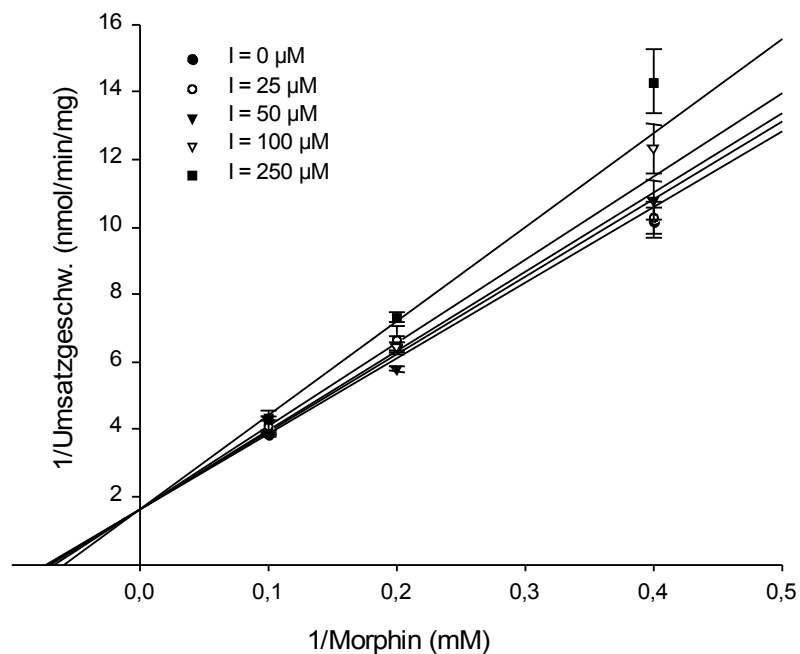


Abbildung 4.66 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,968, K_i : $1026 \pm 244 \mu\text{M}$, K_m : $13,6 \pm 1,64 \text{ mM}$, V_{max} : $0,61 \pm 0,05 \text{ nmol/min/mg}$.

Oxazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Codein

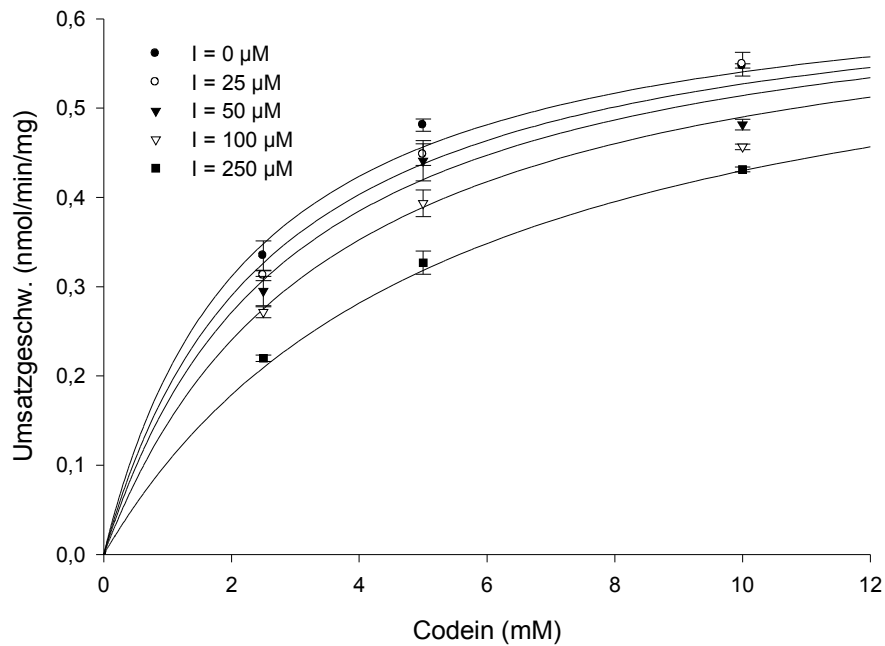


Abbildung 4.67 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

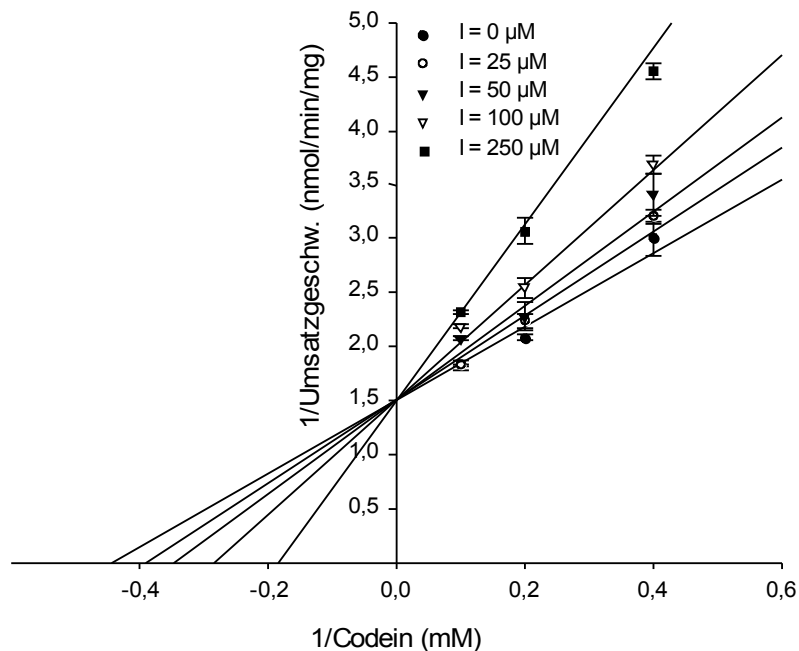


Abbildung 4.68 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,940, K_i : $179 \pm 24 \mu\text{M}$, K_m : $2,3 \pm 0,21 \text{ mM}$, V_{max} : $0,66 \pm 0,02 \text{ nmol/min/mg}$.

Temazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin an Position 3

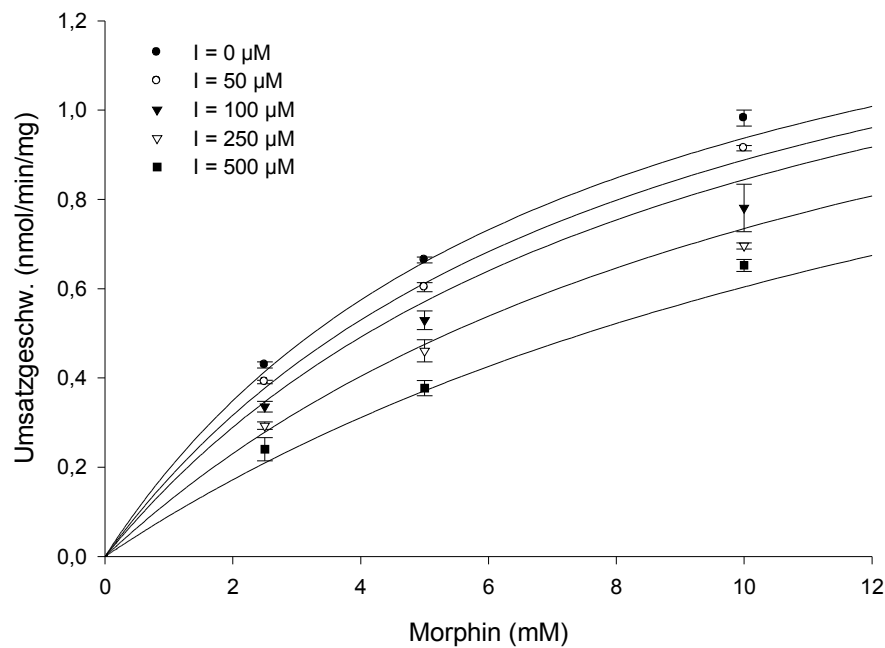


Abbildung 4.69 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor im Michaelis-Menten-Diagramm.

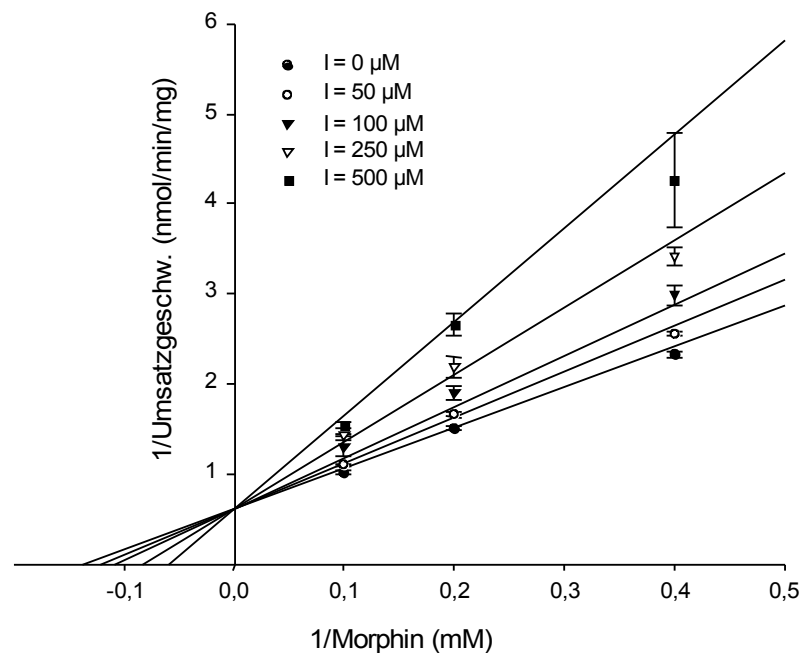


Abbildung 4.70 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,964, K_i : $381 \pm 41 \mu\text{M}$, K_m : $7,3 \pm 0,80 \text{ mM}$, V_{max} : $1,62 \pm 0,09 \text{ nmol/min/mg}$.

Temazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin an Position 6

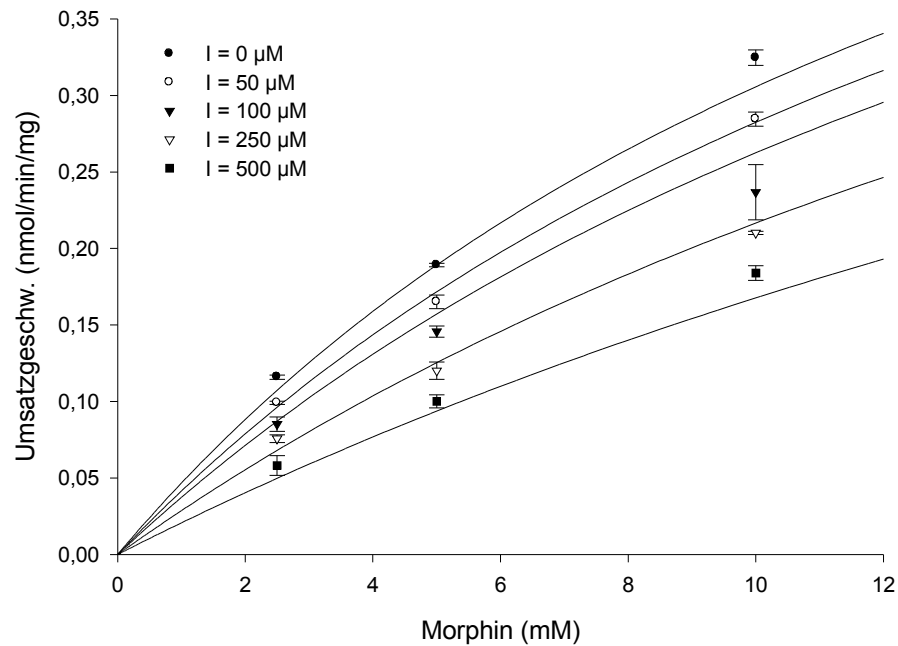


Abbildung 4.71 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

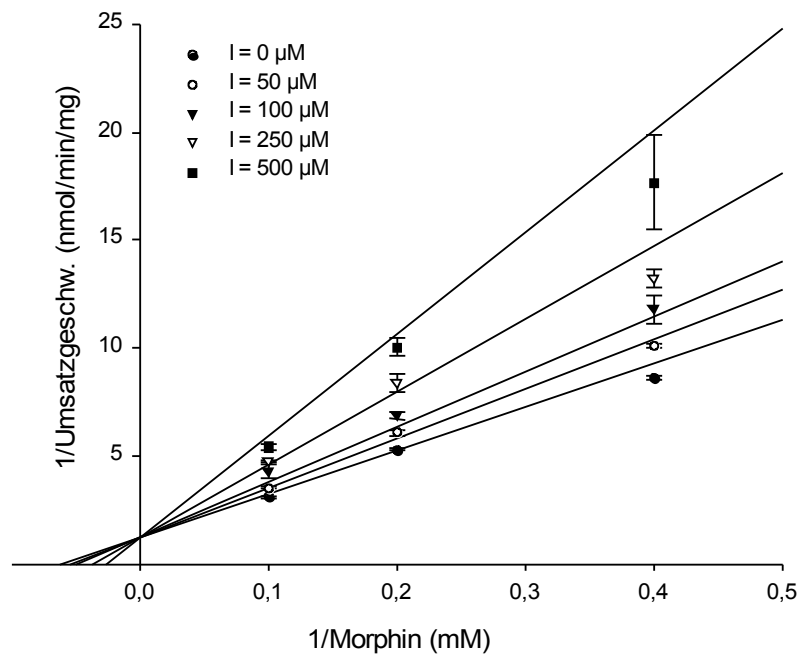


Abbildung 4.72 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,964, K_i : $375 \pm 39 \mu\text{M}$, K_m : $16,0 \pm 2,68 \text{ mM}$, V_{max} : $0,8 \pm 0,09 \text{ nmol/min/mg}$.

Temazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Codein

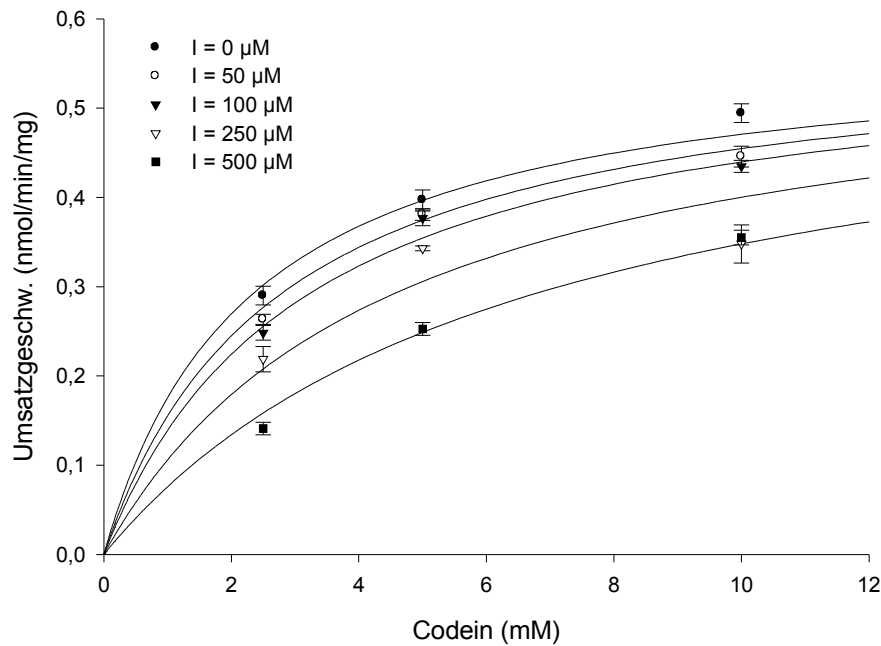


Abbildung 4.73 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.

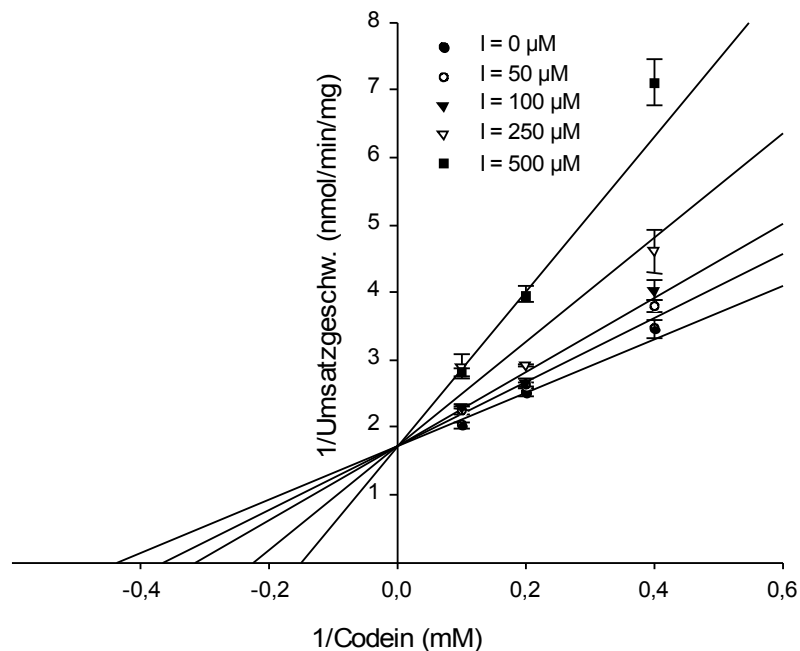


Abbildung 4.74 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,929, K_i : $265 \pm 38 \mu\text{M}$, K_m : $2,3 \pm 0,27 \text{ mM}$, V_{max} : $0,58 \pm 0,02 \text{ nmol/min/mg}$.

Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung

Die analytische Bestimmung der Glucuronide der Opiate ermöglichte es, auch die Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung näher zu untersuchen. Morphin wird, wie in der Einleitung in Abschnitt 1.5.1 (S.17) beschrieben, im Phase-II-Metabolismus zu zwei Glucuroniden verstoffwechselt, Codein hingegen nur zu Codein-6-Glucuronid. Durch die Bestimmung von Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid konnte das Hemmpotential der Benzodiazepine auf die Bildung beider Glucuronide von Morphin bestimmt werden. Beide Benzodiazepine erwiesen sich wie die Opiate als kompetitive Inhibitoren. In den Lineweaver-Burk-Diagrammen liegen die Schnittpunkte der Geraden sehr nahe an der Ordinaten bzw. auf der Ordinate und die Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse verschieben sich zu kleineren Werten. Dies entspricht dem typischen Verlauf einer kompetitiven Hemmung.

Oxazepam als Inhibitor der Opiat-Glucuronidierung

Oxazepam wurde, wie unter 4.4.7 (S.86) genauer erläutert, in den Konzentrationen 25, 50, 100 und 250 μM eingesetzt. Die Diagramme zeigen eine geringfügige Inhibition der Glucuronidierung von Morphin durch Oxazepam (Abbildung 4.63-Abbildung 4.66). Dagegen ist den Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagrammen bei der Glucuronidierung von Codein (Abbildung 4.67 und Abbildung 4.68) eine stärkere Hemmung durch Oxazepam zu entnehmen. Der K_i -Wert für Oxazepam als Inhibitor der Morphin-3-Glucuronidierung beträgt $590 \pm 123 \mu\text{M}$ und für die Morphin-6-Glucuronidierung $1026 \pm 244 \mu\text{M}$ (Tabelle 4.28, S.117). Dies zeigt, dass die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid stärker gehemmt wird als die zu Morphin-6-Glucuronid. Im Vergleich zur Glucuronidierung von Codein, bei der mit einem K_i -Wert von $179 \pm 24 \mu\text{M}$ ein mehr als doppelt so niedriger K_i -Wert bestimmt wurde als bei der Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid, wird die Glucuronidierung von Morphin sehr viel weniger von Oxazepam gehemmt als die von Codein.

Temazepam als Inhibitor der Opiat-Glucuronidierung

Temazepam wurde in den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500 μM eingesetzt (Ergebnisse 4.4.7, S.86). Die K_i -Werte für die Glucuronidierung von Morphin liegen sehr nahe beisammen und betragen für Morphin-3-Glucuronid $381 \pm 41 \mu\text{M}$ und für Morphin-6-Glucuronid $375 \pm 39 \mu\text{M}$ (Tabelle 4.28, S.117). Die Bildung beider Glucuronide von Morphin wird durch Temazepam gleich stark gehemmt. Eine stärkere inhibitorische Wirkung von Temazepam zeigt sich bei der Bildung von Codein-Glucuronid. Für diese Umsetzung wurde ein K_i -Wert von $265 \pm 38 \mu\text{M}$ ermittelt.

4.6.4 Zusammenfassung

Als Inhibitoren weisen die untersuchten Substanzen alle den kompetitiven Hemmtyp auf, allerdings waren das Ausmaß der Hemmung und damit die K_i -Werte unterschiedlich. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4.27 und Tabelle 4.28 nochmals zur besseren Veranschaulichung vergleichend dargestellt. Zusammenfassend belegen die gemessenen Werte eine stärkere Hemmung der Glucuronidierung der S-Enantiomere von Oxazepam und Temazepam durch die Opiate Morphin und Codein im Vergleich zu den R-Enantiomeren. Codein erwies sich als stärkerer Inhibitor mit entsprechend niedrigeren K_i -Werten als Morphin. Oxazepam und Temazepam hemmten ihrerseits die Glucuronidierung von Codein in stärkerem Ausmaß als die Umsetzung von Morphin sowohl zu Morphin-3- als auch zu Morphin-6-Glucuronid, wobei Oxazepam die Glucuronidierung von Codein am stärksten hemmt. Temazepam erwies sich gegenüber Oxazepam als stärkerer Inhibitor der Morphin-Glucuronidierung und hemmte die Glucuronidierung von Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid im demselben Ausmaß.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Enzymassays ermöglichten es, gleichzeitig die Eigenschaften der Opiate und der Benzodiazepine sowohl als Substrate als auch als Inhibitoren der Glucuronidierung zu ermitteln.

Tabelle 4.27 Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung (Ox = Oxazepam, Tem = Temazepam, Komp. = Kompetitiv).

Substrat	Inhibitor	r ²	K _m [μM]	V _{max} [pmol/min/mg]	K _i [mM]	Inhib.
S-Ox	Morphin	0,874	78 ± 14	74 ± 5	5,3 ± 1,12	Komp.
R-Ox	Morphin	0,909	133 ± 13	27 ± 1	10,4 ± 1,47	Komp.
S-Ox	Codein	0,978	54 ± 4	81 ± 2	3,3 ± 0,28	Komp.
R-Ox	Codein	0,958	116 ± 15	41 ± 2	3,8 ± 0,45	Komp.
S-Tem	Morphin	0,966	104 ± 9	179 ± 5	8,8 ± 1,24	Komp.
R-Tem	Morphin	0,962	552 ± 100	180 ± 20	9,4 ± 1,37	Komp.
S-Tem	Codein	0,961	130 ± 14	133 ± 5	3,9 ± 0,44	Komp.
R-Tem	Codein	0,929	720 ± 69	194 ± 41	4,3 ± 0,70	Komp.

Tabelle 4.28 Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung (Pos.3 = Bildung von Morphin-3-Glucuronid, Pos.6 = Bildung von Morphin-6-Glucuronid, Komp = Kompetitiv, Ox = Oxazepam, Tem = Temazepam).

Substrat	Inhibitor	r ²	K _m [mM]	V _{max} [nmol/min/mg]	K _i [μM]	Inhib.
Morphin (Pos. 3)	(R,S)-Ox	0,951	5,8 ± 0,56	1,23 ± 0,06	590 ± 123	Komp.
Morphin (Pos. 6)	(R,S)-Ox	0,968	13,6 ± 1,64	0,61 ± 0,05	1026 ± 244	Komp.
Codein	(R,S)-Ox	0,940	2,3 ± 0,21	0,66 ± 0,02	179 ± 24	Komp.
Morphin (Pos. 3)	(R,S)-Tem	0,964	7,3 ± 0,80	1,62 ± 0,09	381 ± 41	Komp.
Morphin (Pos. 6)	(R,S)-Tem	0,967	16,0 ± 2,68	0,80 ± 0,09	375 ± 39	Komp.
Codein	(R,S)-Tem	0,929	2,3 ± 0,27	0,58 ± 0,02	265 ± 38	Komp.

4.7 Pharmakodynamische Testung

4.7.1 Neuronaler Biosensor

Zur Testung der pharmakologischen Aktivität der Phase-II-Metabolite von Temazepam wurde ein am MPI für Polymerforschung, Mainz, entwickelter auf Neuronen basierender Biosensor eingesetzt.

4.7.2 Zellwachstum

Durch verschiedene Anfärbemethoden konnte das Wachstum der neocorticalen Zellen nach zwei Wochen *in vitro* nachgewiesen werden. Die entsprechenden Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop gemacht (Experimenteller Teil 3.10, S.45).

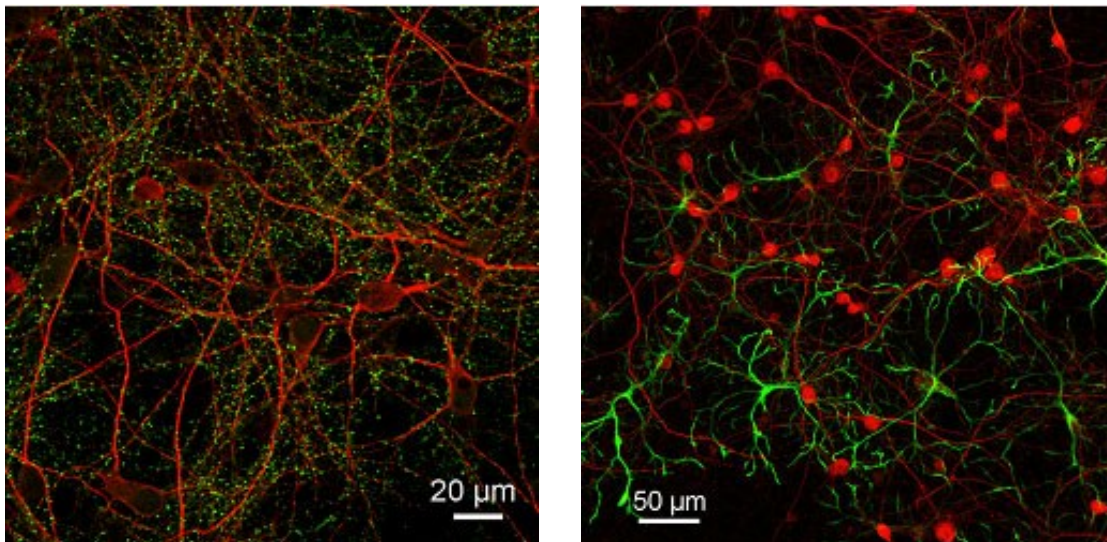


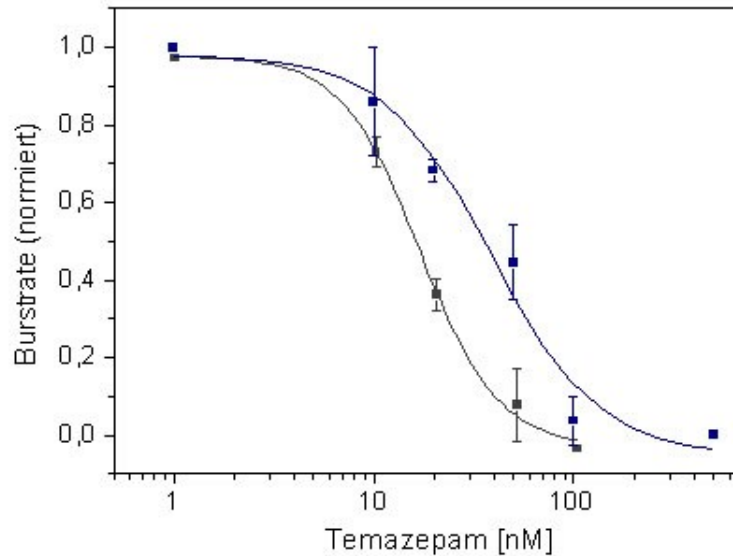
Abbildung 4.75 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung *in vitro* gewachsener neocorticaler Zellen nach zwei Wochen. Rot: neuronale Somata und Dendriten. Grün: links: Synapsin, rechts: Astrocyten.

Durch Anfärben des MAP2 können neuronale Somata und Dendriten sichtbar gemacht werden (rote Strukturen in Abbildung 4.75). Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Synapsin (Abbildung 4.75, linke Aufnahme grün) können die präsynaptischen Endigungen markiert werden. In der rechten Aufnahme der Abbildung wurden durch Anfärben des „sauren Gliafaserproteins“ Astrocyten sichtbar gemacht. Astrocyten nehmen maßgeblich an der Informationsverarbeitung teil. Sie besitzen Vesikel, in denen Glutamat gespeichert ist. Durch Freisetzung von Glutamat werden benachbarte Neurone erregt. Alle angefärbten Strukturen sind essentiell für ein funktionelles Netzwerk.

4.7.3 Temazepam

Bei den Messungen von Temazepam wurde zunächst ausschließlich diese Substanz in den Konzentrationen 1-100 nM auf die Microelectrodearray (MEA)-Oberfläche gegeben. Wie die blaue Kurve in Abbildung 4.76 zeigt, sinkt die Burstrate mit steigender Temazepamkonzentration. Dann wurde Temazepam mit einer

unterschwelligen GABA-Konzentration (500 nM) gemessen, da die Benzodiazepine die Affinität von GABA zu dessen Rezeptor erhöhen. Wie in Abbildung 4.76 zu sehen, sinkt die schwarze Kurve steiler ab. Die Messung einer unterschwelligen GABA-Konzentration (500 nM) alleine zeigte keinerlei Veränderung der Burstrate.



Temazepam, $IC_{50} = 38,50 \pm 10,72$ nM,
(n=3)

Temazepam + GABA [500 nM], $IC_{50} = 16,85 \pm 1,41$ nM,
(n=4)

Abbildung 4.76 Burstrate von Temazepam alleine, und Temazepam mit 500 nM GABA.

Exemplarisch sollen zwei Datensätze von den Messungen gezeigt werden.

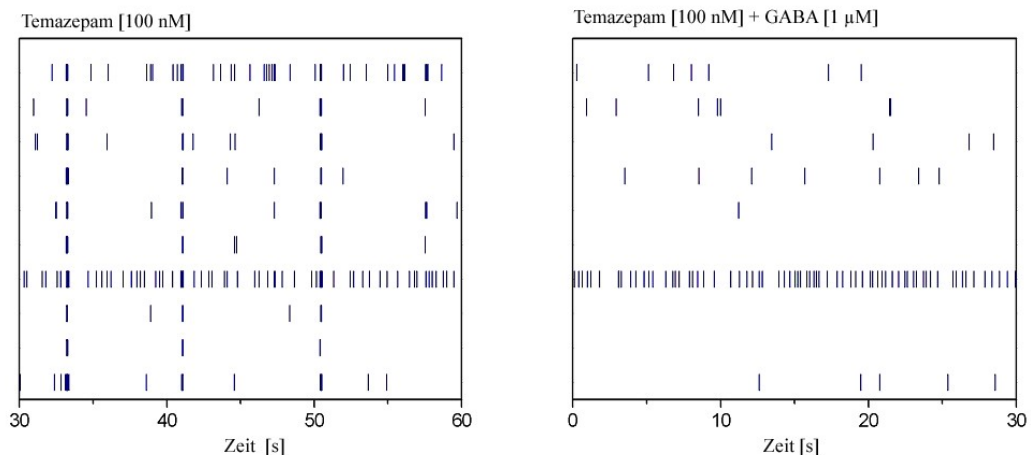


Abbildung 4.77 Datensätze mit Bursterscheinungen an den 60 Elektroden des MEA nach Zugabe von 100 nM Temazepam (links) und 100 nM Temazepam + 1 μ M GABA (rechts).

Zusätzlich wurde die Spikeanzahl pro Burst und die Burstdauer gemessen. Dabei traten keine Veränderungen auf, wie Abbildung 4.78 zeigt.

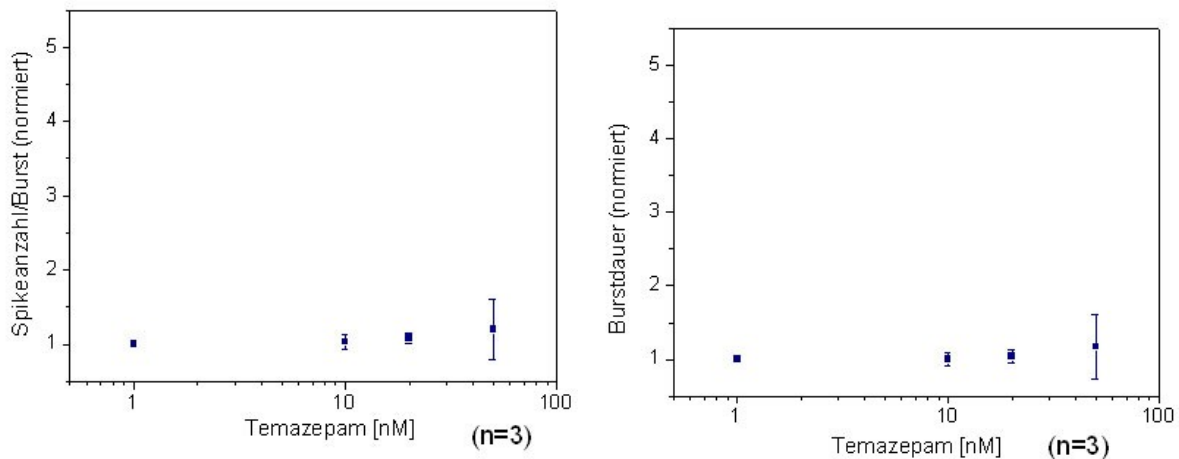


Abbildung 4.78 Links ist die Spikeanzahl/Burst und rechts ist die Burstdauer bei Zugabe von Temazepam (1-100 nM) abgebildet.

4.7.4 R- und S-Temazepam-Glucuronid

R- bzw. S-Temazepam-Glucuronid wurden zuerst wie in den Versuchen mit Temazepam in den Konzentrationen 1-100 nM gemessen. Da hier keine Veränderung der Burstrate erkennbar war, wurde eine Konzentration von 1 und 5 μM alleine und in einer zweiten Versuchsreihe ebenfalls mit einer unter-schweligen GABA-Konzentration von 500 nM aufgetragen. Wie in Abbildung 4.79 dargestellt ist, konnte kein relevanter Unterschied der Burstrate zur Kontrolle gemessen werden.

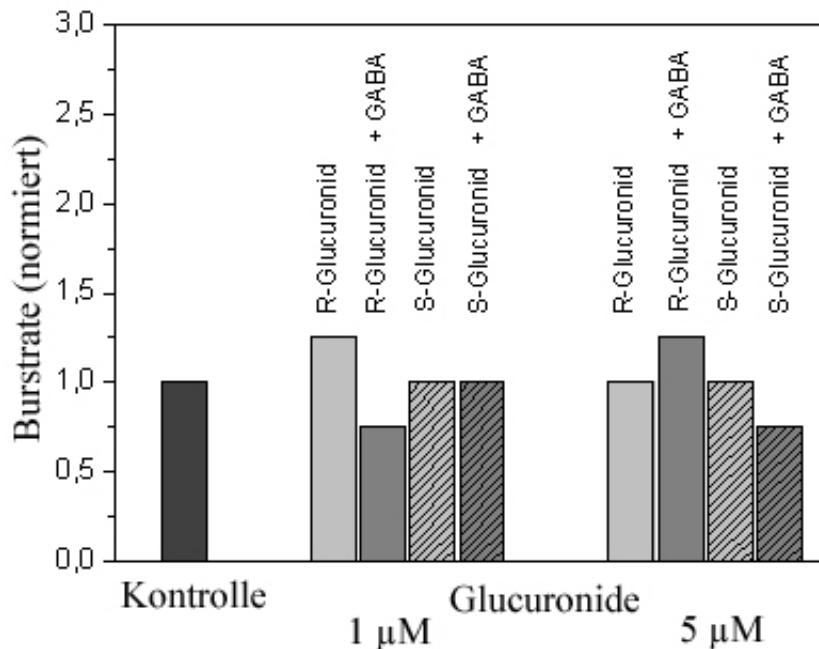


Abbildung 4.79 Burstrate nach Zugabe von 1 bzw. 5 μM R- oder S-Temazepam-Glucuronid alleine und mit 500 nM GABA.

Wie auch schon bei Temazepam konnte auch bei den Glucuroniden keine Veränderung der Spikeanzahl/Burst und der Burstdauer beobachtet werden (Abbildung 4.80).

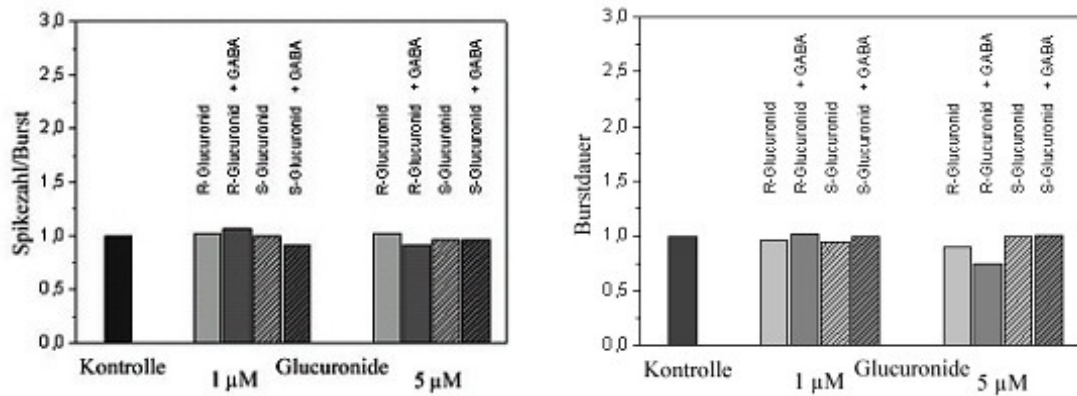


Abbildung 4.80 Spikeanzahl/Burst und Burstdauer nach Zugabe von 1 oder 5 µM R- oder S-Temazepam-Glucuronid alleine, oder mit 500 nM GABA.

4.7.5 Zusammenfassung

Im Falle von GABA und Temazepam konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Burstrate beobachtet werden. Die dosisabhängigen Kurven zeigten einen sigmoidalen Verlauf mit einem IC_{50} -Wert von 1,43 µM für GABA und 16,85 nM für GABA nach Temazepam-Zugabe. Diese Werte belegen, dass das neuronale Netzwerk eine 100fach höhere Sensitivität für Temazepam mit GABA im Vergleich zu GABA alleine besitzt.

Die diastereomeren reinen Temazepam-Glucuronide zeigten unter Verwendung eines auf Neuronen basierenden Biosensors bei derselben Konzentration wie sie für Temazepam eingesetzt wurde ebenso wie bei der zehnfach erhöhten Konzentration keinen inhibitorischen Effekt.

5 Diskussion

5.1 Enzymatische Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide

In der Literatur wurde die enzymatische Synthese verschiedener Arzneistoff-Glucuronide bereits beschrieben. Als Quelle für die hierfür verwendeten Lebermikrosomen wurden unterschiedliche Tierspezies (Kuuranne et al., 2002; Soars et al., 2002; Alonen et al., 2005), aber auch menschliches Lebergewebe verwendet und auf die Umsatzaktivität der Mikrosomen für das betreffende Substrat getestet (Soars et al., 2002). Dabei konnten große Unterschiede bezüglich der Ausbeute der Glucuronide bei den Mikrosomen aus den unterschiedlichen Spezies bestimmt werden. Buprenorphin-Glucuronid wurde sowohl von humanen als auch von Hundelebermikrosomen mit einer Ausbeute von 100 % gebildet und Anthraflavonsäure wurde zu 95 % bzw. zu 98 % umgesetzt (Soars et al., 2002). Die hohe Umsatzaktivität von Hundelebermikrosomen für bestimmte Arzneistoffe wurde bereits in der Literatur auch für Morphin beschrieben (King et al., 2000a). Hier war die Glucuronidierungsaktivität 4-10 mal höher als die mit humanen Lebermikrosomen (HLM) und Mikrosomen von Rhesusaffen. Die enzymatische Synthese der Phase-II-Metabolite verschiedener anabolisch androgener Steroide (AAS) erfolgte mit einer Ausbeute von 10-30 % durch Lebermikrosomen von Wistaraffen (Kuuranne et al., 2002). Drei der möglichen vier Mono-Glucuronide von Dobutamin wurden mit einer Ausbeute von 5 %, 9 % und 17 % durch den Einsatz von Schweinelebermikrosomen erzeugt (Alonen et al., 2005).

Aus ethischen und Kostengründen sowie aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit wurden in dieser Arbeit ebenfalls Schweinelebermikrosomen zur Herstellung der Benzodiazepin-Glucuronide als Referenzsubstanzen eingesetzt. Die gewünschten Glucuronide konnten mit Ausbeuten von 10-28 % pro Glucuroniddiastereomer synthetisiert werden (Tabelle 4.6, S.55). Da bei der Synthese das Racemat eingesetzt wurde, und daher pro Substanz zwei Glucuronide gebildet werden, ist die tatsächliche Ausbeute daher doppelt so hoch. Die in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten stimmen mit den Ausbeuten der bereits oben erwähnten Glucuronid-Synthesen anderer Arzneistoffe weitestgehend überein. Die in der Literatur beschriebenen hohen Ausbeuten bei der enzymatischen Synthese anderer Glucuronide konnten dadurch ermöglicht werden, dass Mikrosomen verschiedener Spezies für die zu glucuronidierenden Arzneistoffe in Vorversuchen getestet und für die jeweilige Synthese die geeigneten Mikrosomen eingesetzt wurden. Dabei erwiesen sich humane Lebermikrosomen und Hundelebermikrosomen für eine Vielzahl von Substraten als am besten geeignet (Soars et al., 2002). Die Ausbeuten waren trotz einer vorherigen Optimierung der Rahmenbedingungen (Substratkonzentration, UDPGA-Konzentration, Proteinkonzentration), die in Vorversuchen über eine Inkubationszeit von 4 Stunden liefen, geringer als erwartet. Da die Inkubationszeit der Synthese 24 Stunden betrug, ist es möglich, dass nach 4-5 Stunden die UGTs denaturieren und nur noch wenig Benzodiazepin umgesetzt werden kann. Dies wurde ebenfalls bei der Optimierung der

Inkubationszeit für das Enzymassay der Wechselwirkungsstudien beobachtet (Ergebnisse 4.4.3, S.81). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass entweder eine Produkt- oder eine Substrathemmung vorliegt. Dafür gab es ebenfalls bei der Bestimmung der enzymkinetischen Daten von S-Oxazepam und S-Temazepam mit den HLM Hinweise (Ergebnisse 4.4.7, S.86). Bei der Produkthemmung lagert sich das Reaktionsprodukt bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration an das aktive Zentrum oder an eine regulatorische Stelle des Enzyms an. Die Aktivität des Enzyms wird herabgesetzt, und die Bildung des Reaktionsproduktes stagniert. Bei der Substrathemmung bindet überschüssiges Substrat teilweise unspezifisch, wodurch der Zugang zum aktiven Zentrum ebenfalls blockiert wird. Sowohl bei der Produkt- als auch bei der Substrathemmung sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit nach Durchlaufen eines Maximums wieder ab. Die beobachtete Hemmung stellt ein weiteres Problem für die enzymatische Synthese dar, bei der jeweils eine Konzentration von 1 mM Benzodiazepin eingesetzt wurde. Bei den *in vitro*-Versuchen mit HLM ließ sich der Umsatz ab 250 bzw. 500 μ M Benzodiazepin nicht weiter steigern. In den Michaelis-Menten-Diagrammen trat demzufolge ab diesen Konzentrationen ein Plateau auf (Abbildung 4.33, S.87 und Abbildung 4.34, S.87). Die Vorversuche für die enzymatische Synthese wurden ebenfalls mit Schweinelebermikrosomen durchgeführt, wobei hier die Umsatzrate bis zu einer Konzentration von 1 mM Benzodiazepin gesteigert werden konnte. Die Zugabe der Menge an Mikrosomen wurde durch den Gesamtproteingehalt festgelegt, der für die selbst isolierten Mikrosomen bestimmt wurde. Für die *in vitro*-Versuche wurden humane Lebermikrosomen der Firma BD Bioscience eingesetzt, von denen ebenfalls der Gesamtproteingehalt angegeben war. Da sich der Proteingehalt weder auf die Aktivität noch auf den Gehalt an UGT bezieht, kann dies einen Unterschied zwischen den Assays der enzymatischen Synthese mit den selbst aufgereinigten Schweinelebermikrosomen und den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit den käuflich erworbenen HLM ausmachen.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Ausbeuten mit zunehmender Zeit im Vergleich zu den kalkulierten Ausbeuten geringer sein könnten, besteht darin, dass durch Hydrolyse die bereits gebildeten Benzodiazepin-Glucuronide wieder gespalten werden könnten. Im Allgemeinen sind an der Hydrolyse zwei Enzymsysteme beteiligt: β -Glucuronidasen und Esterasen (Kroemer und Klotz 1992; Sperker et al., 1997).

Die in dieser Arbeit beschriebene enzymkatalysierte Synthesemethode zur Gewinnung von Phase-II-Metaboliten erwies sich als gut geeignet, um im Multimilligrammmaßstab stereochemisch reine Produkte zu einem angemessenen Preis mit geringem zeitlichen Aufwand zu synthetisieren. Diese Mengen sind für den Einsatz als Referenzsubstanzen für *in vitro*-Metabolismusstudien und pharmakologische Studien mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Biosensor ausreichend. Somit kann die Synthese sowohl in der Arzneistoffentwicklung als auch in der Toxikologie auch zur Herstellung anderer Glucuronide zum Einsatz kommen. Bei den üblichen Nachweismethoden mittels HPLC werden nach Flüssig/Flüssig Extraktion mit einem lipophilen Lösungsmittel nur die Benzodiazepine, nicht jedoch ihre Glucuronide erfasst. Sowohl der Einsatz der in dieser

Arbeit synthetisierten Referenzsubstanzen als auch die beschriebene HPLC-Methode zum quantitativen Nachweis der Benzodiazepin-Glucuronide, könnte die oben aufgeführte Nachweismethode ersetzen. Durch die Quantifizierung der Muttersubstanzen und aller Metabolite könnte eine exaktere toxikologische Beurteilung erfolgen, insbesondere im Hinblick auf den Einnahmezeitpunkt bzw. der insgesamt eingenommenen Menge.

5.2 Analytik und Strukturaufklärung der Benzodiazepin-Glucuronide

5.2.1 LC/MS

Die Strukturaufklärung aller Benzodiazepin-Glucuronide erfolgte mittels LC/MS und $^1\text{H-NMR}$. Bei den experimentell bestimmten Feinmassen der Glucuronide ergab sich eine hohe Massengenauigkeit mit einer maximalen Fehlerabweichung von $< 0,7$ ppm im Vergleich zu den theoretischen Massen (Tabelle 4.7, S.55). Die Untersuchung ihres Fragmentierungsverhaltens mit Hilfe von MS^2 -Experimenten ergab für alle Benzodiazepin-Glucuronide dieselbe charakteristische Fragmentierung, wie sie auch in der Literatur bereits für andere Glucuronide beschrieben wurde (Kuورانne et al., 2002; Soars et al., 2002). Damit konnte eine sichere Identifizierung der Benzodiazepin-Glucuronide über ihre Elementarzusammensetzung und ihr Fragmentierungsmuster erreicht werden.

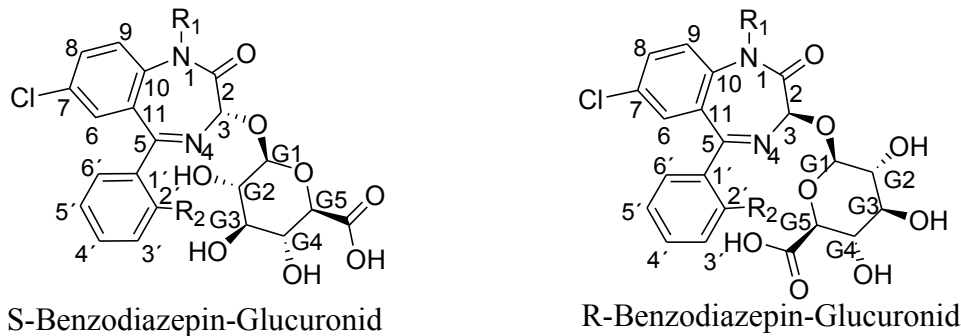
Der Verlust des Glucuronsäurerests (gluc; -176 Da) ist in der Literatur für andere Glucuronide beschrieben. Synthetisierte AAS-Glucuronide (Kuورانne et al., 2002) und Dobutamin-Glucuronide (Alonen et al., 2005) weisen in ihren MS/MS -Spektren $[\text{M}+\text{H}-\text{Gluc}]^+$ -Ionen auf. Weitere charakteristische Peaks ergaben sich durch Wasserabspaltung (-18u) $[\text{M}+\text{H}-\text{Gluc}-\text{H}_2\text{O}]^+$, wie sie auch bei allen Benzodiazepin-Glucuroniden zu sehen sind. In der Literatur ist die massenspektroskopische Untersuchung von Lorazepam-Glucuronid beschrieben (Weinmann et al., 2000). Hier konnte das Natriumsalz des Produkts mit einer Molekülmasse von 519 amu (atomic mass unit), als protoniertes Molekularion mit einer Masse von 497 amu, und nach Verlust einer Masse von 198 amu die Muttersubstanz Lorazepam mit der MH^+ -Masse von 321 amu nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten LC/MS-Experimente zeigten, wie zu erwarten war, keinerlei Unterschiede in der Stereochemie der jeweiligen Diastereomere. Die diastereomeren R- und S-Glucuronide der Benzodiazepine verhielten sich in ihrem Fragmentierungsmuster völlig identisch. Um die räumliche Anordnung der R- und S-Konfiguration genauer zu klären, wurden $^1\text{H-NMR}$ Experimente durchgeführt.

5.2.2 $^1\text{H-NMR}$

Die Protonen des anellierten aromatischen Ringsystems aller Benzodiazepin-Glucuronide weisen charakteristische Kopplungskonstanten auf. Da die Reaktionsbedingungen (37 °C, wässriges Medium) äußerst mild waren, ist hier keine Veränderung am aromatischen Ringsystem zu erwarten. Der Fokus war somit auf die

während der Synthese neu geknüpfte Bindung, nämlich die zwischen der Glucuronsäure und dem Aglykon, gerichtet. Diese wurde durch die vicinale Kopplungskonstante $^3J_{GH1,GH2}$ (Abbildung 5.81) bestätigt und war für alle S-Glucuronide 7,5 Hertz (Hz) und für alle R-Glucuronide 7,8 Hz. Typische Werte für die Kopplungskonstanten zwischen zwei axialen Protonen in β -gluc- und β -galacto-Konfiguration, wie sie auch in der β -D-Konfiguration des Zuckers vorliegen, sind 7 bis 8 Hz (van Halbeek 1993). Für β -D-Galactose beträgt diese Kopplungskonstante 7,8 Hz. Im Vergleich dazu ist $^3J_{1,2}$ für ein äquatoriales H-1 und ein axiales H-2 Proton in α -gluc- und α -galacto-Konfiguration 3-4 Hz. Auch in der Literatur werden für synthetisierte β -D-Glucuronide die vicinalen Kopplungskonstanten angegeben, um die Knüpfung der glykosidischen Bindung in β -Konfiguration zu bestätigen. Bei den bereits oben erwähnten AAS-Glucuroniden liegen die Werte für die $^3J_{GH1,GH2}$ Kopplungskonstanten alle zwischen 7,7 und 7,8 Hz (Kuuranne et al., 2002) und bei den von Hubert durch chemische Synthese erhaltenen β -D-Glucuroniden von 2,3-, 3,4- und 2,6-Dichlorphenol zwischen 7,3 und 7,5 Hz (Hubert 1997).



- $R_1 = H; R_2 = H$ Oxazepam-Glucuronid
 $R_1 = CH_3; R_2 = H$ Temazepam-Glucuronid
 $R_1 = H; R_2 = Cl$ Lorazepam-Glucuronid

Abbildung 5.81 Strukturformel der R- und S-Benzodiazepin-Glucuronide mit Nummerierung.

Die chemische Verschiebung der Protonen der Glucuronsäureeinheit (an G1-G5) (Abbildung 5.81) wurde ebenfalls für andere Glucuronide in der Literatur beschrieben und stimmt mit den hier erhobenen Daten überein. Im Gegensatz zu den Protonen an G2, G3 und G4 ist das Proton an G1, durch benachbarte Heteroatome stärker ins tiefe Feld verschoben. Daher liegt die chemische Verschiebung für dieses Proton bei allen Benzodiazepin-Glucuroniden zwischen 4,4 und 4,8 ppm. Bei chemisch sehr unterschiedlichen Glucuroniden ist die chemische Verschiebung für dieses Proton im Bereich von 4,67-5,13 ppm anzusiedeln (Soars et al., 2002). Die anderen drei Protonen (an G2, G3 und G4) der Glucuronsäureeinheit der Benzodiazepin-Glucuronide treten als Multipllett auf, da sie sich in ihrer chemischen Umgebung kaum unterscheiden. Deshalb liegen sie sehr nahe beieinander und lassen sich nicht eindeutig zuordnen. Dies stellt ein ebenfalls in der Literatur beschriebenes Phänomen dar (Kemp et al., 2002; Soars et al., 2002). Nur das Proton an G5 ist durch die Säurefunktion am Kohlenstoff weiter als die

oben genannten drei Protonen ins tiefe Feld verschoben und eindeutig als Dublett zu sehen. In der Literatur sind Werte zwischen 3,50 und 3,71 ppm für die chemische Verschiebung dieses Protons aufgeführt. Bei den Benzodiazepin-Glucuroniden liegen alle gemessenen Werte zwischen 3,46 und 3,52 ppm. Die sich daraus ergebenden Kopplungskonstanten sind mit 9,5-9,8 Hz relativ hoch, liegen aber im Bereich der für diese Konjugate angegebenen Kopplungskonstanten von 8,5 bis 10 Hz.

Die unterschiedliche Stereochemie der jeweiligen diastereomeren Glucuronide der Benzodiazepine zeigt sich an Unterschieden bezüglich der chemischen Verschiebung und des Aufspaltungsmusters an den Protonen der Position 3 und G1 (Abbildung 5.81). Alle R-Glucuronide weisen für G1-H eine chemische Verschiebung zwischen 4,46 und 4,52 ppm und an 3-H zwischen 5,20 und 5,24 ppm auf. Bei den S-Glucuroniden liegt die chemische Verschiebung für G1-H zwischen 4,76 und 4,79 ppm und für 3-H im Bereich zwischen 5,27-5,35 ppm. Zusätzlich gibt es Unterschiede im Aufspaltungsmuster von G1-H aller R-Glucuronide zu dem der S-Glucuronide. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich alle R-Glucuronide und alle S-Glucuronide bezüglich der chemischen Verschiebung und des Aufspaltungsmusters der zwei oben genannten relevanten Protonen untereinander gleich verhalten. Die ermittelten Unterschiede zwischen R-Glucuroniden einerseits und S-Glucuroniden andererseits können für die Interpretation weiterer strukturanalytischer Messungen an diastereomeren Benzodiazepin-Glucuroniden herangezogen werden, um Hinweise auf ihre Konfiguration zu erhalten. Durch die ¹H-NMR-Messungen konnte allerdings nicht eindeutig die Konfiguration bestimmt werden. Diesbezüglich wurden bereits Untersuchungen durchgeführt, die in der Literatur beschrieben sind und worauf Bezug genommen werden konnte. Ruelius et al. (1979) trennten erstmalig im präparativen Maßstab diastereomere Oxazepam-Glucuronide aus Schweineurin mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. Diese wurden mittels Elementaranalyse, MS, UV und mit ORD/CD (optical rotary dispersion/circular dichroism) charakterisiert. Mit Hilfe des Spektropolarimeters wurde die spezifische Rotation bestimmt und mit anderen chiralen Benzodiazepinen verglichen (Corbella et al., 1973). Anlehnend an die in der Literatur beschriebene Bestimmung von R- und S-Oxazepam-Glucuronid mittels HPLC (Patel et al., 1995b), wurde in der vorliegenden Arbeit das Laufmittel mit den gleichen Bestandteilen, jedoch mit geringfügigen Konzentrationsänderungen für die Bestimmung aller Benzodiazepin-Glucuronide eingesetzt. Die diastereomeren Glucuronide von Oxazepam wurden sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit durch ihre relativen Retentionszeiten (R- eluiert vor S-Oxazepam-Glucuronid) und ihrer relativen Peakhöhen (S- ca. 3-4 mal höher als R-Oxazepam-Glucuronid) bestimmt (Patel et al., 1995a; Patel et al., 1995b; Court et al., 2002). Sowohl bei der Glucuronidierung *in vivo* als auch bei Glucuronidierungen mit HLM *in vitro*, wurde beschrieben, dass das Verhältnis von S/R-Oxazepam-Glucuronid ca. 2,5-4:1 ist (Vree et al., 1991; Patel et al., 1995a; Patel et al., 1995b). Ein solches Verhältnis konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der HPLC-Ergebnisse ermittelt werden. Es ist davon auszugehen, dass sich alle R-Glucuronide und alle S-Glucuronide unter solchen

chromatographischen Bedingungen untereinander ähnlich verhalten und somit alle R-Glucuronide vor den S-Glucuroniden eluieren.

In dieser Arbeit können erstmalig sowohl die LC/MS Daten als auch die $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Benzodiazepin-Glucuronide von Temazepam, Oxazepam und Lorazepam präsentiert werden. Die Diastereomerenpaare der Benzodiazepin-Glucuronide unterscheiden sich in der chemischen Verschiebung und im Aufspaltungsmuster der zwei Protonen an G1 und 3. Untereinander verhält sich die Gruppe der R-Glucuronide und die der S-Glucuronide der Benzodiazepine gleich, was die chemische Verschiebung und das Aufspaltungsmuster der beiden oben genannten Protonen angeht. Deshalb können die hier gewonnenen Daten für die Interpretation weiterer diastereomerer Benzodiazepin-Glucuronide herangezogen werden.

5.3 Chemische Synthese

In den letzten Jahrzehnten konnte die chemische Synthese einer Vielzahl von Arzneistoff-Glucuroniden dokumentiert werden (Kaspersen und Vanboeckel 1987; Stachulski und Jenkins 1998). Ein wesentlicher Nachteil dieser chemischen Synthesen besteht allerdings in der Bildung einer racemischen Mischung aus α/β -Anomeren der Glucuronide und der Bildung von Nebenprodukten (Stachulski und Jenkins 1998). Ein mehrstufiger Aufbau mit Synthese der Vorstufen, Kopplung mit dem Aglykon und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen führt zu einem erhöhten Zeitaufwand. Ihr Vorteil dagegen sind die relativ hohen Ausbeuten im Vergleich zur enzymatischen Synthese. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst die chemische Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide angestrebt. Die dafür notwendigen geschützten und aktivierten Zucker wurden nach Literaturvorschrift (Bollenback et al., 1955; Vlahov und Snatzke 1983; Fischer et al., 1984) in ausreichender Menge synthetisiert und anhand ihres Schmelzpunktes und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Messungen charakterisiert. Die anschließende Kopplung der Benzodiazepine mit den aktivierten Zuckern führte jedoch nicht zu den gewünschten Produkten.

Dabei wurde für die Knüpfung der glykosidischen Bindung die am häufigsten eingesetzte Königs-Knorr-Synthese mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und Promotoren getestet (Ergebnisse 4.2.6, S.69). Eine mögliche Ursache für die nicht erfolgte Kopplung könnte die komplexe Struktur der Benzodiazepine sein. Durch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung entweder zwischen der Hydroxygruppe und der Ketofunktion oder zwischen der Hydroxygruppe und der Amidfunktion ist die Nukleophilie der Hydroxygruppe vermutlich soweit herabgesetzt, dass ein nukleophiler Angriff dieser Gruppe am bromidaktivierten Kohlenstoff des Zuckers nicht mehr möglich ist. Ferner können sterische Effekte für eine mangelnde Kopplung verantwortlich sein, da aufgrund des gewinkelten Ringsystems der Benzodiazepine ein Angriff der Hydroxygruppe erschwert sein kann.

Die Williamson Ethersynthese stellt eine weitere Kopplungsreaktion dar und wurde ebenfalls zur Kopplung der Komponenten im Rahmen dieser Arbeit erprobt. Bei dieser

Eintopfreaktion sollte zunächst durch eine Base die Hydroxyfunktion in ein Alkoholat überführt werden, um dann den ebenfalls geschützten Zucker mit dem entsprechenden Benzodiazepin zu koppeln. Als Basen wurden DBU (Diazabicycloundecen) oder Natriumhydroxid (Goenechea et al., 1991) eingesetzt. Die Auswahl der entsprechenden Base war von entscheidender Bedeutung, da bei zu alkalischem pH-Wert entweder das Benzodiazepin oder der Zucker zerstört werden kann. Allerdings musste die Base in der Lage sein, das Benzodiazepin in situ zu deprotonieren, um dann eine Kopplung mit dem Zucker zu ermöglichen. In beiden Ansätzen mit den oben genannten Basen konnten keine Glucuronide nachgewiesen werden. Dies könnte entweder an einer mangelnden Kopplung der Komponenten oder an einer basischen Hydrolyse der bereits entstandenen Glucuronide liegen. Bei einer Dehydratisierung der Glucuronide würde es zur Bildung von Dehydro-Glucuroniden ($\Delta_{4,5}$ -Glucuroniden) kommen (Stachulski und Jenkins 1998). Von β -Hydroxy-carbonylverbindungen, also auch von Glucuroniden, wird unter Einwirkung starker Basen oder bei hohen Temperaturen zunächst ein Proton vom CH-aciden α -Kohlenstoff abstrahiert. Die negative Ladung wird durch die Elimination eines Hydroxidions vom β -C-Atom unter Bildung einer Doppelbindung abgegeben, wodurch eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung entsteht. Dieser Vorgang ist als Folgereaktion der Aldoladdition bekannt (Christen und Vögtle 1992).

In dieser Arbeit wurde versucht, mit den für Glucuronide am häufigsten beschriebenen Synthesemethoden die Benzodiazepin-Glucuronide zu synthetisieren. Dies führte aus den oben diskutierten Gründen nicht zum Erfolg. Deshalb wurde die enzymkatalysierte Synthese der Benzodiazepin-Glucuronide als Methode der Wahl herangezogen, um die Benzodiazepin-Glucuronide als Referenzmaterial in ausreichender Menge herstellen zu können.

5.4 Glucuronidierung der Benzodiazepine mit humanen Lebermikrosomen

5.4.1 Inkubationsbedingungen

Inkubationszeit

Die Glucuronidierung beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam folgt bei einem Einsatz von 100 μg mikrosomalem Protein einem linearen Verlauf über einen Zeitraum von 4-5 h. Nach ungefähr 5-6 Stunden führt auch eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit nicht zu höheren Umsatzraten. Nach dieser Zeit könnte es durch Denaturierung zum Verlust der Funktionalität der Enzyme gekommen sein, und somit kann kein Substrat mehr umgesetzt werden. In der Literatur sind sehr unterschiedliche Inkubationszeiten beschrieben. Da die Linearität der Produktbildung mit der Zeit auch von der eingesetzten Proteinmenge und der Isoformenzusammensetzung in den Mikrosomen abhängig ist, sind die Literaturwerte untereinander und mit den in dieser Arbeit ermittelten Werte schwer vergleichbar. Inkubationen von Oxazepam wurden über einen Zeitraum von 40-50 min (Sawe et al., 1982; Patel et al., 1995b).

durchgeführt. Dabei konnten Patel et al. (1995b) eine Linearität für die Glucuronidierung von S-Oxazepam bis 40 min. belegen. Die Inkubationszeiten unterscheiden sich aber auch je nach eingesetztem Substrat. Für Acetaminophen (Court et al., 2001) und Codein (Court et al., 2003) wurden lineare Bedingungen bis zu 2 h für die Glucuronidierung von Oxazepam bis zu 6 h (Court et al., 2002) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit käuflich erworbenen HLM gearbeitet. Es ist nicht auszuschließen, dass bei selbst hergestellten Mikrosomen, wie bei der Untersuchung von Oxazepam von Patel et al. (1995b) oder auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Studien, z.B. durch eine verlängerte Aufarbeitungszeit oder durch zu hohe Temperaturen während der Aufarbeitung, die Aktivität der Enzyme schneller abnimmt. Dies könnte die beschriebene relativ kurze Linearität der Glucuronidierung von S-Oxazepam über 40 min (Patel et al., 1995b). im Vergleich zu dem in dieser Arbeit weitaus längeren linearen Verlauf dieser Reaktion erklären. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssten allerdings alle Testbedingungen miteinander verglichen werden.

pH-Wert

Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurden die größten Umsatzgeschwindigkeiten mit dem Einsatz von Tris-Puffer pH 9,0 als Reaktionsmedium erreicht. Das pH-Optimum der in den Mikrosomen enthaltenen UGTs liegt im leicht alkalischen Bereich und entspricht somit nicht dem physiologischen pH-Wert. Im Lumen des endoplasmatischen Retikulums, in dem sich das aktive Zentrum der UGT befindet, liegt ein pH-Wert von 7,1 vor (Kim et al., 1998), weshalb in einigen Studien bei diesem pH-Wert gearbeitet wurde (Fisher et al., 2000). In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass die UGTs im leicht alkalischen Bereich höhere Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen als im physiologischen Bereich (Sawe et al., 1982). Auch bei Boldt et al. (2007) lag das pH-Optimum bei pH 9,0, weshalb die Wechselwirkungsstudien mit Paracetamol und den Alkoholen dort bei pH 9,0 durchgeführt wurden.

Da der pH-Wert nicht nur Einfluss auf die Enzyme, sondern auch auf den Ladungszustand des Substrats und des Co-Substrats hat, gilt das ermittelte pH-Optimum auch immer nur für das jeweils untersuchte Substrat. Puig und Telphy (1986) ermittelten mit Lebermikrosomen der Ratte ein pH-Optimum für die Morphin-Glucuronidierung von 8,1. Sawe et al. (1982) erhielten bei den Wechselwirkungsstudien zwischen Morphin und Oxazepam für die Glucuronidierung von Morphin mit menschlichen Lebermikrosomen sogar ein Plateau konstanter Glucuronidierungsraten zwischen pH 8,5 und 10,0 und führten die Inhibitionsversuche bei pH 8,7 durch. Pacifici und Rane (1981) beschrieben, dass die Aktivität für die Morphin-Glucuronidierung kontinuierlich bis pH 9,0 anstieg. Deshalb wurde auch in der Versuchsreihe von Pacifici und Rane (1981) ein pH-Wert von 8,7 eingestellt. Auch für andere Enzyme wurde ein pH-Optimum im alkalischen Bereich beschrieben. Die Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO) haben ebenfalls ein pH-Optimum bei pH 9,0 (Lang et al., 1998), wie auch die Sulfotransferasen (Pacifi et al., 1988).

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden nicht im Bereich des pH-Optimums durchgeführt, sondern bei pH 7,4. Einerseits sollten die Versuche den physiologischen Bedingungen entsprechen und andererseits mit anderen Studien aus der Literatur besser vergleichbar sein. Wichtige Arbeiten wie die Untersuchung zur stereoselektiven Konjugation von (R,S)-Oxazepam wurden mit einem Phosphat-Puffer pH 7,5 durchgeführt (Court et al., 2002), und bei den Wechselwirkungsstudien von (R,S)-Oxazepam mit anderen Arzneistoffen wurde ein 50 mM Tris-Puffer mit pH 7,4 eingesetzt (Patel et al., 1995b).

Inkubationstemperatur

Die Temperatur hat einen wichtigen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion. In den durchgeführten Untersuchungen wurde ein Temperatur-Optimum je nach untersuchter Substanz bei ungefähr 40 °C ermittelt. Die meisten Inkubationen anderer Autoren wurden bei 37 °C durchgeführt (Sawe et al., 1982; Court et al., 2002; Jurowich et al., 2004). Dies entspricht den physiologischen Bedingungen und liegt im Bereich des in dieser Arbeit ermittelten Optimums. Deshalb wurden alle Versuche bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C durchgeführt.

UDPGA-Konzentration

Bei einer Konzentration von 8 mM UDPGA lag eine Co-Substratsättigung für die Benzodiazepin-Glucuronidierung vor. Durch weitere Zugabe von UDPGA konnte der Umsatz nicht weiter gesteigert werden. Die Optimierung der UDPGA-Konzentration zeigte, dass die UGTs teilweise einer Co-Substrathemmung unterliegen. In allen Michaelis-Menten-Diagrammen ist eine Plateau-Phase zu sehen, was für eine Co-Substratsättigung spricht, oder die Kurve sinkt leicht ab, was auf eine Co-Substrathemmung hinweist. Die ermittelten K_m -Werte für UDPGA sind für R-Oxazepam 1,70 mM und für S-Oxazepam 0,41 mM. Für Temazepam sind diese Werte fast doppelt so hoch. Die K_m -Werte sind für die R-Enantiomere höher als für die S-Enantiomere. Hieraus ist zu schließen, dass S-Oxazepam und S-Temazepam eine höhere Affinität zu den Enzymen besitzen und somit kleinere K_m -Werte als die zugehörigen R-Enantiomere aufweisen (siehe auch Diskussion 5.4.2, S.134). Die ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten für UDPGA verhalten sich wie die Umsatzgeschwindigkeiten für die Enantiomere von Oxazepam und Temazepam bei konstanter UDPGA Konzentration. Die niedrigste Umsatzgeschwindigkeit weist R-Oxazepam mit 18 ± 1 pmol/min/mg und die höchste S-Temazepam mit 66 ± 7 pmol/min/mg auf. Da es sich beim K_m -Wert um eine Konstante handelt, sollte diese auch für das Co-Substrat UDPGA bei der Umsetzung mit verschiedenen Substraten gleich sein. Dies konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestätigt werden. In der Literatur sind ebenfalls sehr unterschiedliche K_m -Werte für die jeweiligen Substrate beschrieben. Eine Studie zur Untersuchung des K_m -Wertes für UDPGA ergab bei der Umsetzung mit 1-Naphthol einen K_m -Wert von 65 μ M, mit Ethinylestradiol von 300 μ M und mit Morphin einen Wert von 700 μ M (Cappiello et al., 1991). Es ist somit anzunehmen, dass der K_m -Wert für UDPGA vom UDPGA-Akzeptor-Molekül abhängig

ist (Lin und Wong 2002), und dessen Affinität eine wichtige Rolle spielt. Ebenso verhält es sich für die Umsatzgeschwindigkeit, die, wie für die Substrate auch, von den jeweiligen Inkubationsbedingungen abhängig ist. Allerdings könnte es sich auch um Unterschiede der an der Umsetzung beteiligten Isoformen handeln.

In der Literatur wurden unterschiedliche Konzentrationen für UDPGA für die jeweiligen Studien eingesetzt. Sawe et al. (1982) untersuchten die UDPGA-Konzentration für die Glucuronidierung von Morphin bei pH 8,7. Es wurden Konzentrationen im Bereich 1,25-30 mM eingesetzt. Ab einer Konzentration von 7,5 mM UDPGA stieg die Umsatzkurve von Morphin-Glucuronid nur noch wenig an, bis ab einer Konzentration von 15 mM ein Plateau auftrat und kein weiterer Anstieg mehr erfolgte. Deshalb wurden bei den von Sawe et al. (1982) durchgeführten Versuchen eine Konzentration von 15 mM UDPGA eingesetzt. Auch Pacifici et al. (1981) setzten 15 mM ein, und in einem Versuch wurde die UDPGA-Konzentration auf 30 mM verdoppelt, was dieselben Ergebnisse erbrachte. In Experimenten aus der neueren Literatur wurden allerdings in der Regel Konzentrationen zwischen 2 und 5 mM UDPGA eingesetzt (Fisher et al., 2000; Court et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass geringere UDPGA-Konzentrationen ausreichend sind, um konstante Mengen des gewünschten Substrats umzusetzen. Da eine intraluminale UDPGA-Konzentration von 400 μ M bestimmt werden konnte (Bossuyt und Blanckaert 1994), scheint in vivo sogar eine noch geringere Konzentration an UDPGA vorzuliegen. Normalerweise wird für eine Enzymsättigung der ca. 10fache K_m -Wert als Konzentration gewählt. In dieser Arbeit wurde für alle Umsetzungen eine Konzentration von 8 mM eingesetzt, um eine Enzymsättigung zu erreichen, ohne dass eine Co-Substrathemmung vorliegt.

Einfluss weiterer Parameter

Eine Anzahl weiterer Parameter hat ebenfalls einen Einfluss auf die Enzymaktivität bei in vitro-Glucuronidierungen. Da die meisten Substrate lipophil sind, müssen sie zuvor in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden, um zum Inkubationsassay gegeben werden zu können. Dabei darf das Lösungsmittel nicht in einer Konzentration zugesetzt werden, bei der die Enzymaktivität der UDP-Glucuronyltransferasen beeinflusst wird oder das Lösungsmittel selbst zum Substrat wird (z. B. Alkohole). Andererseits muss es aber in der Lage sein, das Substrat ausreichend zu lösen. In dieser Arbeit wurde für die enzymatische Synthese eine Konzentration von 10 % Methanol eingesetzt (Kuuranne et al., 2002), die sich in Vorversuchen als maximal tolerierte Lösungsmittelkonzentration erwies. In einer in der Literatur beschriebenen Versuchsreihe zur Beeinflussung der Enzymaktivität wurden verschiedene Lösungsmittel und ihre Konzentrationen im Enzymassay getestet, unter anderem 10 % Ethanol, 10 % Methanol und 5 sowie 10 % DMSO. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Umsatzgeschwindigkeit von Morphin mit 5 % DMSO am wenigsten (20 %) herabgesetzt wurde. Mit 10 % DMSO wurde diese um 30 %, mit Methanol um 27 % und mit Ethanol um 87 % herabgesetzt. Der Einsatz von 10 % Acetonitril senkte die Umsatzgeschwindigkeit sogar um 94 % (Pacifici und Rane 1981). Da ein Zusatz von DMSO aufgrund der folgenden quantitativen Auswertung mittels HPLC nicht möglich war, da dieses zu

Verunreinigungen auf der Säule führt, wurde in dieser Arbeit mit Methanol gearbeitet. Die Versuchsreihe zur Lösungsmittelkonzentration im Assay zeigte, dass der Einsatz von 2,5 % Methanol die Umsatzgeschwindigkeit von Oxazepam und Temazepam nicht beeinflusst. Diese Methanolkonzentration war allerdings nur zur Bestimmung der enzymkinetischen Daten von Oxazepam und Temazepam notwendig, da die höheren Konzentrationen wie 750 und 1000 μM sonst nicht hätten in Lösung gebracht werden können. Für niedrigere Konzentrationen, wie sie bei den Wechselwirkungsstudien zum Einsatz kamen, war 1 % Methanol ausreichend. Diese Konzentration wurde in der Literatur unter anderem auch für den Test von Estradiol eingesetzt (Fisher et al., 2000).

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.1.3 genauer erklärt ist, ist ein weiterer wichtiger Parameter die Überwindung der Latenz. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Zusatz von Detergentien wie z.B. Brij 58 nicht nur die Membranpermeabilität beeinflusst, sondern auch die Aktivität der Enzyme erhöht (Fulceri et al., 1994; Trapnell et al., 1998). Heute werden allerdings eher porenformende Peptide wie das am häufigsten eingesetzte Alamethicin (Fisher et al., 2000) an Stelle von Detergentien für die Inkubation mit UGTs und anderen sich im Lumen befindenden Enzymen verwendet. Weitere porenformende Peptide wie z.B. das *Staphylococcus aureus* α -Toxin (Vanstapel und Blanckaert 1988b; Bossuyt und Blanckaert 1994) und das Filipin (Banhegyi et al., 1996) wurden ebenfalls in der Vergangenheit eingesetzt, um Hepatozyten und Mikrosomen zu permeabilisieren und um die UGT-Aktivität zu untersuchen. Allerdings ist Alamethicin die für Metabolismusstudien am häufigsten verwendete Substanz. Fisher et al. (2000) beschrieben eine 2-3fach höhere Glucuronidierungsrate bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein der HLM und einen 4-7fach höheren Umsatz durch die zusätzliche Zugabe von 1 mM Mg^{2+} -Ionen. Court et al. (2002) setzten für die Untersuchungen mit (R,S)-Oxazepam mit HLM und isolierten Isoenzymen ebenfalls diese Konzentration an Alamethicin ein, weshalb auch im Rahmen dieser Arbeit eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein für alle Untersuchungen verwendet wurde. Der Einsatz von Alamethicin erhöht offenbar die Permeabilität der Membran und erleichtert somit die Passage für Substrat, Co-Faktor und Produkt. Eine Beeinflussung der intrinsischen katalytischen Enzymaktivität durch Alamethicin ist in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Für die Ermittlung enzymkinetischer Parameter ist es von entscheidender Bedeutung, die wichtigsten Parameter wie Substrat- und Co-Substratkonzentration, Inkubationszeit, pH-Wert und Inkubationstemperatur zu optimieren und diese bei der Bewertung bzw. beim Vergleich der Daten mit Literaturangaben zu berücksichtigen. Außerdem können nur Daten miteinander verglichen werden, die aus denselben in vitro-Modellen gewonnen wurden.

5.4.2 K_m und V_{max} beider Enantiomere von Oxazepam und Temazepam

Bei der Inkubation von Oxazepam und Temazepam mit steigender Substratkonzentration von 10-1000 μM zeigen sowohl das Michaelis-Menten- als auch das Lineweaver-Burk-Diagramm für S-Oxazepam den typischen Verlauf einer hyperbolischen Substratsättigungskurve mit Substrathemmung. Für die Umsetzung von S-Temazepam ergab das verwendete Programm Enzyme Kinetics ebenfalls die größte Übereinstimmung mit den Daten für die Substrathemmung. Bei einer Auswertung ohne Zuhilfenahme des Programms könnte ebenfalls die einfache Michaelis-Menten-Kinetik in Frage kommen, da der Kurvenverlauf sowohl des Michaelis-Menten-Diagramms als auch des Lineweaver-Burk-Diagramms für diese Kinetik spricht. Um subjektive Schwankungen auszuschalten, wurde das mathematisch berechnete Ergebnis des Programms verwendet. Die daraus resultierenden enzymkinetischen Daten für S-Temazepam unterscheiden sich nicht für die beiden Modelle Substrathemmung und Michaelis-Menten-Kinetik. Die für S-Oxazepam und S-Temazepam im Vergleich zur Michaelis-Menten-Kinetik gewonnenen Lineweaver-Burk-Diagramme der Substrathemmung sind nicht mehr linear. Allerdings könnte diese Hemmung ebenfalls durch die gebildeten Produkte zustande kommen. Die Lineweaver-Burk-Diagramme für die Substrat- und die Produkthemmung sehen gleich aus (s. Diskussion 5.1, S.123). Die Umsetzungen der korrespondierenden R-Enantiomere sowohl bei Oxazepam als auch bei Temazepam werden am besten durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben, was sich auch im Kurvenverlauf der Diagramme widerspiegelt. In der Literatur kennzeichnen diese beiden Kinetiken ebenfalls am besten die Glucuronidierung von R- und S-Oxazepam mit humanen Lebermikrosomen (Court et al., 2002).

In dieser Versuchsreihe wurde ebenfalls (R,S)-Lorazepam mit steigender Substratkonzentration inkubiert. Lorazepam weist im Vergleich zu Oxazepam einen weiteren Chlorsubstituenten an C-2' auf (Abbildung 5.81, S.126). Zwar konnte ein Umsatz zu den Glucuroniden dokumentiert werden, dieser war allerdings so gering, dass keine enzymkinetischen Daten ermittelt werden konnten. Die Ausbeuten bei der enzymatischen Synthese belegen allerdings, dass Lorazepam mit Hilfe der Schweinelebermikrosomen in demselben Ausmaß umgesetzt wurde, wie Oxazepam und Temazepam. Die Ergebnisse mit den HLM zeigen, dass bei der Glucuronidierung der Einfluss eines Substituenten von entscheidender Bedeutung sein kann. Demzufolge müssen die Bedingungen für jedes Substrat optimiert werden. Bei in vivo Versuchen, die in der Literatur beschrieben sind, konnte gezeigt werden, dass sowohl die Glucuronidierung von Lorazepam stark gehemmt werden konnte als auch Lorazepam selbst einen starken Inhibitor darstellt. Dies deutet darauf hin, dass Lorazepam in vivo stark glucuronidiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies in vitro mit dem verwendeten Enzymassay nicht bestätigt werden.

Bei der Glucuronidierung von Lormetazepam, das im Vergleich zu Temazepam einen weiteren Chlorsubstituenten an C-2' besitzt, konnte zwar ein höherer Umsatz zu den Lormetazepam-Glucuroniden dokumentiert werden als bei Lorazepam, allerdings konnte mit dem eingesetzten Laufmittel an der HPLC keine Basislinientrennung der

diastereomeren Glucuronide von Lormetazepam erreicht werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Enzymkinetik als auch die Wechselwirkung von Oxazepam und Temazepam mit den Opiaten Morphin und Codein genauer untersucht.

In der vorliegenden Arbeit ergeben sich K_m -Werte mit humanen Lebermikrosomen mit der Charge 28 ($n = 3$) und 41207 ($n = 3$) für R-Oxazepam von 119 ± 23 und $120 \pm 32 \mu\text{M}$ und für S-Oxazepam von 29 ± 5 und $37 \pm 10 \mu\text{M}$. Für R-Temazepam ergeben sich K_m -Werte der beiden Chargen von 336 ± 38 und $370 \pm 95 \mu\text{M}$ und für S-Temazepam von 77 ± 13 und $83 \pm 8 \mu\text{M}$. Die K_m -Werte der unterschiedlichen Chargen weisen eine gute Übereinstimmung untereinander auf. Bei den V_{max} -Werten zeigte sich, dass die Charge 28 eine etwas höhere Aktivität im Vergleich zur Charge 41207 besaß. Die K_m -Werte aus den Inhibitionsversuchen mit der Charge 41207 ohne Zusatz eines Inhibitor sind alle etwas höher als die Werte, die in den Versuchen zur Optimierung der Substratkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 10-1000 μM ermittelt wurden. Dies könnte daran liegen, dass bei den Inhibitionsversuchen ohne Inhibitor nur jeweils vier Konzentrationen von Oxazepam (25, 50, 100 und 250 μM) und vier von Temazepam (50, 100, 250 und 500 μM) untersucht wurden und somit der untersuchte Konzentrationsbereich deutlich niedriger war.

Mit Hilfe der K_m -Werte können Aussagen über die Affinität zwischen einem Enzym und einem Substrat getroffen werden. Wie die Messergebnisse zeigen, schwanken diese nur wenig in Abhängigkeit von der verwendeten Charge der Lebermikrosomen, was eine gute Vergleichbarkeit auch mit Literaturwerten bedingt. Im Gegensatz zu V_{max} ist K_m von der Enzymkonzentration unabhängig. Bei den verwendeten Lebermikrosomen ist lediglich die Gesamtproteinmenge, nicht jedoch die UGT-Menge bzw. deren Aktivität bekannt. Diese kann von Charge zu Charge recht unterschiedlich sein, da sogar schon geringe Unterschiede in der Aufarbeitung eine unterschiedliche Aktivität zur Folge haben können. Die käuflich erworbenen humanen Lebermikrosomen wurden von 20 Spendern gewonnen, die aufgrund unterschiedlicher ethnischer Herkunft, Vorerkrankungen, Lebensgewohnheiten und anderen Faktoren Unterschiede in der Enzymaktivität aufweisen können. Auch die relativen Aktivitäten verschiedener Isoformen können variieren.

In der Literatur wurden für S-Oxazepam im Vergleich zu R-Oxazepam ebenfalls niedrigere K_m -Werte beschrieben. Patel et al. (1995b) fanden für S-Oxazepam einen K_m -Wert von $180 \pm 20 \mu\text{M}$ und für R-Oxazepam von $220 \pm 20 \mu\text{M}$. Dabei wurde keine Substrathemmung für R- oder S-Oxazepam festgestellt. Dies könnte an den maximal bis 500 μM eingesetzten Konzentrationen liegen. In einer Studie zur Glucuronidierung der Enantiomere von Oxazepam wurden humane Lebermikrosomen und alle kommerziell verfügbaren Isoformen mit 10-1000 μM (R,S)-Oxazepam umgesetzt (Court et al., 2002). Bei der Umsetzung mit HLM ergaben sich für S-Oxazepam K_m -Werte von 43-60 μM und für R-Oxazepam K_m -Werte von 246-303 μM . Die Affinität von S-Oxazepam zu den in den HLM vorhandenen UGTs war 4-5mal höher als die von R-Oxazepam. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Affinität von S-Oxazepam ist

um das 3-4fache höher als die von R-Oxazepam und ist daher mit den veröffentlichten Daten vergleichbar. Der von Patel et al. (1995b) ermittelte K_m -Wert zeigt für R-Oxazepam eine gute Übereinstimmung mit den von Court et al. (2002) erhobenen Daten. Für S-Oxazepam ist diese allerdings schlechter. Werden bei Untersuchungen wie der von Patel et al. (1995b) keine gepoolten Mikrosomen verwendet, ist die Aussagekraft relativ gering, weil interindividuelle Unterschiede nicht ausgeglichen bzw. gemittelt werden. Dies erklärt aber nicht die großen Unterschiede hinsichtlich des K_m -Wertes für S-Oxazepam. Die hier gewonnenen Daten für S-Oxazepam zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Daten von Court et al. (2002), die für R-Oxazepam ermittelten K_m -Werte sind allerdings um mehr als die Hälfte niedriger.

Beim Vergleich der Umsetzungen der beiden Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam in der vorliegenden Arbeit, ist festzustellen, dass die K_m -Werte für beide Enantiomere von Oxazepam niedriger sind als die K_m -Werte für Temazepam. In der Literatur wurde beschrieben, dass K_m -Werte lipophiler Substanzen niedriger sind (Kim 1991; Lin und Wong 2002). Die schlechtere Löslichkeit von Oxazepam in Methanol im Vergleich zu Temazepam und der im Vergleich zu Temazepam höhere Schmelzpunkt weisen darauf hin, dass Oxazepam lipophiler als Temazepam ist, und somit auch niedrigere K_m -Werte zeigen müsste, was experimentell im Rahmen dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte. In vivo können lipophilere Moleküle die Membran leichter überwinden. In vitro würde sich das ähnlich verhalten, dürfte aber durch den Einsatz des Membranporenbildners Alamethicin allerdings von untergeordneter Bedeutung sein.

Wie bereits bei Patel et al. (1995b) in der Literatur diskutiert, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls durch den Einsatz der racemischen Arzneistoffe (R,S)-Oxazepam und (R,S)-Temazepam ermittelt und nicht mit den einzelnen Enantiomeren. Sowohl für R- als auch für S-Oxazepam (sowie für andere Hydroxy-Benzodiazepine) wurde gezeigt, dass sie spontan mit einer Halbwertszeit von weniger als 4 Minuten in einer wässrigen Lösung bei 37 °C racemisieren (Yang und Lu 1991). Für Hydroxy-Benzodiazepine stellt deshalb der Einsatz der Racemate momentan die einzige Möglichkeit dar, diese Untersuchungen durchzuführen. Die Interpretation der Daten könnte allerdings fehlerhaft sein, da es im Versuchsverlauf entweder zu einer stereoselektiven Hydrolyse der Glucuronide, die bereits in der Literatur für R- und S-Oxazepam-Glucuronid beschrieben wurde (Vree et al., 1991), oder zu Inhibitionseffekten kommen könnte. So könnte die relativ hohe S-Oxazepam-Glucuronidierungsaktivität im Vergleich zur R-Oxazepam-Glucuronidierung mit HLM durch eine Inhibition von S-Oxazepam auf die R-Oxazepam umsetzende UGT-Isoform zustande kommen, anstatt dass es verschiedene Isoformen gibt, die bevorzugt das eine oder andere Stereoisomer umsetzen. Diese Problematik wurde für andere Arzneistoffe wie den bicyclischen Alkoholen (Bichlmaier et al., 2006b) ebenfalls diskutiert und durch den Einsatz der reinen Stereoisomere gelöst. Dies ist für die Benzodiazepine aufgrund ihrer schnellen Racemisierung nicht möglich.

5.5 UGT-Isoformen

Um die Ergebnisse aus den Inhibitionsversuchen besser interpretieren zu können, wurden alle kommerziell verfügbaren UGT-Isoformen (Experimenteller Teil 3.1.5, S.28) im Hinblick auf ihre Aktivität hin untersucht, R- und S-Temazepam zu glucuronidieren. Da dies für R- und S-Oxazepam bereits aus der Literatur bekannt ist (Court et al., 2002), wurde auf eine Untersuchung der Oxazepam glucuronidierenden Isoformen verzichtet. Experimentell konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Isoform UGT2B7 sowohl R- als auch S-Temazepam umsetzt. Die Glucuronidierung von R-Temazepam wurde von keiner anderen Isoform katalysiert. S-Temazepam dagegen wurde ebenfalls von der Isoform UGT2B15 umgesetzt. Der ermittelte K_m -Wert für R-Temazepam mit UGT2B7 ist $402 \pm 88 \mu\text{M}$, mit HLM je nach Charge 336 ± 38 und $370 \pm 95 \mu\text{M}$. Die K_m -Werte liegen somit in einem ähnlichen Bereich. V_{max} beträgt für R-Temazepam mit der Isoform UGT2B7 $62 \pm 6 \text{ pmol/min/mg}$, für die Umsetzungen mit den HLM je nach Charge 114 ± 5 und $111 \pm 12 \text{ pmol/min/mg}$. Somit ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit mit der Isoform UGT2B7 fast um die Hälfte niedriger im Vergleich zu den Untersuchungen mit den HLM. Der in dieser Arbeit ermittelte K_m -Wert für S-Temazepam mit UGT2B7 beträgt $116 \pm 22 \mu\text{M}$, die Umsatzgeschwindigkeit $25 \pm 1 \text{ pmol/min/mg}$. V_{max} ist für UGT2B7 fast fünfmal niedriger als die Umsatzgeschwindigkeit, die mit den HLM ermittelt wurde. Die Isoform UGT2B15 katalysiert ebenfalls die Glucuronidierung von S-Temazepam und hat einen K_m -Wert von $72 \pm 11 \mu\text{M}$. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit beträgt $10 \pm 0,4 \text{ pmol/min/mg}$ und ist somit fast zehnmal niedriger als die mit HLM ermittelte Umsatzgeschwindigkeit. Anhand des in den durchgeführten Versuchen ermittelten niedrigeren K_m -Wertes für die Isoform UGT2B15 konnte gezeigt werden, dass die Affinität von S-Temazepam zu dieser Isoform höher ist als die zu UGT2B7. Da die Umsatzgeschwindigkeiten mit den HLM sehr viel höher sind, wäre es durchaus möglich, dass es eine weitere UGT-Isoform in der Leber gibt, die S-Temazepam umsetzt und höhere Umsatzraten liefert.

Die Arbeitsgruppe von Court (2002) konnte erstmalig eine stereoselektive Konjugation von R- und S-Oxazepam mit humanen UGTs dokumentieren. Ihre Versuche zeigen, dass für die Umsetzung von S-Oxazepam UGT2B15 die Hauptisoform mit einem K_m -Wert von 29-35 μM ist. Dieser ist somit fast um die Hälfte geringer als der Wert mit HLM (43-60 μM). Die Umsatzgeschwindigkeiten sollten für die Isoformen sehr viel höher sein, als die mit den humanen Lebermikrosomen ermittelten Geschwindigkeiten. Die Literaturdaten weisen allerdings eine gegenteilige Tendenz auf. Court et al. (2002) beschrieben eine 5-20mal niedrigere Umsatzgeschwindigkeit für S-Oxazepam mit der Isoform UGT2B15, welche die Hauptisoform für diese Umsetzung darstellt, im Vergleich zu den mit HLM ermittelten Werten. Derselbe Trend konnte im Rahmen dieser Arbeit bei der Versuchsreihe von S-Temazepam mit der Isoform UGT2B15 festgestellt werden, bei der die Umsatzgeschwindigkeit fast 10mal niedriger war als die mit HLM ermittelten Werte.

In der Literatur ist beschrieben, dass UGT2B15-Substrate ebenfalls Substrate der Isoform UGT2B17 darstellen, da diese Isoformen über eine Homologie der Aminosäuresequenzen von 92 % verfügen (Hum et al., 1999). So werden z.B. Dihydrotestosteron und Androstan-3- α -diol sowohl von UGT2B15 als auch von UGT2B17 umgesetzt (Turgeon et al., 2001). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Temazepam, konnten keine detektierbaren Mengen an Glucuronid nach Umsetzung mit der Isoform UGT2B17 bestimmt werden. Dies entspricht den Literaturdaten für Oxazepam (Court et al., 2002) und gibt einen Hinweis darauf, dass S-Oxazepam und S-Temazepam, sowohl in vitro als auch in vivo selektiv von UGT2B15 umgesetzt werden. Court et al. (2002) zeigten weiterhin, dass S-Oxazepam zusätzlich von der Isoform UGT2B7 mit einem K_m -Wert von 202 μ M umgesetzt wird. Diese Isoform weist somit eine deutlich niedrigere Affinität im Vergleich zu UGT2B15 auf. Die Daten dieser Arbeit zeigen im Vergleich zu der Arbeit von Court et al. (2002), dass S-Temazepam eine höhere Affinität zu UGT2B7 besitzt als S-Oxazepam.

R-Oxazepam wird wie S-Oxazepam von zwei Isoformen umgesetzt, ebenfalls von UGT2B7 und von UGT1A9 (Court et al., 2002). R-Temazepam zeigte in dieser Arbeit keine Affinität zu der Isoform UGT1A9. Court et al. (2002) ermittelten mit UGT2B7 einen K_m -Wert für R-Oxazepam von 333 μ M und mit UGT1A9 einen K_m -Wert von 12 μ M.

Court et al. (2002) konnten eine stereoselektive Glucuronidierung von R- und S-Oxazepam mit den untersuchten Isoformen nachweisen, obwohl wie in Diskussion Abschnitt 5.4.2 (S.134) beschrieben, diese Ergebnisse mit dem racemischen Arzneistoff erhalten wurden. Eine stereoselektive Glucuronidierung der Benzodiazepine ist aber durchaus möglich, da für R- und S-Oxazepam-Glucuronid eine stereoselektive Dekonjugation beschrieben wurde (Vree et al., 1991). Dies wird zwar von einem anderen Enzymsystem katalysiert, zeigt allerdings, dass die Stereochemie bei Oxazepam bzw. dessen Glucuroniden eine wichtige Rolle bei der Umsetzung spielt. β -Glucuronidase aus *Escherichia coli* hydrolysiert demnach das S-Enantiomer 446mal schneller als das R-Enantiomer. Aktuelle Untersuchungen zur stereoselektiven Glucuronidierung von Epitestosteron und Testosteron wurden mit reinen Enantiomeren durchgeführt (Bichlmaier et al., 2006a). Es konnte gezeigt werden, dass UGT2B17 im Vergleich zu UGT2B7 ein außerordentlich stereoselektives Enzym darstellt. Die Glucuronidierungsraten für Epitestosteron und Testosteron waren für die R-Enantiomere sehr viel höher als für die S-Enantiomere. Sowohl die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit als auch Daten aus der Literatur (Court et al., 2002) belegen, dass UGT2B7 beide Enantiomere von Temazepam und Oxazepam umsetzt und somit im Gegensatz zu UGT2B15, das nur die S-Enantiomere von Oxazepam und Temazepam umsetzt, wenig stereoselektiv ist. Wie sich aus den Ergebnissen von Bichlmaier et al. (2006a) schließen lässt, ist die Umsetzung des bevorzugten Stereoisomers substanzspezifisch, da im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bevorzugt die R-Enantiomere umgesetzt wurden.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der oben genannten Studie (Bichlmaier et al., 2006a) war allerdings auch, dass ein Enantiomer das korrespondierende in seiner Umsetzung antagonisiert. Die Glucuronidierungsraten für die Racemate waren im Vergleich zu den reinen R-Enantiomeren signifikant niedriger. Dieser Effekt könnte auch bei der Glucuronidierung der Benzodiazepine eine Rolle spielen. Wie in der Diskussion (Abschnitt 5.4.2, S.134) erklärt, besteht keine Möglichkeit mit den reinen Enantiomeren zu arbeiten, da diese schnell racemisieren. Allerdings werden die Benzodiazepine in Arzneimitteln als Racemat verabreicht, sodass dieser Effekt in vivo ebenfalls zu erwarten ist. Die Stereochemie ist in allen Bereichen der Wirkstoffentwicklung und -forschung, insbesondere in Bezug auf mögliche Neben- und Wechselwirkungen, zu berücksichtigen, da sich die Enantiomere in ihrer Wirkung und Toxizität und auch, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, in ihrer Pharmakokinetik wesentlich unterscheiden können. Die derzeit wichtigste Gruppe von Arzneimittelleingängen bei der Food and Drug Administration (FDA) in den USA stellen einzelne Enantiomere dar (Agranat et al., 2002).

5.6 Glucuronidierung von Benzodiazepinen und Opiaten

5.6.1 Glucuronidierung der Opiate ohne Inhibitor

Die Opiate Morphin und Codein wurden mit den humanen Lebermikrosomen der Charge 41207 glucuronidiert. Anhand der ermittelten K_m -Werte konnte gezeigt werden, dass Codein die höchste Affinität zu den UGTs der HLM aufweist. Der K_m -Wert für Codein beträgt $2,8 \pm 0,38$ mM und die maximale Umsatzgeschwindigkeit $0,7 \pm 0,03$ nmol/min/mg. Der K_m -Wert für die Morphin-Glucuronidierung an Position 3 ist $7,1 \pm 0,77$ mM. Die geringste Affinität mit dem höchsten K_m -Wert ergibt sich für die Glucuronidierung von Morphin an Position 6 mit $17,2 \pm 3,06$ mM. Die bei diesen Untersuchungen höchste Umsatzgeschwindigkeit wurde für die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid gemessen und beträgt $1,5 \pm 0,09$ nmol/min/mg.

Die in dieser Arbeit ermittelten K_m -Werte für die Glucuronidierung von Codein und Morphin an Position 3 zeigen insofern eine Übereinstimmung mit den von Court et al. (2003) beschriebenen Werten, als dass Codein eine höhere Affinität zu den UGTs und somit einen niedrigeren K_m -Wert als Morphin an Position 3 aufweist (Tabelle 5.29). In der Studie von Court et al. (2003) wurden Morphin und Codein unter Verwendung von menschlichen Lebermikrosomen und mit isolierter UGT2B7 in vitro glucuronidiert. Die Inkubationen erfolgten bei 37 °C unter Verwendung von Phosphat-Puffer pH 7,5 und Alamethicin (50 µg/mg Protein). Der im Rahmen dieser Arbeit mit menschlichen Lebermikrosomen bestimmte K_m -Wert von Codein weist eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten auf (Yue et al., 1990; Court et al., 2003) (Tabelle 5.29).

Tabelle 5.29 K_m -Werte für die Glucuronidierung der Opiate aus den angegebenen Literaturstellen;
 Pos 3 = Glucuronidierung an Position 3, Pos.6 = Glucuronidierung an Position 6.

Literaturstelle	Morphin an Pos.3	Morphin an Pos. 6	Codein
Court et al. (2003)	4,3 ± 0,52 mM	2,4 ± 0,22 mM	2,6 ± 0,20 mM
Fisher et al. (2000)	5,2 ± 0,8 mM		
Yue et al. (1990)			2,21 mM
Boldt et al. (2007)	4,62 mM		9,44 mM
Meacham et al. (1986)	1,80 mM		
Pallmann (2007)	7,1 ± 0,77 mM	17,2 ± 3,06 mM	2,8 ± 0,38 mM

Der K_m -Wert für Morphin an Position 3 ist etwas höher als der sowohl von Court et al. (2003) als auch der von Fisher et al. (2000) aufgeführte Wert, weist aber dieselbe Tendenz auf. Für die Glucuronidierung von Morphin an Position 6 wurde im Rahmen dieser Arbeit ein K_m -Wert von 17,2 ± 3,06 mM ermittelt. Dieser ist deutlich höher als der von Court et al. (2003) bestimmte Wert. In vivo liegt ungefähr ein Verhältnis 10:1 Morphin-3- zu Morphin-6-Glucuronid vor (King et al., 2000a). Dieses wurde sowohl bei den in vitro-Versuchen der vorliegenden Arbeit als auch bei anderen Arbeiten aus der Literatur bestimmt (Court et al., 2003). Somit wird viel weniger Morphin-6- als Morphin-3-Glucuronid gebildet, was entweder an einer geringeren Umsatzgeschwindigkeit oder an einer niedrigeren Affinität der Hydroxygruppe an Position 6 liegen könnte, was sich wiederum in einem höheren K_m -Wert widerspiegeln würde. Dies würde den im Vergleich zur Morphin-3-Glucuronidierung weitaus höheren K_m -Wert dieser Arbeit für die Morphin-6-Glucuronidierung erklären.

Bei den Inkubationsversuchen von Meacham et al. (1986) bei einem pH-Wert von 8,5 wurde nicht zwischen Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronidierung unterschieden. Hier wurde ein K_m -Wert von 1,80 mM und eine Umsatzgeschwindigkeit von 4,05 nmol/min/mg angegeben. Die im Rahmen der Arbeit von Boldt et al. (2007) ermittelten K_m -Werte für die Opiate waren unterschiedlich. Die Affinität von Morphin an Position 3 ist höher als die von Codein, was sich in einem niedrigeren K_m -Wert für Morphin widerspiegelt. Die Glucuronidierung von Morphin an Position 6 wurde dabei nicht untersucht. Der K_m -Wert für Morphin an Position 3 betrug 4,62 mM und ist somit im Bereich der zitierten Werte. Für Codein wurde ein K_m -Wert von 9,44 mM angegeben. Dieser ist deutlich höher als die übrigen zitierten Werte. In dieser Arbeit wurde allerdings mit Brij 58 als Detergenz und nicht mit Alamethicin gearbeitet. Dies könnte einen Unterschied, z.B. in Bezug auf die Löslichkeit der Substrate, mit sich bringen. Sowohl Court et al. (2003) als auch eigene Untersuchungen belegen eine höhere Affinität von Codein als von Morphin an Position 3 zu den UGTs. Die strukturellen Einflüsse, die dafür verantwortlich sein könnten, sind in der Diskussion in Abschnitt 5.6.4 (S.145) näher erläutert.

5.6.2 Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung

Die Umsetzung der S-Enantiomere von Oxazepam und Temazepam wurde stärker als die der R-Enantiomere durch die eingesetzten Opiate Morphin und Codein gehemmt. Der K_i -Wert für Morphin für die Umsetzung von S-Oxazepam beträgt $5,3 \pm 1,12$ mM und von S-Temazepam $8,8 \pm 1,24$ mM, hingegen von R-Oxazepam $10,4 \pm 1,47$ mM und von R-Temazepam $9,4 \pm 1,37$ mM. Codein stellt sich im Vergleich zu Morphin als stärkerer Inhibitor mit entsprechend niedrigeren K_i -Werten als Morphin dar. Der K_i -Wert von Codein für die Umsetzung von S-Oxazepam beträgt $3,3 \pm 0,28$ mM und von S-Temazepam $3,9 \pm 0,44$ mM. Die K_i -Werte befinden sich mit $3,8 \pm 0,45$ mM für R-Oxazepam und $4,3 \pm 0,70$ mM für R-Temazepam in einem ähnlichen Bereich (Ergebnisse Tabelle 4.27, S.117).

Bei Inhibitionsstudien von (R,S)-Oxazepam mit verschiedenen Substraten, von denen bekannt ist, dass sie von der Isoform UGT2B7 umgesetzt werden, wurde ebenfalls eine stärkere Hemmung von S-Oxazepam als von R-Oxazepam beschrieben (Patel et al., 1995b). Die Inhibition war am stärksten durch das eingesetzte Substrat Ketoprofen, aber auch andere Substrate wie Estriol und Hyodeoxycholinsäure hemmten die Glucuronidierung von Oxazepam. In diesen Versuchen von Patel et al. (1995b) wurde Oxazepam in einer fixen Konzentration von 300 μ M eingesetzt, die Inhibitoren in den Konzentrationen 0-10 mM. Durch Messung der diastereomeren Oxazepam-Glucuronide konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von S-Oxazepam stärker als die von R-Oxazepam gehemmt wird, was zu der Annahme führte, dass R- und S-Oxazepam von verschiedenen Isoformen umgesetzt wird. Durch die stärkere Hemmung der Umsetzung von S-Oxazepam durch die oben genannten UGT2B7-Substrate wurde angenommen, dass S-Oxazepam ebenfalls ein Substrat von UGT2B7 darstellt. Erst 2002 konnte durch die Versuche der Arbeitsgruppe um Court gezeigt werden, dass beide Enantiomere zwar von unterschiedlichen Isoformen umgesetzt werden, aber S-Oxazepam nur untergeordnet ein Substrat der Isoform UGT2B7 darstellt. An der Umsetzung von R-Oxazepam sind hingegen maßgeblich die Isoformen UGT2B7 und UGT1A9 beteiligt. Damit wurde die Hypothese von Patel et al. (1995b) widerlegt, da Court et al. (2002) zeigen konnten, dass UGT2B15 die Hauptisoform für die Umsetzung von S-Oxazepam darstellt. In der Versuchsreihe von Patel et al. (1995b) wurden ebenfalls Morphin und Codein als Inhibitoren zugesetzt. Um schon bei niedrigeren Konzentrationen eine mögliche Inhibition erkennen zu können, wurde hier Oxazepam in einer Konzentration von 0,1 mM eingesetzt. Weder Morphin noch Codein zeigten eine Inhibition der Glucuronidierung von R-Oxazepam und S-Oxazepam in dieser Konzentration bei physiologischem pH-Wert. Es wurde diskutiert, dass diese Ergebnisse nicht mit anderen Versuchen aus der Literatur in Einklang zu bringen sind, die allerdings nicht bei physiologischen pH-Werten durchgeführt wurden (Sawe et al., 1982). Hier ist allerdings anzumerken, dass bei den Versuchen von Patel et al. (1995b) die Inhibition der Oxazepam-Glucuronidierung durch unterschiedliche Inhibitoren untersucht wurde. (R,S)-Oxazepam wurde in einer fixen Konzentration eingesetzt und die Inhibitoren in einer Konzentration von 0-10 mM zugegeben. Bei den zitierten Studien (Pacifci und

Rane 1981; Sawe et al., 1982) wurde hingegen die Inhibition der Glucuronidierung von Morphin durch Oxazepam als Inhibitor, also der gegenteilige Aspekt, untersucht. Hier wurde Morphin in einer fixen Konzentration und Oxazepam als Inhibitor in einem Konzentrationsbereich von 0,015-3,0 mM zugesetzt. Patel et al. (1995b) konnten in ihren Versuchen keine Inhibition der Umsetzung von Oxazepam durch Morphin oder Codein feststellen, jedoch hemmten andere Arzneistoffe, bevorzugt UGT2B7-Substrate wie Ketoprofen, die Glucuronidierung von S-Oxazepam ebenfalls stärker als die von R-Oxazepam. Die Ergebnisse von Patel et al. (1995b) können insofern mit den Resultaten aus dieser Arbeit in Beziehung gebracht werden, als dass bei den hier durchgeführten Inhibitionsstudien ebenfalls die Hemmung der Umsetzung der S-Enantiomere der Benzodiazepine stärker ist als die der zugehörigen R-Enantiomere.

Die Opiat-Glucuronidierung erfolgt hauptsächlich durch die Isoform UGT2B7 (Kirkwood et al., 1998; Lin und Wong 2002; Takeda et al., 2005). Court et al. (2002) beschreiben für die Glucuronidierung von S-Oxazepam mit UGT2B7 eine sehr geringe, erst bei einer Konzentration von 1000 μM messbare Umsetzung von S-Oxazepam. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch S-Temazepam, zwar ebenfalls untergeordnet, aber mit einer höheren Affinität als S-Oxazepam, von der Isoform UGT2B7 umgesetzt wird. Die Hauptisoform für die Umsetzung von S-Oxazepam und S-Temazepam stellt die Isoform UGT2B15 dar. UGT2B7 ist hingegen die Hauptisoform für die Umsetzung der R-Enantiomere, dennoch werden die Umsetzungen der S-Enantiomere stärker durch die UGT2B7-Substrate Morphin und Codein inhibiert als die der R-Enantiomere. Möglicherweise kommt die Inhibition durch die S-Glucuronide von Oxazepam und Temazepam zustande (s. Diskussion 5.1, S. 123). Eine Hemmung durch Glucuronide wurde bereits in der Literatur auch für andere Glucuronide beschrieben. Ketoprofen ist wie oben beschrieben ein starker Inhibitor von Glucuronidierungsreaktionen (Olson et al., 1992). Es wurde eine irreversible Inhibition durch kovalente Bindung des Acyl-Glucuronids an eine Schlüsseldomäne des Enzyms beschrieben. Bei den Benzodiazepinen könnte daher ebenfalls eine stärkere Hemmung der Enzyme durch die S-Glucuronide im Gegensatz zu den R-Glucuroniden hervorgerufen werden. In der Diskussion in Abschnitt 5.4.2 (S.134) wurde bereits die Problematik des Einsatzes von racemischen Arzneistoffen diskutiert. Bei der Umsetzung von S-Oxazepam kam es ab einer Konzentration von 250 μM und bei S-Temazepam ab 500 μM zu einer Hemmung (Diskussion 5.4.2, S.134). Durch den Einsatz niedrigerer Konzentrationen von Oxazepam und Temazepam wurde versucht, die Substrathemmung zu verhindern. Bei einer Produkthemmung könnten die Glucuronide der S-Benzodiazepine im Gegensatz zu denen der R-Benzodiazepine bei einer erhöhten Konzentration an umgesetzten Substraten an eine regulatorische Stelle des Enzyms binden und so die Aktivität des Enzyms herabsetzen. Die Inhibition der Glucuronidierung der S-Enantiomere von Hydroxy-Benzodiazepinen könnten bei allen Wechselwirkungsstudien mit anderen Arzneistoffen höher sein, als die der R-Enantiomere, da sie von den S-Glucuroniden selbst verursacht wird und somit nicht auf einer Hemmung durch andere Arzneistoffe beruht.

5.6.3 Benzodiazepine als Inhibitoren der Opiat-Glucuronidierung

Auch umgekehrt konnte eine Hemmung der Glucuronidierung von Opiaten durch die Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam festgestellt werden. Bei Morphin wurde sowohl die Hemmung der Glucuronidierung zu Morphin-3- als auch die zu Morphin-6-Glucuronid untersucht. Die Umsetzung von Codein wird durch Oxazepam und Temazepam sehr viel stärker gehemmt, als die Umsetzung von Morphin an Position 3 und Position 6. Somit hat Oxazepam mit $179 \pm 24 \mu\text{M}$ den niedrigsten K_i -Wert für die Glucuronidierung von Codein, Temazepam hemmte diese Umsetzung etwas weniger stark mit einem K_i -Wert von $265 \pm 38 \mu\text{M}$. Der K_i -Wert von Oxazepam für die Glucuronidierung von Morphin an Position 3 beträgt $590 \pm 123 \mu\text{M}$ und an Position 6 $1026 \pm 244 \mu\text{M}$. Für Temazepam ergibt sich ein K_i -Wert von $381 \pm 41 \mu\text{M}$ für Position 3 und von $375 \pm 39 \mu\text{M}$ für Position 6. Temazepam hemmt demnach die Umsetzung von Morphin zu Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid in ungefähr demselben Ausmaß. Oxazepam dagegen hemmt die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid fast doppelt so stark wie die Umsetzung zu Morphin-6-Glucuronid (Ergebnisse Tabelle 4.28, S.117).

R-Oxazepam wird unter anderem durch die Isoform UGT1A9 umgesetzt (Court et al., 2002). Eine Umsetzung von R-Tamazepam durch diese Isoform konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden (Ergebnisse 4.5.1, S.92, Diskussion 5.5, S.137). Die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-3-Glucuronid erfolgt untergeordnet unter anderem durch die Isoform UGT1A9. Diese ist jedoch nicht an der Umsetzung zu Morphin-6-Glucuronid beteiligt (Court et al., 2003; Stone et al., 2003b). Durch eine Konkurrenz an dieser UGT-Isoform könnte die Glucuronidierung von Morphin stärker von Oxazepam an Position 3 als die Glucuronidierung an Position 6 gehemmt werden. Der relativ zur Morphin-6-Glucuronidierung niedrigere K_i -Wert für die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid lässt sich somit durch die Konkurrenz an der Isoform UGT1A9 erklären.

Die Umsetzung von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid (M6G) erfolgt hauptsächlich durch die Isoform UGT2B7 (Court et al., 2003; Stone et al., 2003a). Temazepam ist ebenfalls Substrat der Isoform UGT2B7 und hat im Vergleich zu Oxazepam eine höhere Affinität. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass Temazepam die Morphin-Glucuronidierung an Position 3 und 6 ungefähr gleich stark hemmt, aber in beiden Fällen stärker als Oxazepam. Da Temazepam keine Affinität zur Isoform UGT1A9 zeigt, kommt es hier vermutlich nur an der Isoform UGT2B7, die Morphin sowohl an Position 3 als auch an Position 6 umsetzt, zu einer Konkurrenz um das aktive Zentrum. Da aber Temazepam eine höhere Affinität zu UGT2B7 besitzt als Oxazepam (Diskussion 5.5, S.137), sollte Temazepam die Glucuronidierung von Morphin, sowohl an Position 3 als auch an Position 6, stärker inhibieren als Oxazepam. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch experimentell gezeigt werden.

Oxazepam hemmt die Codein-Glucuronidierung stärker als Temazepam. Die Umsetzung von Codein wird von beiden Benzodiazepinen stärker gehemmt als die von Morphin, sowohl zu M3G als auch zu M6G. Codein wird durch zwei Isoformen in

gleichem Maße umgesetzt, und zwar von UGT2B7 und UGT2B4 (Court et al., 2003). An der Umsetzung von Morphin zu Morphin-3-Glucuronid ist hauptsächlich die Isoform UGT2B7 beteiligt, allerdings haben bei den Untersuchungen von Court et al. (2003) viele Isoformen die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid katalysiert. Bei Codein kann bei einer Hemmung der Isoform UGT2B7 nur eine Isoform den Metabolismus übernehmen bei Morphin könnten dies mehrere Isoformen leisten. Das könnte die stärkere Hemmung von Codein im Vergleich zu Morphin erklären.

Der Einfluss von Benzodiazepinen, insbesondere von Oxazepam als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Pacifci und Rane 1981; Sawe et al., 1982; Meacham et al., 1986). Die Quantifizierung beruhte überwiegend darauf, dass ^{14}C -Morphin in den Inkubationsassays eingesetzt wurde, und das so in die Glucuronide eingebaute ^{14}C -Morphin bestimmt wurde. Aus diesem Grund konnte bei diesen Versuchen nicht zwischen der Hemmung der Glucuronidierung zu Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid unterschieden werden. Hier wurde also die Gesamtglucuronidierung von Morphin erfasst. Studien mit fetalen Lebermikrosomen (Pacifci und Rane 1981) befassten sich mit der Inhibition der Morphin-Glucuronidierung durch Zugabe von Salicylamid oder Oxazepam als Inhibitor. Bei einer Zugabe von 0,3 mM Oxazepam wurde die Glucuronidierung von Morphin um 50 % gehemmt. Dabei erwies sich Oxazepam als kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von 200 μM . Salicylamid war dagegen als Inhibitor mehr als 100-fach wirksamer als Oxazepam, und erwies sich als unkompetitiver Hemmstoff. Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche mit humanen Lebermikrosomen, die von Nierenspendern mit Hirninfarkt oder von Patienten mit einer durch Bauchspeicheldrüsenkrebs verursachten Gelbsucht erhalten wurden (Sawe et al., 1982). Bei einer Konzentration von ebenfalls 0,3 mM Oxazepam wurde hier die Morphin-Glucuronidierung um 35 % gehemmt. Bei den von Sawe et al. (1982) und Pacifci und Rane (1981) beschriebenen Untersuchungen hemmte Oxazepam die Glucuronidierung von Morphin stärker als in dieser Arbeit ermittelt wurde. Sowohl bei Sawe et al. (1982) als auch in dieser Arbeit wurden die Konzentrationsverhältnisse von Morphin und Oxazepam so gewählt, dass sie ca. 10:1 (Morphin/Oxazepam) waren. Allerdings ist zu beachten, dass in den bereits erwähnten Publikationen nicht zwischen Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronidierung unterschieden wurde. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche alle bei physiologischem pH-Wert erfolgten. Pacifci und Rane (1981) und Sawe et al. (1982) führten ihre Versuche bei pH 8,7 durch. Wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist hier die Aktivität der UGTs deutlich höher im Vergleich zum physiologischen pH-Wert (Diskussion 5.4.1, S.129). Eine aktuelle Studie von Hara et al. (2007), die bei physiologischem pH-Wert durchgeführt wurde, zeigte, dass die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-3-Glucuronid (M3G) und zu Morphin-6-Glucuronid (M6G) durch viele chemisch unterschiedliche Arzneistoffe stark inhibiert wird, unter anderem auch durch die Benzodiazepine Diazepam, Lorazepam und Oxazepam. Oxazepam erwies sich in der Arbeit von Hara et al. (2007) bei der Inhibition der Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid als kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von 519 μM und bei der

Umsetzung zu Morphin-6-Glucuronid als gemischter Inhibitor mit einem K_i -Wert von $41 \mu\text{M}$ (Diskussion 5.6.5, S.148). Die Ergebnisse von Hara et al. (2007) zeigen, dass die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid von den meisten Arzneistoffen stärker inhibiert wird als die Glucuronidierung zu Morphin-3-Glucuronid. Diazepam und Lorazepam hatten eine stärker inhibierende Wirkung als Oxazepam. Der in der Studie von Hara et al. (2007) ermittelte K_i -Wert von Oxazepam für die Umsetzung zu Morphin-3-Glucuronid von $519 \mu\text{M}$ stimmt gut mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von $590 \pm 123 \mu\text{M}$ überein. Der K_i -Wert für die Umsetzung zu Morphin-6-Glucuronid war mit $1026 \pm 244 \mu\text{M}$ mehr als 20mal so hoch.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die Untersuchungen mit humanen Lebermikrosomen im Gesamteffekt, dass die Glucuronidierung von Codein sowohl von Oxazepam als auch von Temazepam stärker gehemmt wird als die von Morphin. Bei einer gleichzeitigen Einnahme von Benzodiazepinen und Opiaten könnte es somit zu einer verlängerten Wirkung der beiden Substanzklassen kommen, da auch die Umsetzung der Benzodiazepine ihrerseits von den Opiaten gehemmt wird und somit deren Ausscheidung verlangsamt wird. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Konkurrenz an den Isoformen UGT2B7 und UGT1A9 eine entscheidende Rolle spielt. Um die Verhältnisse an den jeweiligen Isoformen genauer zu klären, müssten Wechselwirkungsstudien mit allen an der Glucuronidierung, beteiligten Isoformen durchgeführt werden, sowohl der Opiate als auch der Benzodiazepine.

5.6.4 Vergleich struktureller Einflüsse der Substanzen

Opiate

Für die Umsetzung von Codein konnte im Rahmen dieser Arbeit ein niedrigerer K_m -Wert als für die Umsetzung von Morphin bestimmt werden. Codein hat somit eine höhere Affinität zu den UGTs als Morphin, sowohl bei der Glucuronidierung an Position 3 als auch an Position 6. Es könnte sein, dass die nichtphenolische OH-Gruppe an der Position 6 des Codeins besser ins katalytische Zentrum der UGTs passt als die freie phenolische OH-Gruppe an Position 3 des Morphins. Diese Hypothese wird durch die Untersuchungen von Court et al. (2003) unterstützt, die sehr ähnliche K_m -Werte für die Umsetzung von Codein ($K_m = 2,6 \text{ mM}$) und die Umsetzung von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid ($K_m = 2,4 \text{ mM}$) bestimmten. Die Affinität der Hydroxygruppe an Position 6 sowohl bei Codein als auch bei Morphin zu den UGTs scheint vergleichbar zu sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Codein in sehr ähnlichem Ausmaß glucuronidiert ($K_m = 2,8 \pm 0,38 \text{ mM}$), allerdings kann der niedrige K_m -Wert bei der Umsetzung von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid nicht bestätigt werden. Die höhere Affinität von Codein im Vergleich zu Morphin an Position 3, wie sie auch von Court et al. (2003) beschrieben wurde ($K_m = 4,3 \text{ mM}$), konnte im Rahmen dieser Arbeit mit einem K_m -Wert von $7,1 \pm 0,77 \text{ mM}$ experimentell bestätigt werden.

Die Glucuronidierung von Codein wurde sehr viel stärker durch die eingesetzten Benzodiazepine gehemmt als die von Morphin (Tabelle 4.28, S.117). Die bereits oben

erwähnte Studie von Hara et al. (2007) zeigte, dass 10 der 21 untersuchten Substrate, darunter auch Oxazepam, die Glucuronidierung von Morphin zu Morphin-3- und zu Morphin-6-Glucuronid stark inhibieren. Die Glucuronidierung zu Morphin-6-Glucuronid wird allerdings sehr viel stärker als die zu Morphin-3-Glucuronid durch die zehn Inhibitoren gehemmt. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Hypothese, dass die nichtphenolische OH-Gruppe an Position 6 eine höhere Affinität zu den Enzymen aufweist.

Eine andere Möglichkeit könnte die höhere Lipophilie durch die Methoxygruppe an Position 3 im Codein sein. Wie unter Punkt 5.4.2 genauer erklärt, haben lipophilere Substanzen eine höhere Affinität zu den UGTs (Kim 1991; Lin und Wong 2002).

Benzodiazepine

Um zu klären, welche funktionellen Gruppen der Benzodiazepine einen Einfluss auf die Affinität zu den UGTs besitzen, wurde von Vega et al. (1984) eine Studie zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung mit verschiedenen Benzodiazepinen durchgeführt. Dabei wurde der inhibierende Effekt verschiedener Benzodiazepine mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf die Glucuronidierung von Morphin, Aminopyrin und Östron untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Morphin-Glucuronidierung von den Benzodiazepinen am stärksten gehemmt wurde, die einen Halogensubstituenten an C-2` (z.B. Lorazepam), eine Methylgruppe am N-1 (z.B. Temazepam) und einen Methylsubstituenten an Stelle einer Ketogruppe an C-3 aufweisen (Abbildung 5.81, S.126). Dabei zeigte Oxazepam keinen signifikanten Inhibitionseffekt im Gegensatz zu Lorazepam, das sich von Oxazepam nur durch die Chlorsubstitution an C-2` unterscheidet. Auch in anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lorazepam die Glucuronidierung von Morphin fast doppelt so stark hemmt wie Oxazepam (Meacham et al., 1986), wobei bei einem anderen Substrat, dem Ciramadol, die K_i -Werte für Lorazepam und Oxazepam nahe beieinander liegen, d.h. das Ausmaß der Inhibition sehr ähnlich ist. Temazepam wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ebenfalls Lorazepam und Lormetazepam eingesetzt werden, um Aussagen über die einzelnen Substituenten treffen zu können. Mit dem für Oxazepam und Temazepam optimierten Assay konnte nur ein sehr geringer Umsatz von Lorazepam zu den Lorazepam-Glucuroniden dokumentiert werden, die sich nicht quantifizieren ließen. Bei Vorversuchen mit Lormetazepam wurden deutlich höhere Umsatzraten zu den Glucuroniden festgestellt, allerdings war hier eine Quantifizierung durch die fehlende Basislinientrennung der diastereomeren Lormetazepam-Glucuronide bei der Bestimmung mittels HPLC nicht möglich. Temazepam weist höhere Umsatzraten auf als Oxazepam und Lormetazepam als Lorazepam. Daraus könnte man ableiten, dass die Methylgruppe am Stickstoff höhere Umsatzraten begünstigt.

Die Vielzahl an Substituenten bei den Benzodiazepinen macht es allerdings schwer, den Einfluss der einzelnen Substituenten darzustellen. Bei Wechselwirkungsstudien wird dies noch komplexer. Generell zeigen die Ergebnisse von Vega et al. (1984), dass polare Benzodiazepine wie Oxazepam mit einer Hydroxygruppe an C-3 oder Chlordiazepoxid

mit einem N-Oxid einen niedrigeren Inhibitionseffekt bei den Reaktionen aufwiesen als weniger polare. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Morphin-Glucuronidierung sowohl an Position 3 als auch an Position 6 von Temazepam stärker gehemmt wird als von Oxazepam. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen Oxazepam und Temazepam besteht in der Methylsubstitution am Stickstoff bei Temazepam (Abbildung 5.81, S.126). Diese Tatsache ist mit der oben erwähnten Untersuchung von Vega et al. (1984) in Übereinstimmung zu bringen, bei der Benzodiazepine mit einer Methylgruppe am N-1 sich als stärkere Inhibitoren erwiesen. Allerdings wurde bei den eigenen Experimenten die Glucuronidierung von Codein durch Oxazepam stärker gehemmt als durch Temazepam. Das unterstreicht noch einmal die Tatsache, dass die strukturellen Einflüsse von Inhibitoren immer in Verbindung mit dem jeweiligen Substrat zu betrachten sind und die Beteiligung unterschiedlicher Isoformen in Betracht gezogen werden muss.

Stereochemie der Benzodiazepine

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit Benzodiazepinen wurde die Umsetzung der S-Enantiomere sehr viel stärker durch die Opiate Codein und Morphin gehemmt als die der zugehörigen R-Enantiomere. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Patel et al. (1995b) überein. Hier wurde fast ausschließlich die Glucuronidierung von S-Oxazepam durch die eingesetzten Arzneistoffe gehemmt. Die Stereochemie der untersuchten enantiomeren Benzodiazepine scheint einen großen Einfluss auf die Affinität zu den UGT-Isoformen zu haben. Es ist anzunehmen, dass die Hydroxygruppe der S-Enantiomere der Benzodiazepine bevorzugt im katalytischen Zentrum platziert werden kann, da sowohl S-Oxazepam als auch S-Temazepam einen niedrigeren K_m -Wert im Vergleich zu den R-Enantiomeren aufweisen. Welches Stereoisomer bevorzugt wird, scheint allerdings vom jeweiligen Substrat und der jeweiligen Isoform abhängig zu sein. Bei Epitestosteron und Testosteron wurden die R-Enantiomere von UGT2B17 favorisiert (Bichlmaier et al., 2006a), im Rahmen dieser Arbeit die S-Enantiomere von UGT2B15. UGT2B15 und UGT2B17 scheinen im Vergleich zu UGT2B7 äußerst stereoselektive Isoenzyme zu sein (Diskussion 5.5, S.137).

In jüngerer Zeit wird zunehmend versucht, auch für die UGTs durch in silico Versuche quantitative Struktur-Metabolismus Beziehungen (QSMR = Quantitative Structure Metabolism Relationship) zu entwickeln. Für viele Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs) wurden 2D- und 3D-QSMRs entwickelt, die Einblicke in strukturelle Möglichkeiten von Arzneistoffen geben und Vorhersagen über K_m -Werte (bei Inhibitoren K_i -Werte) erlauben (Miners et al., 2004). Allerdings sind diese Voraussagen bei den UGTs, sowohl in vitro als auch in silico sehr viel schwieriger im Vergleich zu den CYPs. Die UGTs haben eine weitaus höhere Substratüberlappung und eine geringere Isoformselektivität. Deshalb sind nach wie vor in vitro-Versuche unerlässlich, um eine mögliche Inhibition zu dokumentieren.

5.6.5 Hemmtyp

Von wesentlichem Interesse ist ebenfalls, welcher Hemmtyp den Inhibitionsversuchen zugrunde liegt. Die beste Übereinstimmung der Daten unter Verwendung des Programms Enzyme Kinetics bei allen Inhibitionsversuchen liegt beim kompetitiven Inhibitionstyp vor. Wie sich in den Lineweaver-Burk-Diagrammen zeigt (Ergebnisse 4.6.2 und 4.6.3, S.100-112), schneiden sich alle Geraden nahezu auf der Ordinate, was typisch für den kompetitiven Hemmtyp ist. Um allerdings sicher ein Inhibitionsmodell zu bestimmen, müssen die Zahlenwerte der zu jedem Modell errechneten AIC_c (Experimenteller Teil 3.10.3, S.46) um mindestens den Faktor 3 auseinander liegen. Dies ist bei keinem Modell der Fall. Aufgrund der ermittelten AIC_c -Werte kann sicher nur eine unkompetitive Hemmung ausgeschlossen werden. Die AIC_c -Werte für die Modelle vom gemischten, nicht-kompetitiven und kompetitiven Hemmtyp liegen meistens sehr nahe beieinander. Durch den Schnittpunkt aller Geraden auf der Ordinate in den Lineweaver-Burk-Diagrammen kann jedoch der nicht-kompetitive Hemmtyp ebenfalls sicher ausgeschlossen werden, bei dem der Schnittpunkt auf der Abszisse liegt. Bei allen Inhibitionsversuchen ist r^2 beim kompetitiven Hemmtyp am höchsten. Deshalb wurde bei der Berechnung der enzymkinetischen Parameter der kompetitive Hemmtyp zugrunde gelegt.

Die Opiate werden bevorzugt von der Isoform UGT2B7 umgesetzt (Kirkwood et al., 1998; Lin und Wong 2002; Takeda et al., 2005). Diese Isoform setzt ebenfalls R- und S-Oxazepam um (Court et al., 2002) und zeigt auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, dass die Umsetzung sowohl von R- als auch von S-Temazepam katalysiert wird. Diese Isoform scheint demnach eine zentrale Rolle bei den hier durchgeführten Inhibitionsstudien einzunehmen (Diskussion 5.6.3, S.143). An der Isoform UGT2B7 kann es zu einer direkten Konkurrenz der Substrate um die Enzymbindungsstelle kommen, d.h. zu einer kompetitiven Hemmung. In der Literatur wurde ebenfalls der kompetitive Hemmtyp für die Hemmung der Morphin-Glucuronidierung durch Oxazepam beschrieben (Pacifci und Rane 1981; Sawe et al., 1982; Meacham et al., 1986), allerdings wurde hier nicht die Glucuronidierung von Morphin an Position 3 und Position 6 unterschieden. Dies wurde von Hara et al. (2007) berücksichtigt. In dieser Studie erwies sich Oxazepam als kompetitiver Inhibitor der Morphin-3-Glucuronidierung und als gemischter Inhibitor der Morphin-6-Glucuronidierung. Da die Umsetzung von Morphin zu Morphin-6-Glucuronid hauptsächlich von UGT2B7 katalysiert wird, wäre eine Konkurrenz von Morphin mit R- und S-Oxazepam und R- und S-Temazepam um das aktive Zentrum dieser Isoform sehr wahrscheinlich, woraus der kompetitive Hemmtyp resultieren würde. Dieser Hemmtyp wurde ebenfalls für die Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte für alle Wechselwirkungsstudien der kompetitive Hemmtyp bestimmt werden. Es ist aber anzumerken, dass im Rahmen dieser Arbeit mit einem Enzymgemisch gearbeitet wurde und daher nur Aussagen über den Gesamteffekt gemacht werden können. Demzufolge kann nur rein hypothetisch angenommen werden, an welcher Enzymisoform eine Konkurrenz um die Bindungsstelle erfolgt, bzw. welcher

Hemmtyp der bedeutendste, ohne Berücksichtigung der Isoformen, ist. Allerdings muss eine Inhibition nicht immer spezifisch an einem Enzym erfolgen, sondern kann auch oder zusätzlich unspezifisch sein, z.B. durch kovalente Bindung (Proteinbindung) an die UGT. Ein potenter Inhibitor eines Enzyms muss nicht zwangsläufig ein gutes Substrat desselben Enzyms sein. Dies wurde bereits in der Literatur für Tacrolimus beschrieben, das selbst kein Substrat für UGT darstellt (Zucker et al., 1997; Zucker et al., 1999). Auch in der Arbeit von Boldt et al. (2007) wurde eine Inhibition zwischen Paracetamol und den Opiaten beschrieben, obwohl Paracetamol von anderen Isoformen als die Opiate umgesetzt wird. In vivo liegen alle UGT-Isoformen vor, weshalb die Untersuchungen mit humanen Lebermikrosomen diese Verhältnisse besser widerspiegeln als Untersuchungen mit den exprimierten Isoformen. Um die Verhältnisse an einem Enzym zu klären, müssen allerdings Untersuchungen mit den einzelnen Isoformen durchgeführt werden. Somit stellen die Untersuchungen mit den einzelnen Isoformen und den HLM eine gegenseitige Ergänzung dar.

5.7 Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo

Generell steigt die Beeinflussung von Arzneistoffen durch Enzyminduktion oder -inhibition mit dem Grad ihrer Glucuronidierung (Lin und Wong 2002). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsversuchen konnten Interaktionen zwischen den Benzodiazepinen Oxazepam und Temazepam und den Opiaten Morphin und Codein in vitro nachgewiesen werden. Eine Interaktion auch in vivo, ist somit wahrscheinlich. Allerdings ist es ebenfalls möglich, dass ein Effekt, der in vitro auftritt, in vivo nicht relevant bzw. von untergeordneter Bedeutung ist. Teilweise sind die in der Literatur beschriebenen K_i -Werte für manche Inhibitoren sehr viel höher als die Konzentrationen, die unter normalen therapeutischen Verhältnissen im Plasma erreicht werden. Die Konzentrationen lipophiler Arzneistoffe sind aber in den Geweben häufig deutlich höher als im Plasma. Außerdem muss erwähnt werden, dass die Glucuronidierung nicht im Plasma stattfindet, sondern im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Lumen), und dort vorliegende Konzentrationen sich ebenfalls von denen im Plasma deutlich unterscheiden können. Wichtig für die Dateninterpretation wäre es, die Konzentrationen der Arzneistoffe und ihrer Glucuronide im ER-Lumen zu kennen bzw. zu bestimmen, um diese in die Interpretation mit einbeziehen zu können. Über die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen liegen diesbezüglich keinerlei Literaturangaben vor. Um überhaupt Vergleiche zu Konzentrationen in vivo ziehen zu können, sollen hier die Plasmakonzentrationen der eingesetzten Substrate aufgezeigt werden.

Plasmamorphinkonzentrationen von Patienten nach einer Standarddosis dieses Arzneistoffes überschreiten selten Konzentrationen von 1 μM (Cepeda et al., 2001). Morphin-konzentrationen im Plasma von Patienten mit Tumorschmerzen sind allerdings sehr viel höher. Auch bei einer toxischen bis komatösen Konzentration wurden weitaus höhere Plasmakonzentration von Morphin zwischen 0,3 und 14 μM (Schulz und Schmoldt 2003) bestimmt. Für Codein liegen die therapeutischen Konzentrationen zwischen 0,08 und 0,8 μM und toxische Konzentrationen im Bereich von 1,7-3,4 μM

(Skeith und Brocks 1994; Schulz und Schmoldt 2003). Die therapeutischen Konzentrationen für Oxazepam liegen in einem Bereich von 0,7 bis 5,3 μM , Konzentrationen, die für eine Intoxikationen verantwortlich sein können, bei 10,5-17,5 μM (Divoll et al., 1981; Schulz und Schmoldt 1994; Klotz und Laux 1996; Schulz und Schmoldt 2003). Die beschriebenen Plasmakonzentrationen für Temazepam liegen je nach verabreichter Dosis (10-30 mg) und nach dem Zeitpunkt der Blutentnahme nach Verabreichung (0,5-5 Stunden) zwischen 0,7 und 3,3 μM (Greenblatt et al., 1983). In einem Fallbericht wurden sogar komatös wirkende Konzentrationen von 27 und 46 μM beschrieben (Forrest et al., 1986; Klotz und Laux 1996; Regenthal et al., 1999; Uges 2002). Die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen für alle Substrate sind sehr viel höher als sie in vivo im Plasma vorliegen, da sonst kein Effekt messbar wäre. Diese Problematik stellte sich auch schon anderen Experimentatoren. Die Limitierung der Sensivität des derzeit verwendeten Morphin-Glucuronidierungsassays verhindert ebenfalls solch eine Analyse in dieser und in anderen in der Literatur beschriebenen Studien (Court et al., 2003; Kiang et al., 2005).

Ein weiterer kritischer Punkt bei UGT-Assays ist der bereits ausführlicher beschriebene Einsatz von oberflächenaktiven Stoffen bzw. die Überwindung der Latenz (Einleitung 1.1.3, S.3). Telphy und Burchell (1990) entwickelten das allgemein anerkannte Modell für UGTs, bei dem das aktive Zentrum der UGT-Proteine im ER-Lumen lokalisiert ist. Von Clarke und Burchell (1994) wurden dazu zwei Transportsysteme beschrieben, um hydrophile Substanzen auf die aktive Seite der UGT zu bringen bzw. von dort wieder abtransportieren zu können. Eines, um UDPGA, das im Cytoplasma synthetisiert wird, in das Lumen zu bringen, und das andere, um die Glucuronide vom Lumen ins Cytoplasma zu transportieren. Die Substrate können aufgrund ihrer Lipophilie die Membran ohne Transporter passieren. Weitere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass UDPGA und die Glucuronide denselben Transporter teilen (Banhegyi et al., 1996). Bei Mikrosomen handelt es sich um Bruchstücke des Endoplasmatischen Retikulums, die Vesikel bilden. In vivo liegen keine Vesikel vor. Da bei unbehandelten Mikrosomen kaum Umsatzraten messbar waren, wurden Substanzen eingesetzt, um die Membran zu permeabilisieren. Es ist daher anzunehmen, dass Transportsysteme, wie sie in vivo vorliegen, in vitro deutlich schlechter oder gar nicht mehr funktionsfähig sind. Die Transportverhältnisse und auch damit verbundene Limitierungen sind in vitro somit von denen in vivo verschieden. Durch den Einsatz von Alamethicin können Substrat, Co-Substrat und die Glucuronide ungehindert die Membran passieren. Außerdem werden die glucuronidierten Substrate in vivo mit Hilfe eines Transporters aus dem ER-Lumen eliminiert und von dort abtransportiert, was bei dem gewählten in vitro-Modell nicht möglich ist. Sie akkumulieren im Reaktionsmedium bzw. im Vesikelinneren, was ebenfalls zur Hemmung der Enzymaktivität führen könnte.

Weitere Limitierungen der in vitro-Modelle sind die Plasmaproteinbindungen der Substanzen, der fehlende hepatische Blutfluss und die nichtspezifische mikrosomale

Bindung von Substrat und Inhibitor, abhängig von der mikrosomalen Proteinkonzentration (Terrier et al., 1999; Venkatakrishnan et al., 2003).

In der Literatur sind wenig in vivo Phase-II-Interaktionsstudien der Benzodiazepine mit anderen Arzneistoffen beschrieben. Bei einer in vivo Studie zwischen Lorazepam und Valproinsäure, die ebenfalls ein UGT2B7-Substrat darstellt, konnte eine Inhibition der Glucuronidierung von Lorazepam anhand der erhöhten Lorazepamplasmakonzentration und der verminderten Lorazepam-Glucuronid-Konzentration im Urin dokumentiert werden (Anderson et al., 1994; Samara et al., 1997). Diese Interaktion wurde ebenfalls für das Koma einer Epileptikerin verantwortlich gemacht (Lee et al., 2002). Diese Studien zeigen, dass in vivo durchaus Interaktionen im Phase-II-Metabolismus eine Rolle spielen.

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in vivo noch viele weitere Faktoren die Glucuronidierung von Arzneistoffen beeinflussen können (de Leon 2003). Bei ca. 10 % der kaukasischen Bevölkerung wird weniger S-Oxazepam glucuronidiert als bei der übrigen Bevölkerung, was durch ein verändertes Verhältnis von R/S-Oxazepam im Urin nachgewiesen werden konnte. Da es sich bei S-Oxazepam um das pharmakologisch wirksamere Stereoisomer handelt (Mohler et al., 1978), kann es zur Wirkungsverlängerung kommen. Es wurde diskutiert, ob ein Polymorphismus der Isoform UGT2B7, bei dem Histidin an Position 268 gegen Tyrosin ausgetauscht ist, dafür verantwortlich sein könnte (Patel et al., 1995b). Durch weitere Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass dieser Polymorphismus keinen Einfluss auf die Glucuronidierungsaktivität von UGT2B7 hat (Coffman et al., 1998). Ähnliche Polymorphismen sind jedoch relativ häufig und gegebenenfalls bei einer Beurteilung von möglichen Wechselwirkungen ebenfalls zu berücksichtigen.

Die Expression verschiedener Enzyme ist zudem abhängig vom Lebensalter. So konnte gezeigt werden, dass die Isoformen UGT1A9 und UGT2B7 in einem beachtlich niedrigeren Ausmaß bei Kindern unter zwei Jahren exprimiert werden (Leakey et al., 1987; Strassburg et al., 2002). Dies könnte die 3-4mal verlängerte Halbwertszeit für Oxazepam bei Neugeborenen erklären (Tomson et al., 1979). Bei älteren Menschen ist die Glucuronidierung weniger beeinflusst. Allerdings kann es durch anatomische und physiologische Veränderungen in der Leber zu veränderten Arzneimittelumsetzungen kommen. Eine Enzyminduktion verschiedener Isoformen wurde durch Tabakrauch (Bock et al., 1999; Munzel et al. 1999) sowie durch Inhaltsstoffe aus verschiedenen Kreuzblütlern wie der Brunnenkresse (*Nasturtium officinalis*), Gartenkresse (*Lepidium sativum*) und dem weißen Senf (*Sinapis alba*) (Lhoste et al., 2004) beschrieben. Ähnlich wie bei den CYPs können aber auch Arzneistoffe als Enzyminduktoren wirken, wie z.B. Carbamazepin und Phenytoin für UGT1A4 (de Leon 2003). Eine verstärkte in vitro Morphin-Glucuronidierung (120 %) konnte durch Cyclosporin A (Hara et al., 2007) belegt werden. Die Morphinglucuronidierungs-aktivität war um 20 % höher im Vergleich zur Kontrolle. Studien an Ratten weisen auf eine veränderte Aktivität der UGT durch den Einfluss einiger Hormone wie Schilddrüsen- und Wachstumshormone hin. So konnte in vivo gezeigt werden, dass Hypothyroidismus die Glucuronidierung

von Oxazepam verringert (Sonne 1993). Weitere Parameter, die ebenfalls einen Einfluss haben können, sind der Gesundheitszustand, insbesondere Erkrankungen der Leber (z.B. Leberzirrhose und Hyperbilirubinämie) und genetische Faktoren. Es gilt also, bessere *in vitro*-Systeme zu entwickeln (z.B. primäre Kulturen von humanen Hepatozyten), um die Korrelation der UGT-Inhibition und -Induktion *in vitro* mit der *in vivo* zu verbessern. Weiterhin wäre es sinnvoll, UGT-spezifische Substrate, Induktoren und Inhibitoren zu finden, um diese bei *in vitro* und *in vivo* Studien einsetzen zu können (Court et al., 2003; Kiang et al., 2005).

Die Korrelation von *in vitro* zu *in vivo* ist bei der Morphin-Glucuronidierung insofern komplexer, als sowohl Morphin-3- als auch Morphin-6-Glucuronid gebildet werden und diese wiederum entgegengesetzte Wirkungen ausüben. M3G besitzt einen antagonistischen Effekt am μ 1-Rezeptor, M6G stellt dagegen einen potenten Agonisten dar. Bei der Inhibition durch Temazepam heben sich also die Effekte auf, da die Bildung beider Glucuronide in gleichem Ausmaß inhibiert wird und somit weniger M3G und weniger M6G gebildet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von Oxazepam in Kombination mit Morphin zur Folge hat, dass die Umsetzung von Morphin zu M3G stärker als die zu M6G gehemmt wird, jedoch in beiden Fällen schwächer im Vergleich zu Temazepam. Es wird also nicht wesentlich weniger M6G gebildet, und der antagonistische Effekt von M3G ist herabgesetzt, da davon weniger gebildet wird. Dies hätte neben einer Wirkungsverlängerung aufgrund einer verminderten Morphinaktivierung durch Ausscheidung der Glucuronide zusätzlich auch eine Wirkungsverstärkung durch pharmakologisch unterschiedliche Wirkungen der Metabolite zur Folge.

Bei therapeutischen Dosen von Oxazepam bzw. Temazepam und den Opiaten Morphin oder Codein ist nicht mit nennenswerten Interaktionen zu rechnen, was die Wechselwirkung im Phase-II-Metabolismus an den UGTs anbelangt. Daher sollte eine Kombination der Wirkstoffe unkritisch sein. Dies kann bei Tumorpatienten oder Polytoxikomanen ganz anders aussehen, da hier wesentlich höhere Dosen eingenommen werden. Im Einzelfall könnte eine kombinierte Gabe starke Auswirkungen auf den Abbau der Substanzen haben, und damit eine verlängerte Wirkung oder Nebenwirkung mit sich bringen. Diese Effekte könnten durch einen zusätzlichen Polymorphismus noch verstärkt werden.

Aber auch aus forensisch-toxikologischer bzw. rechtsmedizinischer Sicht sind solche möglichen Interaktionen von Interesse. Durch die gleichzeitige Einnahme kann es zur oben beschriebenen Wirkungsverlängerung kommen. Die jeweilige Substanz wird langsamer detoxifiziert, was z.B. bei der Beurteilung der Schuldfähigkeit von Straftätern relevant sein könnte. Eine wichtige Frage ist darüber hinaus, ob die pharmakokinetische Wechselwirkung eine Auswirkung auf die Pharmakodynamik und die Toxikodynamik hat. Wenn kein Effekt *in vivo* beobachtet wird, bedeutet das aber nicht, dass nicht doch Wechselwirkungen auf enzymatischer Ebene stattfinden (Miners und Mackenzie 1991). Aufgrund der Vielzahl von einflussnehmenden Faktoren gestaltet

sich eine genaue Abbildung der in vivo Verhältnisse von Benzodiazepinen und Opiaten mit den zurzeit zur Verfügung stehenden in vitro-Modellsystemen als schwierig.

5.8 Pharmakodynamische Testung

Über die pharmakologische Bedeutung von Glucuroniden in vivo ist bisher weniger bekannt. Sie könnten als Teil eines in vivo Depotsystems fungieren, von dem die Muttersubstanz durch Hydrolyse bei Bedarf wieder rekrutiert werden kann (Lin und Wong 2002). Lange Zeit galt die Glucuronidierung ausschließlich als Detoxifizierungsmechanismus, bei dem die pharmakologisch aktive Substanz durch die Änderung ihrer chemischen Struktur den Effekt am Rezeptor verliert. Wie für die Opiat-Glucuronide Morphin-6-Glucuronid und Codein-Glucuronid (Chen et al., 1991; Mignat et al., 1995; Vree et al., 2000) gezeigt werden konnte, besitzen diese ebenfalls eine pharmakologische Wirkung am μ 1-Rezeptor, M6G ist sogar stärker pharmakologisch wirksam als die Muttersubstanz (Osborne et al., 2000).

Diese Fragestellung wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit für Temazepam und seine Glucuronide untersucht. Mit Hilfe eines auf Neuronen basierenden Biosensors konnte in vitro eine pharmakologische Wirkung von Temazepam am GABA_A-Rezeptor gezeigt werden. Temazepam setzte bereits in nanomolaren Konzentrationen die Burstrate herab und wies einen IC₅₀-Wert (diejenige Hemmkonzentration, bei der die Hemmung des targets 50 % beträgt) von 38,50 nM auf. Dies deutet auf eine hohe Affinität von Temazepam zum GABA_A-Rezeptor hin. Bei Messungen, die auf der Patch-Clamp-Technik basierten und mit Horizontalzellen der Maus durchgeführt wurden, ergab sich ein IC₅₀-Wert von 6,6 μ M für Diazepam, für Zolpidem wurde ein IC₅₀-Wert von 85 nM ermittelt (Feigenspan und Weiler 2004). Wurde Temazepam in der vorliegenden Arbeit zusammen mit einer sehr niedrigen fixen GABA-Dosis von 500 nM, die alleine schon die Burstaktivität um ca. 10 % herabsetzte, appliziert, so konnte die hemmende Wirkung des Benzodiazepins auf die Burstrate deutlich verstärkt werden. Aus diesen Versuchen resultierte ein IC₅₀-Wert von 16,85 nM. Die Halbwirksamkeitsdosis von Temazepam wurde also um das etwa 2,5-fache verringert.

Es wird allgemein angenommen, dass die Benzodiazepin-Glucuronide nicht mehr neuroaktiv sind (Baldacci und Thormann 2006). Eine experimentelle Absicherung dieser Resultate steht jedoch noch aus. Die pharmakologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder R- noch S-Temazepam-Glucuronid einen inhibitorischen Effekt auf die Netzwerkaktivität kortikaler Kulturen ausüben. Selbst in einer 10fach höheren als die standardmäßig bei den Versuchen mit Temazepam eingesetzten Konzentration konnte keine relevante Hemmung beobachtet werden. Die Temazepam-Glucuronide besitzen somit keinen Effekt am GABA_A-Rezeptor. Die Änderung der chemischen Struktur durch die Konjugation mit der Glucuronsäure geht mit einem Wirkungsverlust am GABA_A-Rezeptor einher. Es konnte gezeigt werden, dass der hier verwendete Biosensor geeignet ist, dies nachzuweisen. Insofern stellen

diese Experimente einen wichtigen experimentellen Schritt zur Bestätigung der oben genannten Hypothese dar.

Allerdings bedeutet eine nicht vorhandene Inhibierung an einem Rezeptor nicht zwangsläufig, dass die untersuchten Substanzen nicht toxisch sind oder keinen pharmakologischen Effekt besitzen. Durch die gegenüber der Muttersubstanz veränderte chemische Struktur könnten die Glucuronide an einen anderen Rezeptor binden als an den für ihr Aglykon passenden und somit einen anderen biologischen Effekt ausüben. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Glucuronide für auftretende Nebenwirkungen bei der Gabe von Benzodiazepinen verantwortlich sein können.

5.9 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Phase-II-Metabolite der Benzodiazepine Oxazepam, Temazepam und Lorazepam als diastereomerenreine Glucuronide mit Hilfe der enzymatischen Synthese dargestellt und mittels $^1\text{H-NMR}$ und LC/MS charakterisiert werden. Der chemische Syntheseansatz führte mit verschiedenen Methoden nicht zu den gewünschten Produkten. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse erscheint nur eine chemische Synthese durch die Generierung der glykosidischen Bindung und einem daran anschließenden Aufbau des gewünschten Benzodiazepins an dieser Bindung als erfolgversprechend.

Bei der Glucuronidierung der Benzodiazepine Oxazepam und Temazepam mit humanen Lebermikrosomen konnte eine Wechselwirkung mit den Opiaten Morphin und Codein auf enzymatischer Ebene belegt werden. Um zu klären, wie stark die Inhibition an den jeweiligen Isoenzymen ist, sollten Wechselwirkungsstudien mit allen an der Glucuronidierung sowohl der Opiate als auch der Benzodiazepine beteiligten Isoformen durchgeführt werden. Zur genaueren Bestimmung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Benzodiazepine und der damit verbundenen Auswirkungen auf ihr Inhibitionspotential gegenüber der Opiat-Glucuronidierung müssten weitere Benzodiazepine, wie z.B. Lorazepam, Lormetazepam und Hydroxy-Bromazepam untersucht werden. Daraus könnte dann der Einfluss einzelner funktioneller Gruppen auf die Inhibition abgeleitet werden. Die Untersuchungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da sich Lorazepam mit den HLM nur in sehr geringem Ausmaß zu den Glucuroniden umsetzte und bei der Bestimmung der Lormetazepam-Glucuronide mittels HPLC keine Basislinientrennung erreicht werden konnte.

Ein Einfluss auf die Neuroaktivität ist für Benzodiazepin-Glucuronide bisher nicht beschrieben worden. Eine Ausnahme stellt allerdings das Midazolam-Glucuronid dar, bei dem eine Wirksamkeit diskutiert wird. Bei einer gestörten renalen Ausscheidung blieben Patienten länger im Koma als berechnet (Bauer et al., 1995). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Biosensor konnte für Temazepam eine pharmakologische Wirksamkeit auf kortikaler Ebene festgestellt werden, für die Temazepam-Glucuronide jedoch nicht. Der Biosensor erwies sich damit als geeignet, die Unwirksamkeit dieser Phase-II-Metabolite im Gegensatz zur Muttersubstanz, die eine deutliche Wirkung am

GABA_A-Rezeptor zeigte, zu belegen. Von Interesse wäre eine Untersuchung weiterer Benzodiazepin-Glucuronide, im speziellen von Midazolam-Glucuronid, um so bessere Aussagen über eine mögliche Wirksamkeit treffen und damit dann die Plasmaspiegel von Patienten besser bewerten zu können.

Aus forensischer Sicht wäre es von großer Bedeutung, Aussagen über eine gegenseitige Beeinflussung im Abbau der Substanzklassen der Benzodiazepine und der Opiate treffen zu können, um die Situation bei gleichzeitigem Konsum besser beurteilen zu können. Von den Glucuroniden der Opiate ist teilweise eine pharmakologische Wirkung bekannt, daher wäre es für eine Beurteilung der Plasmaspiegel von Benzodiazepin-Glucuroniden sehr hilfreich zu wissen, ob diese eine Wirkung ausüben, auch wenn sie unter Umständen nicht an denselben Rezeptor wie die Muttersubstanz binden.

6 Zusammenfassung

Die Glucuronide der Benzodiazepine Oxazepam, Temazepam und Lorazepam konnten erfolgreich durch enzymatische Synthese mit Hilfe von Schweinelebermikrosomen dargestellt werden. Das dabei jeweils entstandene Diastereomergemisch aus R- und S-Glucuronid, wie es auch in vivo nach entsprechender Wirkstoffaufnahme vorliegt, konnte durch präparative HPLC voneinander getrennt und anschließend mittels SPE aufgereinigt werden. Die resultierenden Syntheseprodukte wurden mit einer Ausbeute von 10-28 % erhalten, und anschließend mittels LC/MS und $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisch charakterisiert. Die durch ESI-MS experimentell bestimmten Feinmassen der Glucuronide weisen eine Fehlerabweichung von $< 0,7$ ppm im Vergleich zu den theoretischen Massen auf. MS^2 -Experimente belegen für alle Benzodiazepin-Glucuronide dieselbe charakteristische Fragmentierung. Die diastereomeren Glucuronide der jeweiligen Benzodiazepine zeigten erwartungsgemäß keinerlei Unterschiede bei den LC/MS-Messungen. Genauere Aussagen über die Stereochemie konnten also nur mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie getroffen werden. Dabei verhielten sich alle S-Glucuronide der Benzodiazepine gleich, was die chemische Verschiebung und das Aufspaltungsmuster der beiden unterschiedlichen Protonen an Position G1 und 3 anbelangt. Dasselbe gilt auch für alle R-Glucuronide.

Die Verfügbarkeit der stereoisomerenreinen Benzodiazepin-Glucuronide als Standardsubstanzen ermöglichte es, Wechselwirkungsstudien im Phase-II-Metabolismus dieser Substanzklasse durchzuführen, da nun für die qualitative und quantitative Auswertung Referenzmaterial zur Verfügung stand. Zunächst wurden die Inkubationsbedingungen von humanen Lebermikrosomen für die Glucuronidierung der Benzodiazepine Temazepam und Oxazepam hinsichtlich der Inkubationszeit und -temperatur sowie der Co-Substrat- und Substratkonzentration optimiert. Bei den S-Enantiomeren von Oxazepam und Temazepam trat eine Substrathemmung auf, für S-Oxazepam ab $250 \mu\text{M}$ und für S-Tamazepam ab $500 \mu\text{M}$. Die korrespondierenden R-Enantiomere zeigten in den Diagrammen den typischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die bei diesen Versuchen gewonnenen enzymkinetischen Daten zeigten, dass die Affinität von Oxazepam zu den UGTs höher ist als die von Temazepam. Allerdings weisen sowohl R- als auch S-Tamazepam höhere Umsatzgeschwindigkeiten auf, als das bei R- und S-Oxazepam der Fall ist. Beim Vergleich der beiden Enantiomerenpaare beider Wirkstoffe zeigte sich, dass die S-Konfiguration eine höhere Affinität als die R-Konfiguration zu den UGTs aufweist. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit allen kommerziell verfügbaren UGT-Isoformen durchgeführt, um zu klären, welche an der Umsetzung von R- und S-Tamazepam beteiligt sind. Dies ermöglichte eine bessere Beurteilung der Ergebnisse aus den Inhibitionsversuchen, da die an der Umsetzung von Oxazepam beteiligten Isoformen bereits aus der Literatur bekannt waren. UGT2B7 katalysierte als einzige Isoform die Umsetzung zu R-Tamazepam-Glucuronid und erwies sich aufgrund des niedrigen K_m -Wertes als die bei dieser Umsetzung hauptsächlich beteiligte Isoform. Diese Isoform

zeigte ebenfalls eine Affinität zu S-Temazepam, ebenso wie UGT2B15. Anhand der durchgeführten Versuche konnte jedoch nicht geklärt werden, welche dieser Isoformen die Hauptisoform für die Umsetzung von S-Temazepam darstellt.

Unter den optimierten Inkubationsbedingungen wurden alle Inhibitionsversuche mit den Opiaten Morphin und Codein und den Benzodiazepinen Oxazepam und Temazepam durchgeführt. Die quantitative Bestimmung sowohl der Benzodiazepin-Glucuronide als auch der Morphin- und Codein-Glucuronide ermöglichte es, gleichzeitig die Eigenschaften der Opiate und der Benzodiazepine sowohl als Substrate als auch als Inhibitoren der Glucuronidierung zu ermitteln. Alle untersuchten Substanzen erwiesen sich als kompetitive Inhibitoren. Dies ist wohl hauptsächlich in einer Konkurrenz um das aktive Zentrum der Isoform UGT2B7 begründet. Bei den Untersuchungen der Opiate als Inhibitoren der Benzodiazepin-Glucuronidierung erwies sich Codein als stärkerer Inhibitor mit niedrigeren K_i -Werten als Morphin. Es wurde gezeigt, dass die Glucuronidierung der S-Enantiomere von Oxazepam und Temazepam durch die Opiate Morphin und Codein im Vergleich zu den R-Enantiomeren stärker gehemmt wird. Oxazepam und Temazepam hemmten ihrerseits die Glucuronidierung von Codein in stärkerem Ausmaß als die Glucuronidierung von Morphin, sowohl zu Morphin-3- als auch zu Morphin-6-Glucuronid. Temazepam erwies sich gegenüber Oxazepam als stärkerer Inhibitor der Morphin-Glucuronidierung und hemmte die Glucuronidierung zu Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid in demselben Ausmaß.

Die Gewinnung der diastereomerenreinen Temazepam-Glucuronide ermöglichte es weiterhin, erstmalig *in vitro*-Untersuchungen bezüglich ihrer pharmakologischen Aktivität durchzuführen. Die Wirksamkeit von Temazepam und seinen Phase-II-Metaboliten wurde in Kooperation mit dem Max Planck-Institut für Polymerforschung Mainz, Arbeitskreis Prof. Knoll (Dr. Melanie Jungblut) mit einem zellbasierten Biosensor, der aus einem neokortikalen neuronalen Netzwerk besteht, untersucht. R- und S-Temazepam-Glucuronid modifizierten die Netzwerkaktivität hinsichtlich der untersuchten Parameter nicht. Aufgrund dieser Untersuchungen kann angenommen werden, dass die Temazepam-Glucuronide keinen Einfluss mehr auf die Neuroaktivität ausüben. Der eingesetzte Biosensor erwies sich für Untersuchungen bezüglich der pharmakologischen Aktivität von Benzodiazepinen und ihren Phase-II-Metaboliten als geeignet.

Einsatzmöglichkeiten für die hier vorgestellten Methoden sowohl zur Synthese als auch zur pharmakologischen Testung von Phase-II-Metaboliten bieten sich sowohl in der Arzneimittelforschung als auch in der Toxikologie. Durch die Verfügbarkeit der Referenzsubstanzen werden weitere wichtige Untersuchungen im Bereich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik erst ermöglicht.

7 Literaturverzeichnis

- Aderjan, R. E. and G. Skopp (1998). "Formation and clearance of active and inactive metabolites of opiates in humans." *Therapeutic Drug Monitoring* **20** 5: 561-569.
- Agranat, I., H. Caner and J. Caldwell (2002). "Putting chirality to work: the strategy of chiral switches." *Nature reviews. Drug discovery* **1** 10: 753-768.
- Alebic-Kolbah, T. and I. W. Wainer (1993). "Enzyme-based high-performance liquid chromatography stationary phases as metabolic reactors. Immobilization of nonsolubilized rat liver microsomes on an immobilized artificial membrane high-performance liquid chromatography support." *Journal Of Chromatography* **646**: 289-295.
- Alonen, A., O. Aitio, K. Hakala, L. Luukkanen, M. Finel and R. Kostainen (2005). "Biosynthesis of dobutamine monoglucuronides and glucuronidation of dobutamine by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases." *Drug Metabolism And Disposition* **33** 5: 657-663.
- Anderson, G. D., B. E. Gidal, E. D. Kantor and A. J. Wilensky (1994). "Lorazepam-Valproate Interaction - Studies In Normal Subjects And Isolated-Perfused Rat-Liver." *Epilepsia* **35** 1: 221-225.
- Bailey, M. J. and R. G. Dickinson (2003). "Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences." *Chemico-Biological Interactions* **145** 2: 117-137.
- Baldacci, A. and W. Thormann (2006). "Analysis of lorazepam and its 3-O-glucuronide in human urine by capillary electrophoresis: Evidence for the formation of two distinct diastereoisomeric glucuronides." *Journal Of Separation Science* **29** 1: 153-163.
- Banhegyi, G., L. Braun, P. Marcolongo, M. Csala, R. Fulceri, J. Mandl and A. Benedetti (1996). "Evidence for an UDP-glucuronic acid phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles." *Biochemical Journal* **315**: 171-176.
- Bauer, T. M., R. Ritz, C. Haberthur, H. R. Ha, W. Hunkeler, A. J. Sleight, G. Scollavizzari and W. E. Haefeli (1995). "Prolonged Sedation Due To Accumulation Of Conjugated Metabolites Of Midazolam." *Lancet* **346** 8968: 145-147.
- Bechinger, B. (1997). "Structure and functions of channel-forming peptides: Magainins, cecropins, melittin and alamethicin." *Journal Of Membrane Biology* **156** 3: 197-211.
- Beyer, H. and W. Walter (1991). "Lehrbuch der organischen Chemie". Stuttgart, S. Hirzel Verlag.
- Bichlmaier, I., A. Siiskonen, M. Finel and J. Yli-Kauhaluoma (2006a). "Stereochemical sensitivity of the human UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 2B17." *Journal Of Medicinal Chemistry* **49** 5: 1818-1827.

- Bichlmaier, I., A. Siiskonen, M. Kurkela, M. Finel and J. Yli-Kauhaluoma (2006b). "Chiral distinction between the enantiomers of bicyclic alcohols by UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 2B17." *Biological Chemistry* **387** 4: 407-416.
- Biesalski, H. K., G. Doepner, H. Kunz, J. Paust and M. John (1995). "Convenient Synthesis Of Biologically Important Retinoids." *Liebigs Annalen* 4: 717-720.
- Boelsterli, U. A. (2002). "Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity - Focus on nimesulide." *Drug Safety* **25** 9: 633-648.
- Boelsterli, U. A., H. J. Zimmerman and A. Kretzrommel (1995). "Idiosyncratic Liver Toxicity Of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs - Molecular Mechanisms And Pathology." *Critical Reviews In Toxicology* **25** 3: 207-235.
- Boldt, P., M. A. Rothschild and H. Käferstein (2007). "Glucuronidation of paracetamol by human liver microsomes in vitro - Enzyme kinetic parameters and interactions with short-chain aliphatic alcohols and opiates." *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)* **57** in print.
- Bollenback, G. N., J. W. Long, D. G. Benjamin and J. A. Lindquist (1955). "The synthesis of aryl-D-glucopyranosiduronic acids." *Journal Of The American Chemical Society* **77** 12: 3310-3315.
- Bossuyt, X. and N. Blanckaert (1994). "Carrier-Mediated Transport Of Intact Udp-Glucuronic Acid Into The Lumen Of Endoplasmic-Reticulum-Derived Vesicles From Rat-Liver." *Biochemical Journal* **302**: 261-269.
- Brewster, K., J. M. Harrison and T. D. Inch (1979). "Synthesis Of Aryl Beta-D-Glucopyranosides And Aryl Beta-D-Glucopyranosiduronic Acids." *Tetrahedron Letters* 52: 5051-5054.
- Brown, R. T., F. Scheinmann and A. V. Stachulski (1997). "Intermediates for Glucuronide Synthesis: 7-Hydroxycoumarin Glucuronide." *Journal of Chemical Research. Synopses.* **10**: 370-371.
- Cappiello, M., L. Giuliani and G. M. Pacifici (1991). "Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues." *European journal of clinical pharmacology* **41** 1: 345-350.
- Cepeda, M. S., J. T. Farrar, J. H. Roa, R. Boston, Q. C. Meng, F. Ruiz, D. B. Carr and B. L. Strom (2001). "Ethnicity influences morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Clinical pharmacology and therapeutics* **70** 4: 351-361.
- Chen, Z. R., R. J. Irvine, A. A. Somogyi and F. Bochner (1991). "Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites." *Life Sciences* **48** 22: 2165-71.
- Christen, H. R. and F. Vögtle (1992). "Organische Chemie - von den Grundlagen zur Forschung".

- Coffman, B. L., C. D. King, G. R. Rios and T. R. Tephly (1998). "The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268)." *Drug Metabolism And Disposition* **26** 1: 73-77.
- Coffman, B. L., G. R. Rios, C. D. King and T. R. Tephly (1997). "Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation." *Drug Metabolism And Disposition* **25** 1: 1-4.
- Corbella, A., Gariboldi, P., G. Jommi, A. Forgione, F. Marcucci, P. Martelli, E. Mussini and F. Mauri (1973). "Stereochemistry Of Enzymic 3-Hydroxylation Of 1,3-Dihydro-2h-1,4-Benzodiazepin-2-Ones." *Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications* 19: 721-722.
- Coughtrie, M. W. H. and S. Sharp (1991). "Glucuronidation Of Imipramine In Rabbit And Human Liver-Microsomes - Assay Conditions And Interaction With Other Tertiary Amine Drugs." *Biochemical Pharmacology* **42** 7: 1497-1501.
- Court, M. H., S. X. Duan, C. Guillemette, K. Journault, S. Krishnaswamy, L. L. Von Moltke and D. J. Greenblatt (2002). "Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9." *Drug Metab Dispos* **30** 11: 1257-65.
- Court, M. H., S. X. Duan, L. L. Von Moltke, D. J. Greenblatt, C. J. Patten, J. O. Miners and P. I. Mackenzie (2001). "Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: Identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms." *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* **299** 3: 998-1006.
- Court, M. H., S. Krishnaswamy, Q. Hao, S. X. Duan, C. J. Patten, L. L. Von Moltke and D. J. Greenblatt (2003). "Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: Specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism." *Drug Metabolism And Disposition* **31** 9: 1125-1133.
- de Leon, J. (2003). "Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry." *International Journal Of Neuropsychopharmacology* **6** 1: 57-72.
- Divoll, M., D. J. Greenblatt, Y. Lacasse and R. I. Shader (1981). "Benzodiazepine overdose: Plasma concentrations and clinical outcome." *Psychopharmacology* **73** 4: 381-383.
- Duve, C. D. (1971). "Tissue Fractionation - Past And Present." *Journal Of Cell Biology* **50** 1: D20-&.
- Ebner, T. and B. Burchell (1993). "Substrate specificities of 2 stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family." *Drug Metabolism And Disposition* **21** 1: 50-55.
- Ethell, B. T., K. Beaumont, D. J. Rance and B. Burchell (2001). "Use of cloned and expressed human UDP-glucuronosyltransferases for the assessment of human

- drug conjugation and identification of potential drug interactions." *Drug Metabolism And Disposition* **29** 1: 48-53.
- Feigenspan, A. and R. Weiler (2004). "Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABA(A) receptors." *Journal Of Neurophysiology* **92** 5: 2789-2801.
- Fischer, B., A. Nudelman, M. Ruse, J. Herzig, H. E. Gottlieb and E. Keinan (1984). "A novel method for stereoselective glucuronidation." *Journal Of Organic Chemistry* **49** 25: 4988-4993.
- Fisher, M. B., K. Campanale, B. L. Ackermann, M. Vandenbranden and S. A. Wrighton (2000). "In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin." *Drug Metabolism And Disposition* **28** 5: 560-566.
- Formelli, F., A. B. Barua and J. A. Olson (1996). "Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide." *Faseb Journal* **10** 9: 1014-1024.
- Forrest, A. R., I. Marsh, C. Bradshaw and S. K. Braich (1986). "Fatal temazepam overdoses." *Lancet* **2** 8500: 226.
- Fulceri, R., G. Banhegyi, A. Gamberucci, R. Giunti, J. Mandl and A. Benedetti (1994). "Evidence For The Intraluminal Positioning Of P-Nitrophenol Udp-Glucuronosyltransferase Activity In Rat-Liver Microsomal Vesicles." *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **309** 1: 43-46.
- Glaeske, G. (2003). "Psychotrope und andere Arzneimittel mit Missbrauchs-und Abhängigkeitspotential." Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg.), Jahrbuch Sucht 2004 Geesthacht: Neuland Verl.-Ges., 2003.
- Goenechea, S., G. Rucker, M. Franke and I. Schleidenschmid (1991). "Synthesis of beta-D-glucuronides of O-demethyl-metabolites of tramadol." *Archiv Der Pharmazie* **324** 12: 1003-1005.
- Goenechea, S., G. Rucker, M. Langer and M. Neugebauer (1985). "Studies On The Cleavage Of Synthetic Glucuronide Of Pentazocine With Hydrochloric-Acid." *Zeitschrift Fur Rechtsmedizin-Journal Of Legal Medicine* **95** 2: 123-128.
- Gong, Q. L., T. Hedner, J. Hedner, R. Bjorkman and G. Nordberg (1991). "Antinociceptive And Ventilatory Effects Of The Morphine Metabolites - Morphine-6-Glucuronide And Morphine-3-Glucuronide." *European Journal Of Pharmacology* **193** 1: 47-56.
- Gopal, K. V. and G. W. Gross (2004). "Unique responses of auditory cortex networks in vitro to low concentrations of quinine." *Hearing Research* **192** 1-2: 10-22.
- Greenblatt, D. J., M. Divoll, D. R. Abernethy, H. R. Ochs and R. I. Shader (1983). "Clinical Pharmacokinetics Of The Newer Benzodiazepines." *Clinical Pharmacokinetics* **8** 3: 233-252.

- Hand, C. W., R. A. Moore, H. J. McQuay, M. C. Allen and J. W. Sear (1987). "Analysis Of Morphine And Its Major Metabolites By Differential Radioimmunoassay." *Annals Of Clinical Biochemistry* **24**: 153-160.
- Hansson, C. and E. Rosengren (1976). "Synthesis Of 4-O-(Beta-D-Glucopyranosiduronic Acid) Dopamine." *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry And Biochemistry* **30** 9: 871-875.
- Hara, Y., M. Nakajima, K. Miyamoto and T. Yokoi (2007). "Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine." *Drug metabolism and pharmacokinetics* **22** 2: 103-112.
- He, H. B., S. D. Shay, Y. Caraco, M. Wood and A. J. J. Wood (1998). "Simultaneous determination of codeine and its seven metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection." *Journal Of Chromatography B* **708** 1-2: 185-193.
- He, K., J. Ludtke, T. Heller and H. Huang (1996). "Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers." *Biophysical Journal* **71**: 2669-2679.
- Helferich, B. (1957). *Chem. Ber.* **90**: 2492-2498.
- Hubert, M. (1997). "Synthese der beta-D-Glucuronide von 2,3-, 3,4- und 2,6-Dichlorphenol und Untersuchungen zur säure- und enzymkatalysierten Konjugatspaltung." Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Pharmazeutisches Institut der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.
- Hum, D. W., A. Bélanger, E. Lévesque, O. Barbier, M. Beaulieu, C. Albert, M. Vallée, C. Guillemette, A. Tchernof, D. Turgeon and S. Dubois (1999). "Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **69** 1-6: 413-423.
- Jungblut, M. (2006). "Detektion neuroaktiver Substanzen durch Modifikation des Aktivitätsmusters neokortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays - Charakterisierung und Optimierung eines neuronalen Biosensors." Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie.
- Jurowich, S., G. Sticht and H. Kaferstein (2004). "Glucuronidation of aliphatic alcohols in human liver microsomes in vitro." *Alcohol* **32** 3: 187-194.
- Kamil, I. A., J. N. Smith and R. T. Williams (1952). "A New Aspect Of Ethanol Metabolism - Isolation Of Ethyl-Glucuronide." *Biochemical Journal* **51** 4: R32-R33.
- Kaspersen, F. M. and C. A. A. Vanboeckel (1987). "A Review Of The Methods Of Chemical Synthesis Of Sulfate And Glucuronide Conjugates." *Xenobiotica* **17** 12: 1451-1471.
- Kemp, D. C., P. W. Fan and J. C. Stevens (2002). "Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: Contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance." *Drug Metabolism And Disposition* **30** 6: 694-700.

- Kiang, T. K. L., M. H. H. Ensom and T. K. H. Chang (2005). "UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions." *Pharmacology & Therapeutics* **106** 1: 97-132.
- Kim, J. H., L. Johannes, B. Goud, C. Antony, C. A. Lingwood, R. Daneman and S. Grinstein (1998). "Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 6: 2997-3002.
- Kim, K. H. (1991). "Quantitative structure-activity relationships of the metabolism of drugs by uridine diphosphate glucuronosyltransferase." *Journal of pharmaceutical sciences* **80** 10: 966-970.
- King, C., B. Finley and R. Franklin (2000a). "The glucuronidation of morphine by dog liver microsomes: Identification of morphine-6-O-glucuronide." *Drug Metabolism And Disposition* **28** 6: 661-663.
- King, C. D., G. R. Rios, M. D. Green and T. R. Tephly (2000b). "UDP-glucuronosyltransferases." *Current Drug Metabolism* **1** 2: 143-161.
- Kirkwood, L. C., R. L. Nation and A. A. Somogyi (1998). "Glucuronidation of dihydrocodeine by human liver microsomes and the effect of inhibitors." *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology* **25** 3-4: 266-270.
- Klotz, U. and G. Laux (1996). "Tranquillantien", Wissenschaftliches Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Königs, W. and E. Knorr (1901). *Chem. Ber.* **34**: 957-981.
- Kroemer, H. K. and U. Klotz (1992). "Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors." *Clinical pharmacokinetics* **23** 4: 292-310.
- Kuuranne, T., O. Aitio, M. Vahermo, E. Elovaara and R. Kostianen (2002). "Enzyme-assisted synthesis and structure characterization of glucuronide conjugates of methyltestosterone 17 alpha-methylandroster-4-en-17 beta-ol-3-one) and nandrolone (estr-4-en-17 beta-ol-3-one) metabolites." *Bioconjugate Chemistry* **13** 2: 194-199.
- Lang, D. H., C. K. Yeung, R. M. Peter, C. Ibarra, R. Gasser, K. Itagaki, R. M. Philpot and A. E. Rettie (1998). "Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3." *Biochemical pharmacology* **56** 8: 1005-1012.
- Leakey, J. E., R. Hume and B. Burchell (1987). "Development of multiple activities of UDP-glucuronyltransferase in human liver." *The Biochemical journal* **243** 3: 859-861.
- Lee, S. A., J. K. Lee and K. Heo (2002). "Coma probably induced by lorazepam-valproate interaction." *Seizure* **11** 2: 124-125.

- Lehman, J. P., C. Fenselau and J. R. Depaulo (1983). "Quaternary Ammonium-Linked Glucuronides Of Amitriptyline, Imipramine, And Chlorpromazine." *Drug Metabolism And Disposition* **11** 3: 221-225.
- Lehmann, J. (1976). "Chemie der Kohlenhydrate ". Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Lhoste, E. F., K. Gloux, I. De Waziers, S. Garrido, S. Lory, C. Philippe, S. Rabot and S. Knasmüller (2004). "The activities of several detoxication enzymes are differentially induced by juices of garden cress, water cress and mustard in human HepG2 cells." *Chemico-Biological Interactions* **150** 3: 211-9.
- Lin, J. H. and B. K. Wong (2002). "Complexities of glucuronidation affecting in vitro-in vivo extrapolation." *Current Drug Metabolism* **3** 6: 623-646.
- Locniskar, A. and D. J. Greenblatt (1990). "Oxidative versus conjugative biotransformation of temazepam." *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **11** 6: 499-506.
- Luukkanen, L., I. Kilpelainen, H. Kangas, P. Ottoila, E. Elovaara and J. Taskinen (1999). "Enzyme-assisted synthesis and structural characterization of nitrocatechol glucuronides." *Bioconjugate Chemistry* **10** 1: 150-154.
- Mackenzie, P. I., I. S. Owens, B. Burchell, K. W. Bock, A. Bairoch, A. Belanger, S. FournelGigleux, M. Green, D. W. Hum, T. Iyanagi, D. Lancet, P. Louisot, J. Magdalou, J. R. Chowdhury, J. K. Ritter, H. Schachter, T. R. Tephly, K. F. Tipton and D. W. Nebert (1997). "The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence." *Pharmacogenetics* **7** 4: 255-269.
- Mackenzie, P. I., L. Rodbourne and S. Stranks (1992). "Steroid Udp Glucuronosyltransferases." *Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* **43** 8: 1099-1105.
- Mannich, C. (1912). *Annalen* **394**: 223-228.
- Martinoia, S., L. Bonzano, M. Chiappalone and M. Tedesco (2005). "Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications." *Sensors And Actuators B-Chemical* **108** 1-2: 589-596.
- Meacham, R. H., S. F. Sisenwine, A. L. Liu, C. J. Kick, I. Barinov and H. W. Ruelius (1986). "Inhibition Of Ciramadol Glucuronidation By Benzodiazepines." *Drug Metabolism And Disposition* **14** 4: 430-436.
- Meyers, M., W. Slikker, G. Pascoe and M. Vore (1980). "Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **214** 1: 87-93.
- Meyers, M., W. Slikker and M. Vore (1981). "Steroid D-ring glucuronides: characterization of a new class of cholestatic agents in the rat." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **218** 1: 63-73.

- Michael, A. (1879). *American Chemical Journal* **1**: 305-316.
- Mignat, C., U. Wille and A. Ziegler (1995). "Affinity Profiles Of Morphine, Codeine, Dihydrocodeine And Their Glucuronides At Opioid Receptor Subtypes." *Life Sciences* **56** 10: 793-799.
- Miners, J. O. and P. I. Mackenzie (1991). "Drug Glucuronidation In Humans." *Pharmacology & Therapeutics* **51** 3: 347-369.
- Miners, J. O., P. A. Smith, M. J. Sorich, R. A. McKinnon and P. I. Mackenzie (2004). "Predicting human drug glucuronidation parameters: Application of in vitro and in silico modeling approaches." *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* **44**: 1-25.
- Mohler, H., T. Okada, P. Heitz and J. Ulrich (1978). "Biochemical Identification Of Site Of Action Of Benzodiazepines In Human-Brain By Diazepam-H-3 Binding." *Life Sciences* **22** 11: 985-995.
- Morefield, S. I., E. W. Keefer, K. D. Chapman and G. W. Gross (2000). "Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays." *Biosensors & Bioelectronics* **15** 7-8: 383-396.
- Motulsky, H. and A. Christopoulos (2003). Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc. San Diego, CA.
- Mulder, G. J. (1992). "Glucuronidation And Its Role In Regulation Of Biological-Activity Of Drugs." *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* **32**: 25-49.
- Müller, T., R. Schneider and R. R. Schmidt (1994). "Utility of glycosyl phosphites as glycosyl donors: fructofuranosyl and 2-deoxyhexopyranosyl phosphites in glycoside bond formation." *Tetrahedron letters* **35** 27: 4661,4763-4766.
- Mutschler, E. (2001). "Arzneimittelwirkungen". Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Olson, J. A., R. C. Moon, M. W. Anders, C. Fenselau and B. Shane (1992). "Enhancement Of Biological-Activity By Conjugation Reactions." *Journal Of Nutrition* **122** 3: 615-624.
- Osborne, P. B., B. Chieng and M. J. Christie (2000). "Morphine-6 beta-glucuronide has a higher efficacy than morphine as a mu-opioid receptor agonist in the rat locus coeruleus." *British Journal Of Pharmacology* **131** 7: 1422-1428.
- Pacifici, G. M. and A. Rane (1981). "Inhibition Of Morphine Glucuronidation By Oxazepam In Human-Fetal Liver-Microsomes." *Drug Metabolism And Disposition* **9** 6: 569-572.
- Patel, M., B. K. Tang, D. M. Grant and W. Kalow (1995a). "Interindividual variability in the glucuronidation of (S)-oxazepam contrasted with that of (R)-oxazepam." *Pharmacogenetics* **5** 5: 287-297.

- Patel, M., B. K. Tang and W. Kalow (1995b). "(S)-oxazepam glucuronidation is inhibited by ketoprofen and other substrates of UGT2B7." *Pharmacogenetics* **5** 1: 43-49.
- Regenthal, R., M. Krueger, C. Koepfel and R. Preiss (1999). "Drug Levels: Therapeutic and Toxic Serum/Plasma Concentrations of Common Drugs." *Journal of Clinical Monitoring and Computing* **15** 7-8: 529-544.
- Rho, Y. S., S. Y. Kim, W. J. Kim, Y. K. Yun, H. S. Sin and D. J. Yoo (2004). "Convenient syntheses of daunomycinone-7-D-glucuronides and doxorubicinone-7-D-glucuronides." *Synthetic Communications* **34** 19: 3497-3511.
- Ritter, J. K. (2000). "Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions." *Chemico-Biological Interactions* **129** 1-2: 171-193.
- Sakaguchi, K., M. Green, N. Stock, T. S. Reger, J. Zunic and C. King (2004). "Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms." *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **424** 2: 219-225.
- Samara, E. E., R. G. Granneman, G. F. Witt and J. H. Cavanaugh (1997). "Effect of valproate on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of lorazepam." *Journal Of Clinical Pharmacology* **37** 5: 442-450.
- Sawe, J., G. M. Pacifici, L. Kager, C. Vonbahr and A. Rane (1982). "Glucuronidation Of Morphine In Human-Liver And Interaction With Oxazepam." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **26**: 47-51.
- Scheinmann, F., W. K. Lumbrad, R. T. Brown and S. P. Mayalarp (1993). International Patent.
- Schmidt, R. and W. Kinzy (1994). "Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method." *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **50**: 21-123.
- Schulz, M. and A. Schmoldt (2003). "Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics." *Die Pharmazie* **58** 7: 447-474.
- Sharer, J. E., L. A. Shipley, M. R. Vandenbranden, S. N. Binkley and S. A. Wrighton (1995). "Comparisons Of Phase-I And Phase-Ii In-Vitro Hepatic Enzyme-Activities Of Human, Dog, Rhesus-Monkey, And Cynomolgus Monkey." *Drug Metabolism And Disposition* **23** 11: 1231-1241.
- Shepherd, S. R. P., S. J. Baird, T. Hallinan and B. Burchell (1989). "An Investigation Of The Transverse Topology Of Bilirubin Udp-Glucuronosyltransferase In Rat Hepatic Endoplasmic-Reticulum." *Biochemical Journal* **259** 2: 617-620.
- Skeith, K. J. and D. R. Brocks (1994). "Pharmacokinetic optimisation of the treatment of osteoarthritis." *Clinical pharmacokinetics* **26** 3: 233-242.

- Soars, M. G., E. L. Mattiuz, D. A. Jackson, P. Kulanthaivel, W. J. Ehlhardt and S. A. Wrighton (2002). "Biosynthesis of drug glucuronides for use as authentic standards." *Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods* **47** 3: 161-168.
- Soars, M. G., R. J. Riley and B. Burchell (2001a). "Evaluation of the marmoset as a model species for drug glucuronidation." *Xenobiotica* **31** 12: 849-860.
- Soars, M. G., R. J. Riley, K. A. B. Findlay, M. J. Coffey and B. Burchell (2001b). "Evidence for significant differences in microsomal drug glucuronidation by canine and human liver and kidney." *Drug Metabolism And Disposition* **29** 2: 121-126.
- Soars, M. G., B. J. Ring and S. A. Wrighton (2003). "The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of UDP-glucuronosyltransferases." *Drug Metabolism And Disposition* **31** 6: 762-767.
- Sonne, J. (1993). "Factors and conditions affecting the glucuronidation of oxazepam." *Pharmacology & Toxicology* **73**: 1-23.
- Sperker, B., J. T. Backman and H. K. Kroemer (1997). "The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans." *Clinical pharmacokinetics* **33** 1: 18-31.
- Stachulski, A. V. and G. N. Jenkins (1998). "The synthesis of O-glucuronides." *Natural Product Reports* **15** 2: 173-186.
- Stazi, F., G. Palmisano, M. Turconi, S. Clini and M. Santagostino (2004). "Accelerated Koenigs-Knorr glucuronidation of a deactivated nitrophenol: Unveiling the role of polyamine additive 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine through design of experiments." *Journal Of Organic Chemistry* **69** 4: 1097-1103.
- Stett, A., U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch and H. Haemmerle (2003). "Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research." *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **377** 3: 486-495.
- Stone, A. N., P. I. MacKenzie, A. Galetin, J. B. Houston and J. O. Miners (2003a). "Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: Evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7 (vol 31, pg 1086, 2003)." *Drug Metabolism And Disposition* **31** 12: 1541-1541.
- Stone, A. N., P. I. Mackenzie, A. Galetin, J. B. Houston and J. O. Miners (2003b). "Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: Evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7." *Drug Metabolism And Disposition* **31** 9: 1086-1089.
- Strassburg, C. P., A. Strassburg, S. Kneip, A. Barut, R. H. Tukey, B. Rodeck and M. P. Manns (2002). "Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults." *Gut* **50** 2: 259-265.

- Takeda, S., Y. Ishii, M. Iwanaga, P. I. Mackenzie, K. Nagata, Y. Yamazoe, K. Oguri and H. Yamada (2005). "Modulation of UDP-glucuronosyltransferase function by cytochrome P450: Evidence for the alteration of UGT2B7-catalyzed glucuronidation of morphine by CYP3A4." *Molecular Pharmacology* **67** 3: 665-672.
- Tephly, T. R. (1990). "Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases." *Chem. Res. Toxicol.* **3**: 509-516.
- Terrier, N., E. Benoit, C. Senay, F. Lopicque, A. Radomska-Pandya, J. Magdalou and S. Fournel-Gigleux (1999). "Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide." *Molecular Pharmacology* **56** 1: 226-234.
- Testa, B. (1995). "Biochemistry of redox reactions". San Diego, California, Testa B. & Caldwell J. (Hrsg.), Academic Press. Inc.
- Testa, B. and P. Jenner (1976). "Concept Of Regioselectivity In Drug-Metabolism." *Journal Of Pharmacy And Pharmacology* **28** 10: 731-744.
- Thevis, M., G. Opfermann, H. Schmickler and W. Schanzer (2001). "Mass spectrometry of steroid glucuronide conjugates. II - Electron impact fragmentation of 3-keto-4-en- and 3-keto-5 alpha-steroid-17-O-beta glucuronides and 5 alpha-steroid-3 alpha,17 beta-diol 3- and 17-glucuronides." *Journal Of Mass Spectrometry* **36** 9: 998-1012.
- Tomson, G., N. O. Lunell, A. Sundwall and A. Rane (1979). "Placental passage of oxazepam and its metabolism in mother and newborn." *Clinical pharmacology and therapeutics* **25** 1: 74-81.
- Trapnell, C. B., R. W. Klecker, C. Jamis-Dow and J. M. Collins (1998). "Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) by human liver microsomes: relevance to clinical pharmacokinetic interactions with atovaquone, fluconazole, methadone, and valproic acid." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42** 7: 1592-1596.
- Tsou, K. C. and A. M. Seligman (1953). "Synthesis Of Phenyl Beta-D-Glucopyruronoside." *Journal Of The American Chemical Society* **75** 5: 1042-1044.
- Tukey, R. H. and C. P. Strassburg (2000). "Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease." *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* **40**: 581-616.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, E. Lévesque, D. W. Hum and A. Bélanger (2001). "Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members." *Endocrinology* **142** 2: 778-787.
- Uges, D. R. A. (2002). Do TIAFT members care about iatrogenic poisonings? TIAFT, Paris.
- van Halbeek, H. (1993). "NMR spectroscopy of carbohydrates. A tutorial." *American Chemical Society, 205th National meeting*.

- Vanstapel, F. and N. Blanckaert (1988a). "Carrier-Mediated Translocation Of Uridine-Diphosphate Glucose Into The Lumen Of Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles From Rat-Liver." *Journal Of Clinical Investigation* **82** 3: 1113-1122.
- Vanstapel, F. and N. Blanckaert (1988b). "Topology And Regulation Of Bilirubin Udp-Glucuronyltransferase In Sealed Native Microsomes From Rat-Liver." *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **263** 1: 216-225.
- Venkatakrishnan, K., L. L. von Moltke, R. S. Obach and D. J. Greenblatt (2003). "Drug metabolism and drug interactions: Application and clinical value of in vitro models." *Current Drug Metabolism* **4** 5: 423-459.
- Vlahov, J. and G. Snatzke (1983). "On an improved synthesis of beta-glucosiduronic acid-derivatives." *Liebigs Annalen Der Chemie* 4: 570-574.
- Vore, M., C. Montgomery and M. Meyers (1983). "Steroid D-Ring Glucuronides - Characterization Of A New Class Of Cholestatic Agents." *Drug Metabolism Reviews* **14** 5: 1005-1019.
- Vree, T. B., A. M. Baars and E. W. Wuis (1991). "Direct High-Pressure Liquid-Chromatographic Analysis And Preliminary Pharmacokinetics Of Enantiomers Of Oxazepam And Temazepam With Their Corresponding Glucuronide Conjugates." *Pharmaceutisch Weekblad-Scientific Edition* **13** 2: 83-90.
- Vree, T. B., R. T. M. Van Dongen and P. M. Koopman-Kimenai (2000). "Codeine analgesia is due to codeine-6-glucuronide, not morphine." *International Journal Of Clinical Practice* **54** 6: 395-398.
- Weinmann, W., N. Lehmann, C. Muller, A. Wiedemann and M. Svoboda (2000). "Identification of lorazepam and sildenafil as examples for the application of LC/ionspray-MS and MS-MS with mass spectra library searching in forensic toxicology." *Forensic Science International* **113** 1-3: 339-344.
- Xia, Y. and G. W. Gross (2003). "Histiotypic electrophysiological responses of cultured neuronal networks to ethanol." *Alcohol* **30** 3: 167-174.
- Yang, S. K. and X.-L. Lu (1991). "N,N-dimethylcarbonyl derivatives of oxazepam." *Chirality* **3** 3: 212-219.
- Yoshimur, Oguri and Tsukamot (1968). "Metabolism of drugs.60. synthesis of codeine and morphine glucuronides." *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **16** 11: 2114-&.
- Yue, Q. Y., C. Vonbahr, I. Odarcederlof and J. Sawe (1990). "Glucuronidation Of Codeine And Morphine In Human Liver And Kidney Microsomes - Effect Of Inhibitors." *Pharmacology & Toxicology* **66** 3: 221-226.
- Zucker, K., A. Rosen, A. Tsaroucha, L. deFaria, D. Roth, G. Ciancio, V. Esquenazi, G. Burke, A. Tzakis and J. Miller (1997). "Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy, and analogous in vitro findings." *Transplant Immunology* **5** 3: 225-232.

-
- Zucker, K., A. Tsaroucha, L. Olson, V. Esquenazi, A. Tzakis and J. Miller (1999).
"Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate
mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation."
Therapeutic drug monitoring **21** 1: 35-43.

8 Abkürzungsverzeichnis

8.1 Lösungsmittel/Reagenzien

Ac	Acetyl-bzw. Acylgruppe
Acetyl	Acetylgruppe
Piv	Pivaloylgruppe
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure bzw. Carbonsäure
MeOH	Methanol
MeOD	deutertes Methanol
NaOMe	Natriummethanolat
PivCl	Pivaloylchlorid
UDPGA	Uridin-5`-diphosphoglucuronsäure
HClO ₄	Perchlorsäure
Ag ₂ CO ₃	Silbercarbonat
CHCl ₃	Choroform
CDCl ₃	deutertes Choroform
THF	Tetrahydrofuran
DBU	Diazabicycloundecen
HMTTA	1,1,4,7,10,10-Hexamethyltriethylentetramin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
CH ₃ CN	Acetonitril
CD ₃ CN	deutertes Acetonitril
D ₂ O	deutertes Wasser
R-OG	R-Oxazepam-Glucuronid
S-OG	S-Oxazepam-Glucuronid
R-TG	R-Temazepam-Glucuronid
S-TG	S-Temazepam-Glucuronid
R-LG	R-Lorazepam-Glucuronid
S-LG	S-Lorazepam-Glucuronid
M3G	Morphin-3-Glucuronid

M6G	Morphin-6-Glucuronid
CG	Codein-Glucuronid
HCl	Salzsäure
KOH	Kaliumhydroxid
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Brij	Polyalkylenglykolether
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
KCl	Kaliumchlorid
TiN ₃	Titaniumnitrid
NaH	Natriumhydrid
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
UGT	UDP-Glucuronyltransferasen
CYP	Cytochrom P450-Monooxygenasen
MEA	microelectrode array
HLM	Humane Lebermikrosomen
GABA	γ -aminobutyric acid (Gamma-Aminobuttersäure)
S _N 2	bimolekulare nukleophile Substitution
IC ₅₀	diejenige Hemmkonzentration, bei der die Hemmung des targets 50 % beträgt

8.2 Spektroskopie

LC	Liquid Chromatography
ESI	positive Elektrosprayionisation
CID	collision-induced dissociation
MS	Massenspektroskopie
MS/MS	Tandem Massenspektroskopie (MS ⁿ)
<i>m/z</i>	Quotient aus Masse und Ladung eines Ions
amu	atomare Masseneinheit
HPLC	High performance liquid chromatography
AUC	Area under curve
RP	reversed phase

ec	endcapped
RT	Retentionszeit
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
NMR	nuclear magnetic resonance bzw. Kernmagnetische Resonanz
TMS	Trimethylsilyl
δ	chemische Verschiebung
$^xJ_{a,b}$	Kopplungskonstante für Kopplung zwischen a-H und b-H über x Bindungen
s	Singulett
d	Dublett
t	Triplett
Smp	Schmelzpunkt

8.3 Enzymkinetik

C	Stoffmengenkonzentration
c_0	Anfangskonzentration
t	Zeit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_m	Michaelis-Konstante
K_i	Inhibitorkonstante
E	Enzym
S	Substrat
P	Produkt
ES	Enzym-Substrat-Komplex
EP	Enzym-Produkt-Komplex
k	Geschwindigkeitskonstante

8.4 Statistik

a	Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden
b	Steigung der Regressionsgeraden, Regressionskoeffizient

f	Freiheitsgrade
F	Integralgrenze der F-Verteilung
n	Anzahl
P	Wahrscheinlichkeit
r	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
t	Integralgrenze der t-Verteilung
$t_{(a,b)}$	Prüftest für t-Verteilung
\bar{x}, \bar{y}	Mittelwert
RSD	relative Standardabweichung
SE	Standardfehler
r^2	Determinationskoeffizient
SS	Summe der Abweichungsquadrate
$S_{y,x}$	Standardabweichung der Abweichung
AIC	Akaike Information Criterion
p	Residuals Runs Test

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Konjugation von Aglyka mit Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (Miners und Mackenzie 1991).....	2
Abbildung 1.2 Zwischenprodukt des Hydroxyzuckers.....	10
Abbildung 1.3 Trichloracetimidat-Vorstufe.....	10
Abbildung 1.4 Reaktionsmechanismus der Königs-Knorr-Synthese.....	11
Abbildung 1.5 Darstellung von Morphin-3-Glucuronid durch Michael-Synthese.....	12
Abbildung 3.6 Links ist ein Mikroelektroden-Array (MEA) zu sehen. In der rechten Abbildung ist links die Anordnung der Elektroden in einer 8 x 8 Geometrie dargestellt. In der rechten Abbildung oben ist eine Elektrode dargestellt und unten eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Elektrodenoberfläche (Abb. von Fa. Multi Channel Systems).....	49
Abbildung 3.7 Mikroelektroden-Array (MEA): Messanordnung mit Verstärker (Abb. von Fa. Multi Channel Systems).....	50
Abbildung 3.8 Mikroelektroden-Array (MEA): Sensorpräparation (Teile der Abbildung wurden übernommen von Geoffrey M. Cooper, The Cell, 2nd Edition).....	51
Abbildung 3.9 Mikroelektroden-Array (MEA): Exemplarische Darstellung eines Datensatzes von den 60 Elektroden des MEA. Spontane native Aktivität eines Netzwerkes nach 24 Tagen in vitro. Jedes Fenster zeigt das Signal einer Elektrode über einen Zeitraum von zwei Sekunden.....	52
Abbildung 4.10 Glucuronidierung von (R,S)-Oxazepam.....	53
Abbildung 4.11 MS3 von S-Oxazepam-Glucuronid nach Glucuronsäureabspaltung.....	57
Abbildung 4.12 MS3 von S-Lorazepam-Glucuronid nach Glucuronsäureabspaltung....	57
Abbildung 4.13 1H-NMR-Spektrum von R-Oxazepam-Glucuronid (700 MHz, CD ₃ CN/D ₂ O 70/30).....	58
Abbildung 4.14 1H-NMR-Spektrum von S-Oxazepam-Glucuronid (700 MHz, CD ₃ CN/D ₂ O 70/30).....	59
Abbildung 4.15 1H-NMR-Spektrum von R-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, MeOD/D ₂ O 70/30).....	59
Abbildung 4.16 1H-NMR-Spektrum von S-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, MeOD/D ₂ O 70/30).....	60
Abbildung 4.17 1H-NMR-Spektrum von R-Lorazepam-Glucuronid (700 MHz, CD ₃ CN/D ₂ O 70/30).....	60
Abbildung 4.18 1H-NMR-Spektrum von S-Lorazepam-Glucuronid (700 MHz, CD ₃ CN/D ₂ O 70/30).....	61
Abbildung 4.19 1H-NMR-Spektren: (a)+(b) Gemisch R- und S-Temazepam-Glucuronid, (c) S-Oxazepam-Glucuronid, (d) S-Lorazepam-Glucuronid, (e) R-Oxazepam-Glucuronid, (f) R-Lorazepam-Glucuronid.	62

Abbildung 4.20 ¹ H-NMR-Spektrum eines Gemisches aus R- und S-Temazepam-Glucuronid (300 MHz, MeOD/D ₂ O 70/30).....	65
Abbildung 4.21 Methylierung, Peracylierung und Bromierung von Glucuronsäure.....	66
Abbildung 4.22 Austausch des Bromidions des acetylgeschützten Glucopyranuronosylbromids gegen die Hydroxygruppe.....	67
Abbildung 4.23 Kalibriergerade von Oxazepam; r: 0,99179; Steigung: 0,0041 ± 0,00007. Als interner Standard (IS) wurde Phenacetin verwendet.....	72
Abbildung 4.24 Kalibriergerade von Temazepam; r: 0,99529; Steigung: 0,0050 ± 0,00006. Als interner Standard (IS) wurde Phenacetin verwendet.....	73
Abbildung 4.25 Kalibriergerade von Morphin-3-Glucuronid; r: 0,99855; Steigung: 758,50 ± 5,78.....	73
Abbildung 4.26 Kalibriergerade von Morphin-6-Glucuronid; r: 0,99733; Steigung: 773,94 ± 7,57.....	74
Abbildung 4.27 Kalibriergerade von Codein-Glucuronid; r: 0,99503; Steigung: 834,06 ± 11,46.....	74
Abbildung 4.28 Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Zeit.....	82
Abbildung 4.29 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	83
Abbildung 4.30 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.....	84
Abbildung 4.31 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.....	85
Abbildung 4.32 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit der UDPGA-Konzentration, dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	85
Abbildung 4.33 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam (●) und S-Oxazepam (▼) in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Michaelis-Menten-Diagramm.....	87
Abbildung 4.34 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam (●) und S-Temazepam (▼) in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Michaelis-Menten-Diagramm.....	87
Abbildung 4.35 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	88
Abbildung 4.36 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	88
Abbildung 4.37 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	89

Abbildung 4.38 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Temazepam in Abhängigkeit von der Konzentration mit Mikrosomencharge 28 im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	89
Abbildung 4.39 Screening von R-Temazepam mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen sowie Mikrosomen der Charge 41207.....	92
Abbildung 4.40 Screening von S-Temazepam mit allen kommerziell verfügbaren Isoformen sowie Mikrosomen der Charge 41207.....	92
Abbildung 4.41 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam mit UGT2B7 im Michaelis-Menten-Diagramm.....	93
Abbildung 4.42 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam mit UGT2B7 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,941, K_m : $402 \pm 88 \mu\text{M}$, V_{max} : $62 \pm 6 \text{ pmol/min/mg}$	94
Abbildung 4.43 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B7 im Michaelis-Menten-Diagramm.....	94
Abbildung 4.44 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B7 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,878, K_m : $116 \pm 22 \mu\text{M}$, V_{max} : $25 \pm 1 \text{ pmol/min/mg}$	95
Abbildung 4.45 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B15 im Michaelis-Menten-Diagramm.....	96
Abbildung 4.46 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam mit UGT2B15 im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,910, K_m : $72 \pm 11 \mu\text{M}$, V_{max} : $10 \pm 0,4 \text{ pmol/min/mg}$	96
Abbildung 4.47 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	100
Abbildung 4.48 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM von Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,909, K_i : $10,4 \pm 1,47 \text{ mM}$, K_m : $133 \pm 13 \mu\text{M}$, V_{max} : $27 \pm 1 \text{ pmol/min/mg}$	100
Abbildung 4.49 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	101
Abbildung 4.50 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,874, K_i : $5,3 \pm 1,12 \text{ mM}$, K_m : $78 \pm 14 \mu\text{M}$, V_{max} : $74 \pm 5 \text{ pmol/min/mg}$	101
Abbildung 4.51 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	102
Abbildung 4.52 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-	

Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,962, K_i : $9,4 \pm 1,37$ mM, K_m : 552 ± 100 μ M, V_{max} : 180 ± 20 pmol/min/mg.....	102
Abbildung 4.53 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	103
Abbildung 4.54 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Morphin als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,966, K_i : $8,8 \pm 1,24$ mM, K_m : 104 ± 9 μ M, V_{max} : 179 ± 5 pmol/min/mg.....	103
Abbildung 4.55 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	104
Abbildung 4.56 Glucuronidierung von R-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,958, K_i : $3,8 \pm 0,45$ mM, K_m : 116 ± 15 μ M, V_{max} : 41 ± 2 pmol/min/mg.....	104
Abbildung 4.57 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	105
Abbildung 4.58 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,978, K_i : $3,3 \pm 0,28$ mM, K_m : 54 ± 4 μ M, V_{max} : 81 ± 2 pmol/min/mg.....	105
Abbildung 4.59 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	106
Abbildung 4.60 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,929, K_i : $4,3 \pm 0,70$ mM, K_m : 720 ± 69 μ M, V_{max} : 194 ± 41 pmol/min/mg.....	106
Abbildung 4.61 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	107
Abbildung 4.62 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam bei Zugabe von 0; 2,5; 5 und 10 mM Codein als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r^2 : 0,961, K_i : $3,9 \pm 0,44$ mM, K_m : 130 ± 14 μ M, V_{max} : 133 ± 5 pmol/min/mg.....	107
Abbildung 4.63 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μ M Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	109
Abbildung 4.64 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μ M Oxazepam als Inhibitor (I) im	

Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,951, K_i : $590 \pm 123 \mu\text{M}$, K_m : $5,8 \pm 0,56 \text{ mM}$, V_{max} : $1,23 \pm 0,06 \text{ nmol/min/mg}$	109
Abbildung 4.65 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	110
Abbildung 4.66 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,968, K_i : $1026 \pm 244 \mu\text{M}$, K_m : $13,6 \pm 1,64 \text{ mM}$, V_{max} : $0,61 \pm 0,05 \text{ nmol/min/mg}$	110
Abbildung 4.67 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	111
Abbildung 4.68 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 25; 50; 100 und 250 μM Oxazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,940, K_i : $179 \pm 24 \mu\text{M}$, K_m : $2,3 \pm 0,21 \text{ mM}$, V_{max} : $0,66 \pm 0,02 \text{ nmol/min/mg}$	111
Abbildung 4.69 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor im Michaelis-Menten-Diagramm.....	112
Abbildung 4.70 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 3 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,964, K_i : $381 \pm 41 \mu\text{M}$, K_m : $7,3 \pm 0,80 \text{ mM}$, V_{max} : $1,62 \pm 0,09 \text{ nmol/min/mg}$	112
Abbildung 4.71 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	113
Abbildung 4.72 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Morphin an Position 6 bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,964, K_i : $375 \pm 39 \mu\text{M}$, K_m : $16,0 \pm 2,68 \text{ mM}$, V_{max} : $0,8 \pm 0,09 \text{ nmol/min/mg}$	113
Abbildung 4.73 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Michaelis-Menten-Diagramm.....	114
Abbildung 4.74 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von Codein bei Zugabe von 0; 50; 100; 250 und 500 μM Temazepam als Inhibitor (I) im Lineweaver-Burk-Diagramm; die enzymkinetischen Daten sind: r_2 : 0,929, K_i : $265 \pm 38 \mu\text{M}$, K_m : $2,3 \pm 0,27 \text{ mM}$, V_{max} : $0,58 \pm 0,02 \text{ nmol/min/mg}$	114
Abbildung 4.75 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in vitro gewachsener neocorticaler Zellen nach zwei Wochen. Rot: neuronale Somata und Dendriten. Grün: links: Synapsin, rechts: Astrocyten.....	118
Abbildung 4.76 Burstrate von Temazepam alleine, und Temazepam mit 500 nM GABA.	119

Abbildung 4.77 Datensätze mit Bursterscheinungen an den 60 Elektroden des MEA nach Zugabe von 100 nM Temazepam (links) und 100 nM Temazepam + 1 μ M GABA (rechts).....	119
Abbildung 4.78 Links ist die Spikeanzahl/Burst und rechts ist die Burstdauer bei Zugabe von Temazepam (1-100 nM) abgebildet.....	120
Abbildung 4.79 Burstrate nach Zugabe von 1 bzw. 5 μ M R- oder S-Tamazepam-Glucuronid alleine und mit 500 nM GABA.....	120
Abbildung 4.80 Spikeanzahl/Burst und Burstdauer nach Zugabe von 1 oder 5 μ M R- oder S-Tamazepam-Glucuronid alleine, oder mit 500 nM GABA.....	121
Abbildung 5.81 Strukturformel der R- und S-Benzodiazepin-Glucuronide mit Nummerierung.....	126
Abbildung 10.82 ¹ H-NMR von 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-brom-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethyl-ester (250 MHz, CDCl ₃).....	185
Abbildung 10.83 ¹ H-NMR von 1-Brom-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl- α -D-glucopyranuronsäuremethylester (250 MHz, CDCl ₃).....	185
Abbildung 10.84 ¹ H-NMR von 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hydroxy-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethylester (250 MHz, CDCl ₃).....	186
Abbildung 10.85 MS ² von R-Oxazepam-Glucuronid.....	186
Abbildung 10.86 MS ² von S-Oxazepam-Glucuronid.....	187
Abbildung 10.87 MS ² von R-Tamazepam-Glucuronid.....	187
Abbildung 10.88 MS ² von S-Tamazepam-Glucuronid.....	188
Abbildung 10.89 MS ² von R-Lorazepam-Glucuronid.....	188
Abbildung 10.90 MS ² von S-Lorazepam-Glucuronid.....	189
Abbildung 10.91 Chromatogramm der Oxazepam-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 100 μ M Oxazepam: RT 5,2 Phenacetin; RT 8,7 R-Oxazepam-Glucuronid; RT 9,5 S-Oxazepam-Glucuronid; RT 19,2 Oxazepam.....	189
Abbildung 10.92 Chromatogramm der Temazepam-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 500 μ M Temazepam: RT 5,0 Phenacetin; RT 12,8 R-Tamazepam-Glucuronid; RT 13,6 S-Tamazepam-Glucuronid; RT 28,0 Temazepam.....	190
Abbildung 10.93 Chromatogramm der Morphin-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 5 mM Morphin: RT 3,5 Morphin-3-Glucuronid; RT 5,7 Morphin-6-Glucuronid; RT 7,1 Morphin.....	190
Abbildung 10.94 Chromatogramm der Codein-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 2,5 mM Codein: RT 6,1 Codein-Glucuronid; RT 9,4 Codein.....	190
Abbildung 10.95 Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Zeit..	191
Abbildung 10.96 Glucuronidierung von R-Tamazepam in Abhängigkeit von der Zeit.	191
Abbildung 10.97 Glucuronidierung von S-Tamazepam in Abhängigkeit von der Zeit.	191

Abbildung 10.98 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	192
Abbildung 10.99 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	192
Abbildung 10.100 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	192
Abbildung 10.101 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.....	193
Abbildung 10.102 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.....	193
Abbildung 10.103 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.....	193
Abbildung 10.104 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.....	194
Abbildung 10.105 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	194
Abbildung 10.106 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.....	195
Abbildung 10.107 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	195
Abbildung 10.108 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.....	196
Abbildung 10.109 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von S-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.....	196

10 Anhang

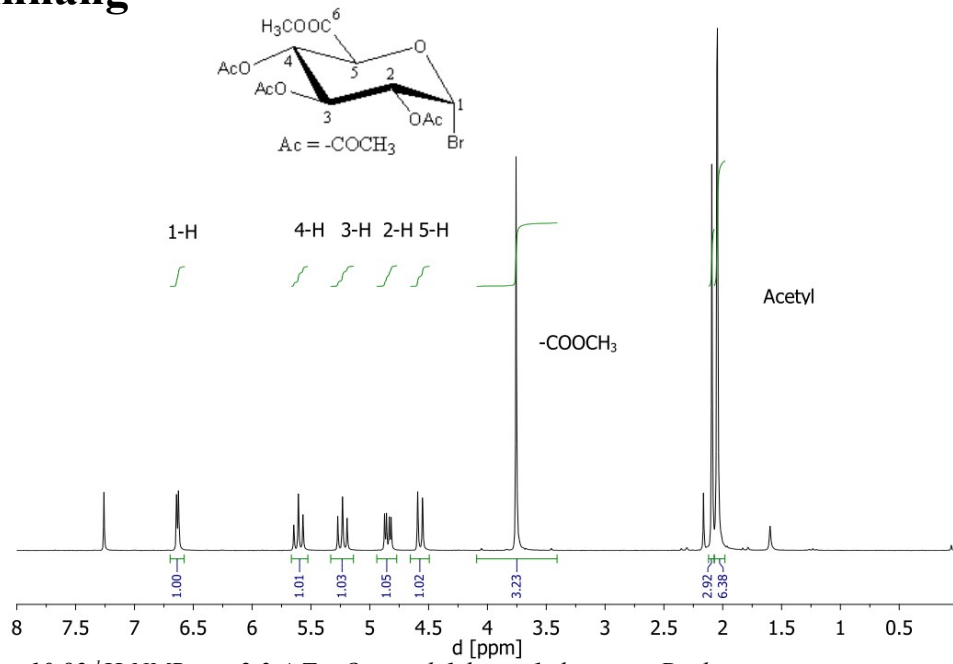


Abbildung 10.82 $^1\text{H-NMR}$ von 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-bromo-1-desoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethyl-ester (250 MHz, CDCl_3).

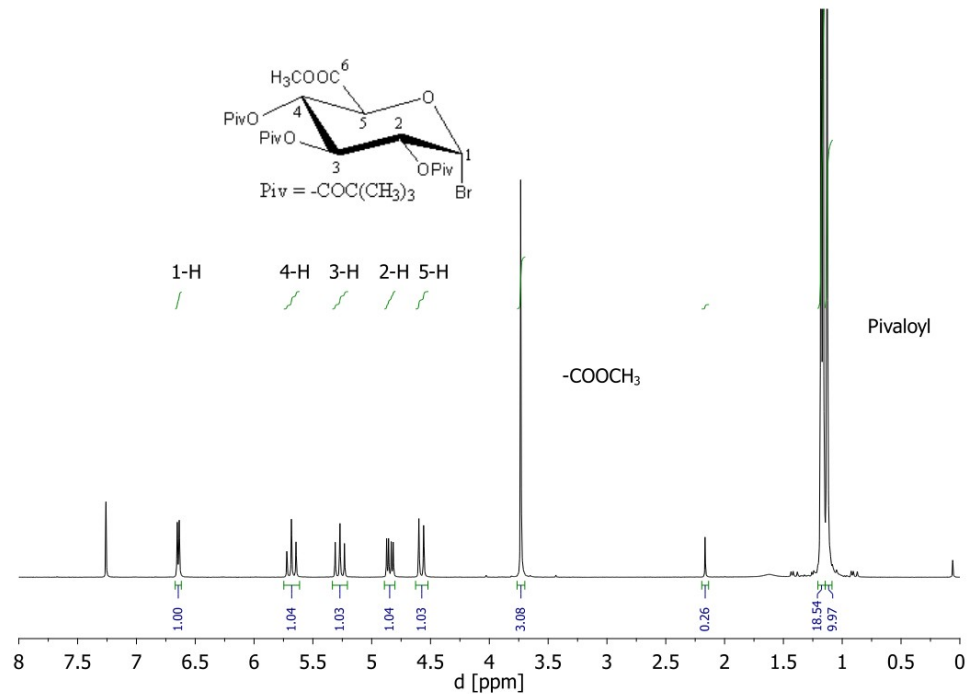


Abbildung 10.83 $^1\text{H-NMR}$ von 1-Bromo-1-desoxy-2,3,4-tri-O-pivaloyl- α -D-glucopyranuronsäuremethyl-ester (250 MHz, CDCl_3).

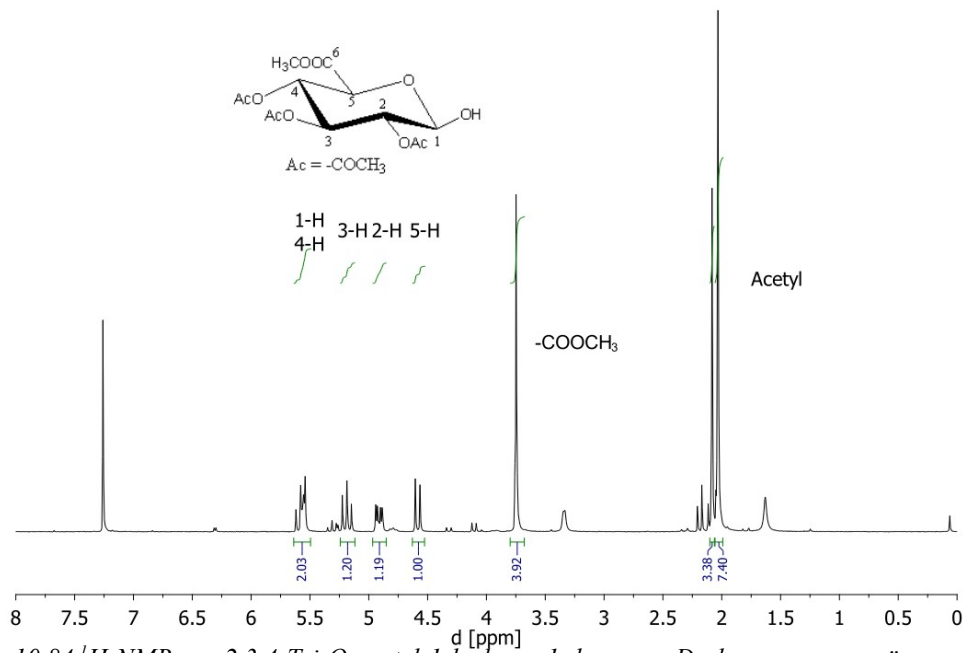


Abbildung 10.84 ¹H-NMR von 2,3,4-Tri-O-acetyl-1-hydroxy-1-deoxy- α -D-glucopyranuronsäuremethyl-ester (250 MHz, CDCl₃).

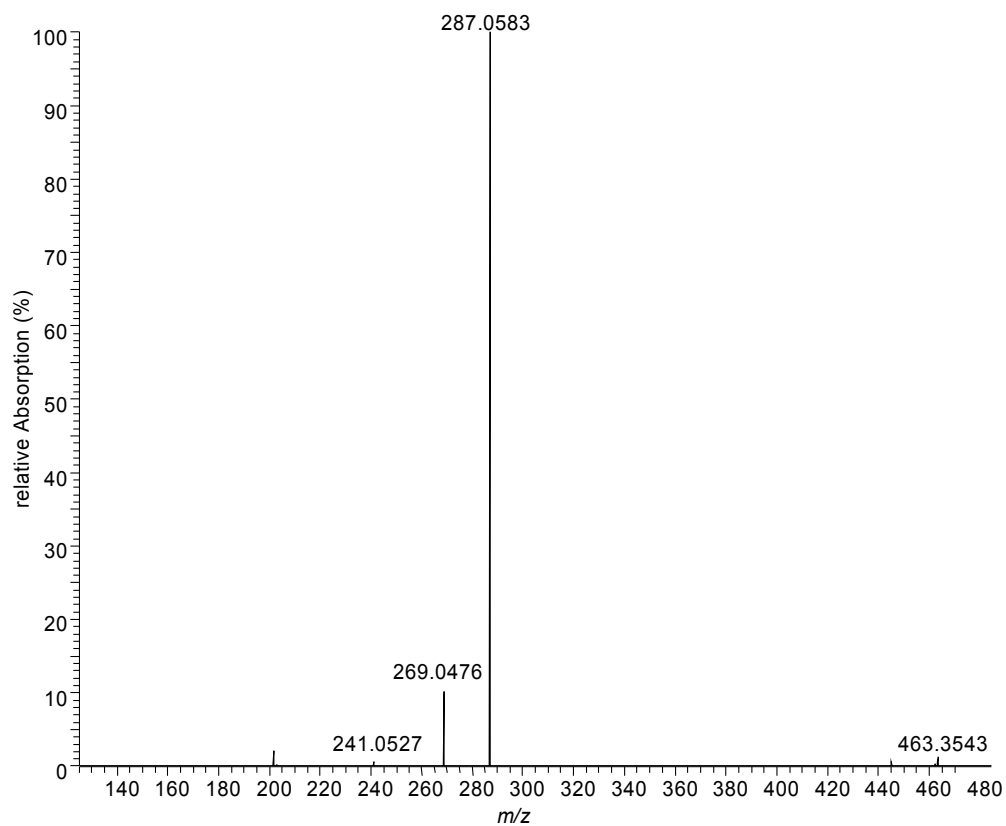


Abbildung 10.85 MS² von R-Oxazepam-Glucuronid.

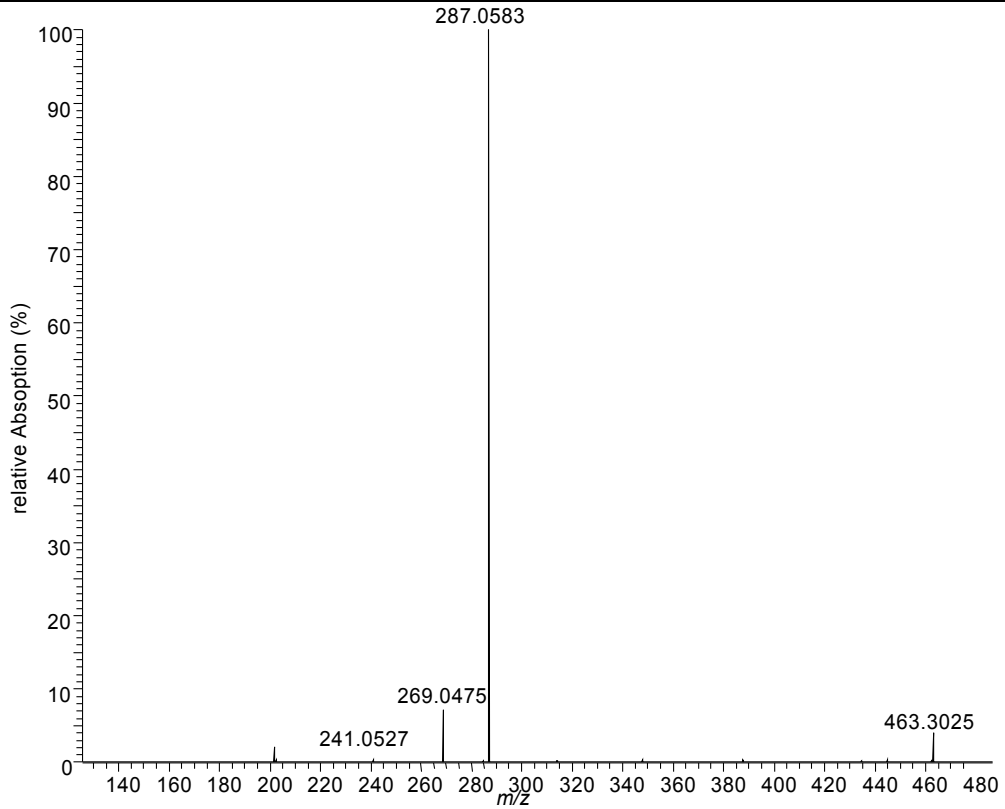


Abbildung 10.86 MS^2 von S-Oxazepam-Glucuronid.

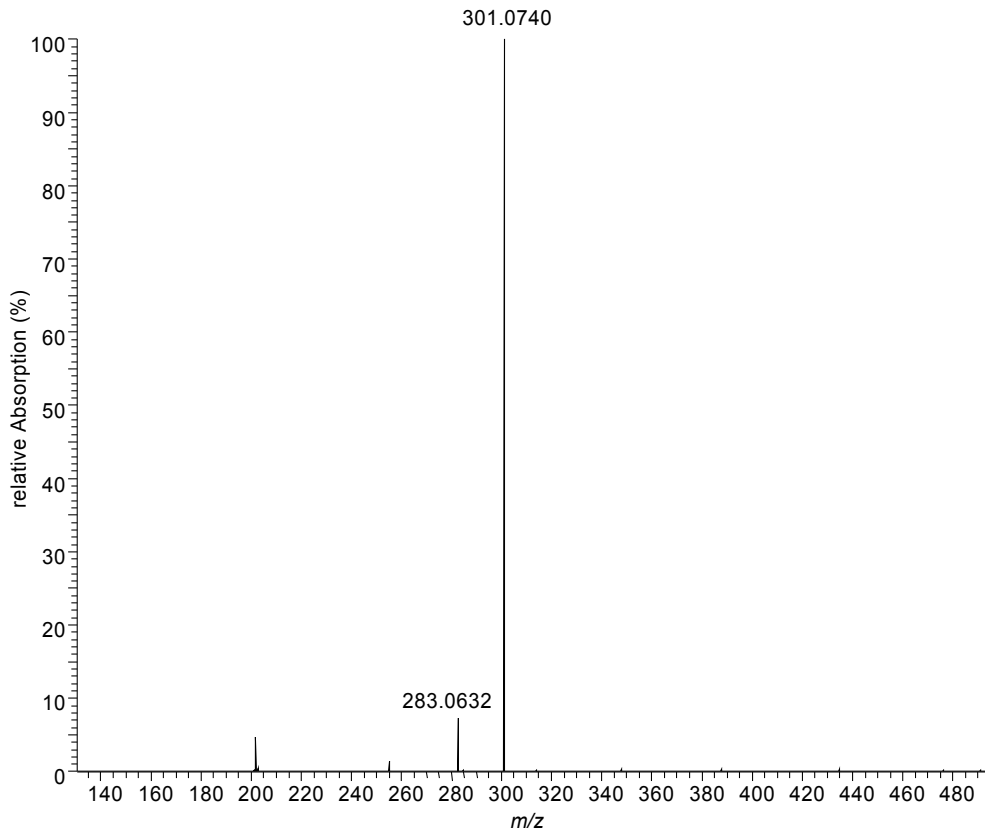


Abbildung 10.87 MS^2 von R-Temazepam-Glucuronid.

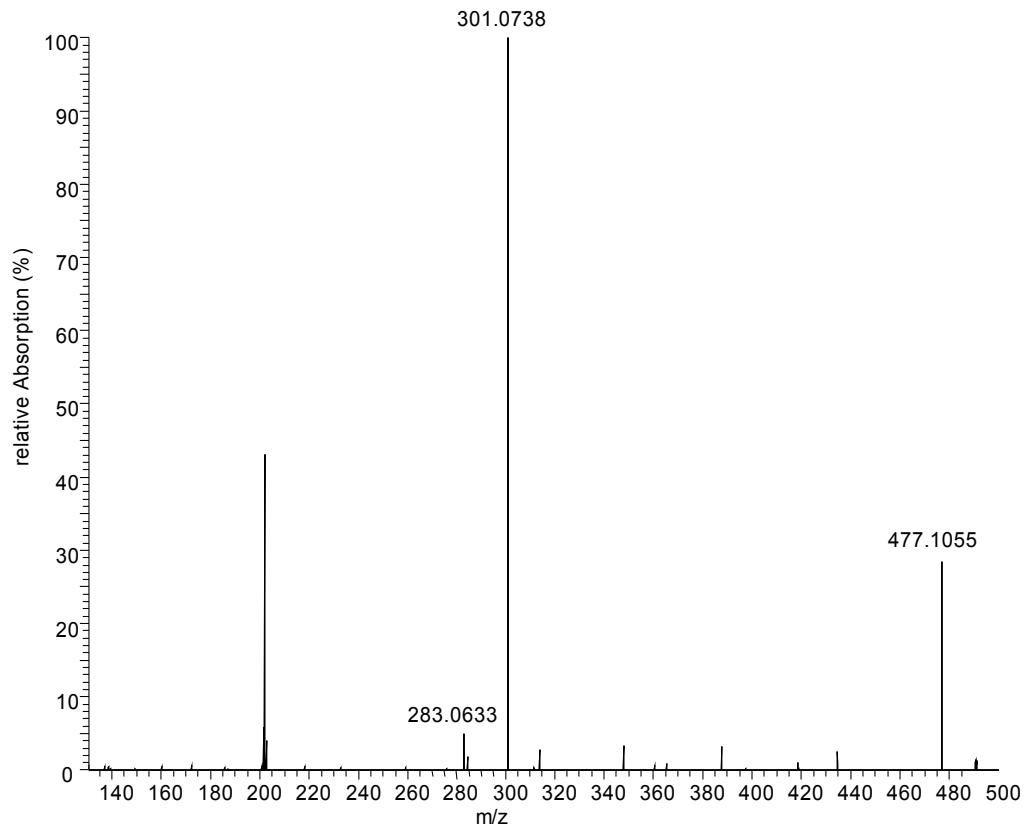


Abbildung 10.88 MS^2 von S-Temazepam-Glucuronid.

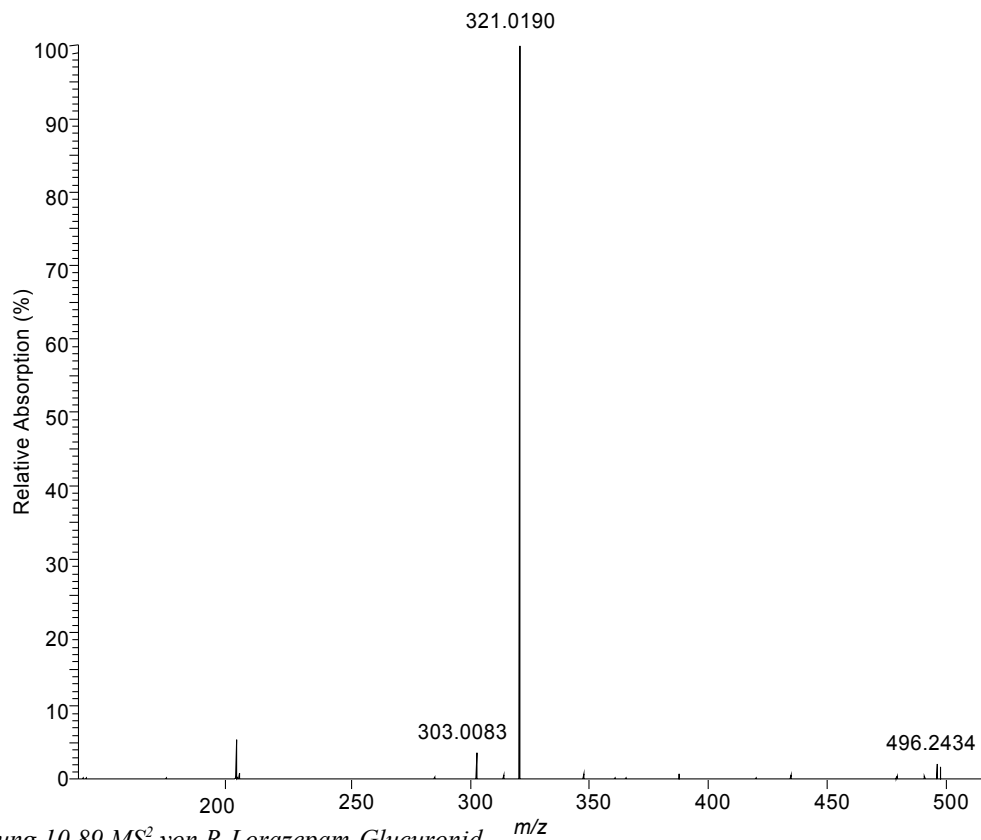


Abbildung 10.89 MS^2 von R-Lorazepam-Glucuronid.

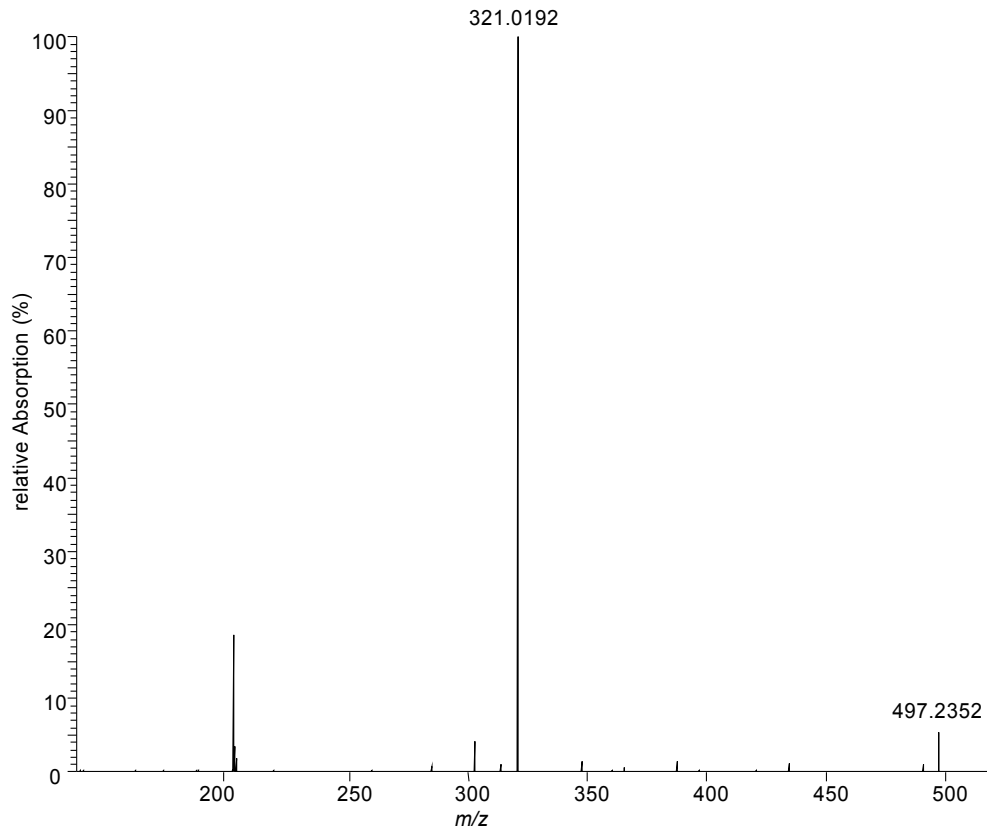


Abbildung 10.90 MS² von S-Lorazepam-Glucuronid.

Alle Spektren zeigen einen Peak bei m/z 201. Dieser kommt durch einen Fehler des Gerätes zustande und ist nach Aussage des Herstellers nicht zu beseitigen.

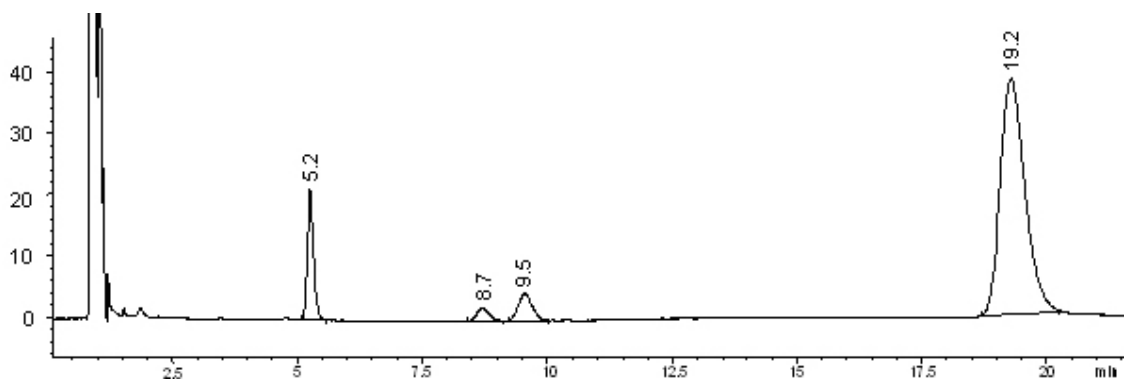


Abbildung 10.91 Chromatogramm der Oxazepam-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 100 μ M Oxazepam: RT 5,2 Phenacetin; RT 8,7 R-Oxazepam-Glucuronid; RT 9,5 S-Oxazepam-Glucuronid; RT 19,2 Oxazepam.

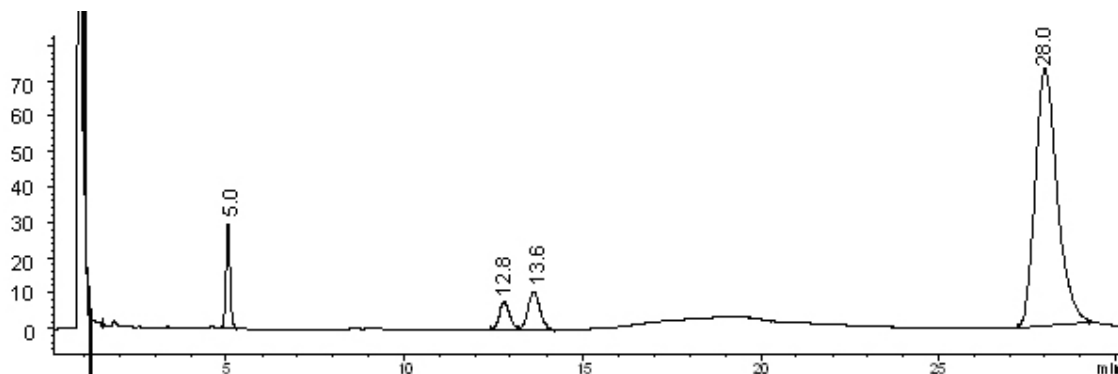


Abbildung 10.92 Chromatogramm der Temazepam-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 500 μ M Temazepam: RT 5,0 Phenacetin; RT 12,8 R-Temazepam-Glucuronid; RT 13,6 S-Temazepam-Glucuronid; RT 28,0 Temazepam.

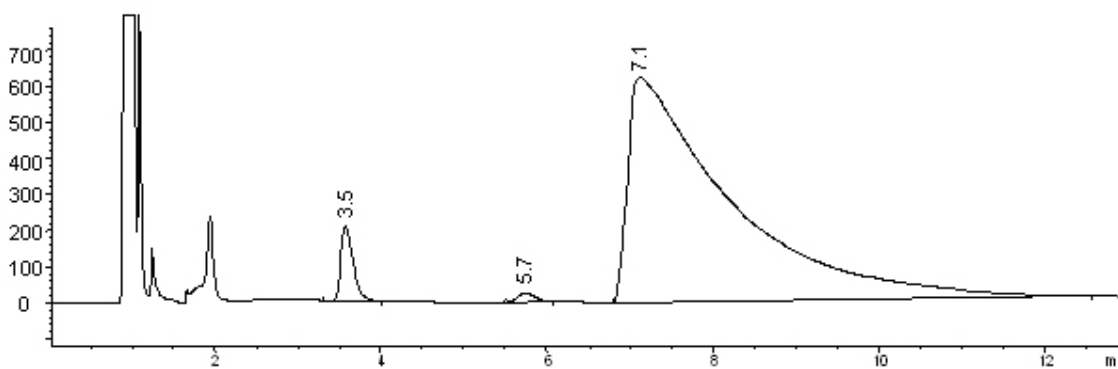


Abbildung 10.93 Chromatogramm der Morphin-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 5 mM Morphin: RT 3,5 Morphin-3-Glucuronid; RT 5,7 Morphin-6-Glucuronid; RT 7,1 Morphin.

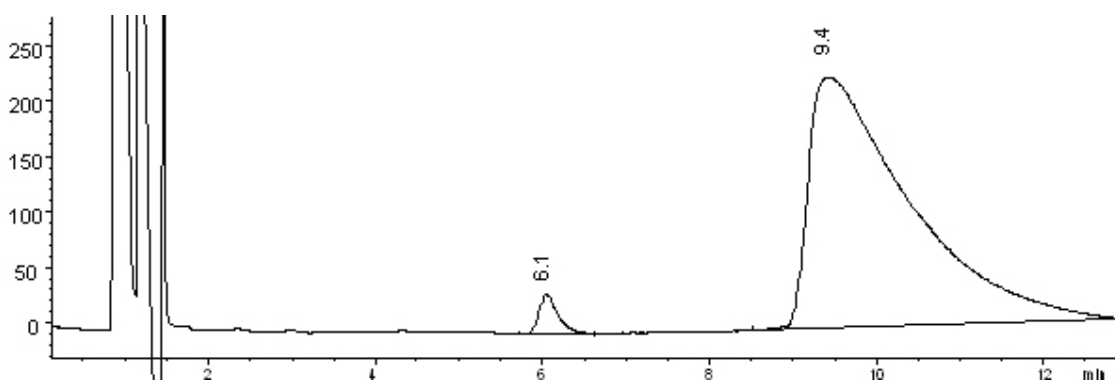


Abbildung 10.94 Chromatogramm der Codein-Glucuronid-Bestimmung bei Inkubation von 2,5 mM Codein: RT 6,1 Codein-Glucuronid; RT 9,4 Codein.

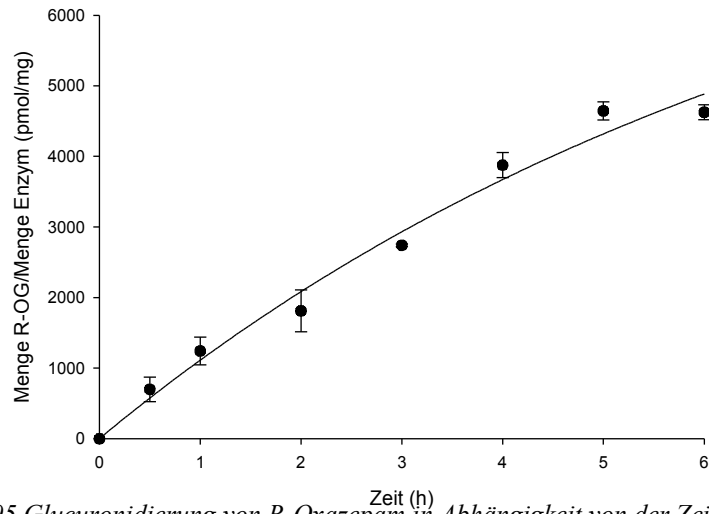


Abbildung 10.95 Glucuronidierung von R-Oxazepam in Abhängigkeit von der Zeit.

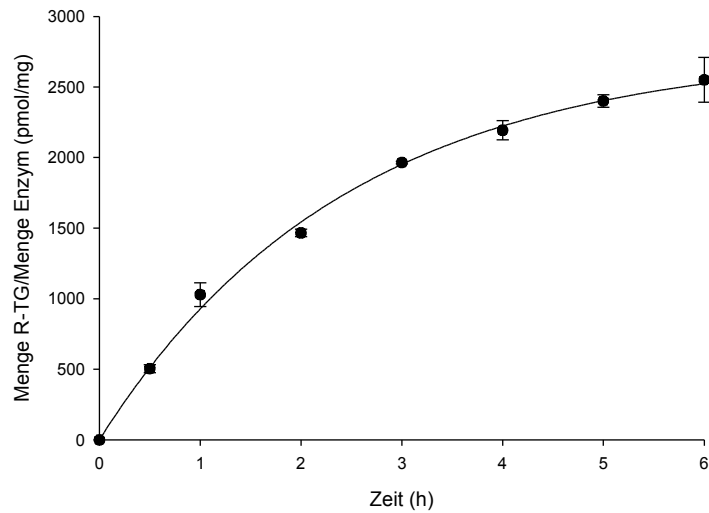


Abbildung 10.96 Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Zeit.

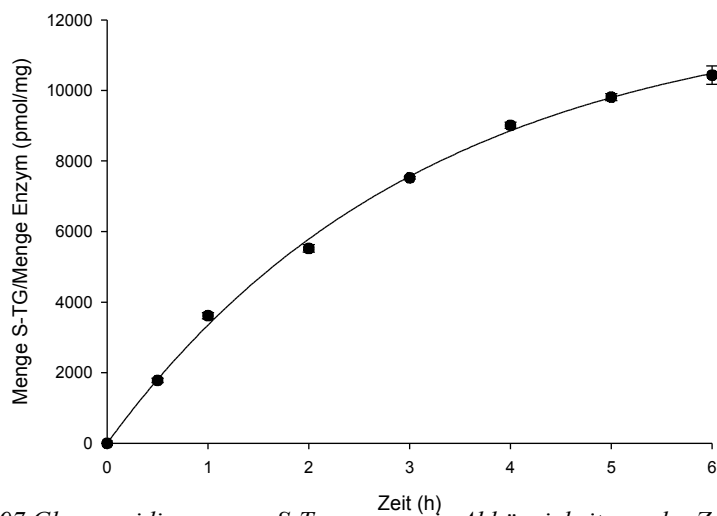


Abbildung 10.97 Glucuronidierung von S-Temazepam in Abhängigkeit von der Zeit.

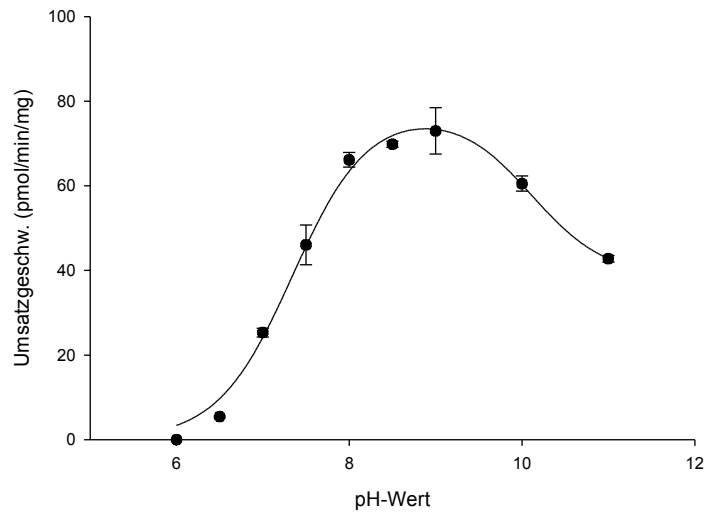


Abbildung 10.98 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.

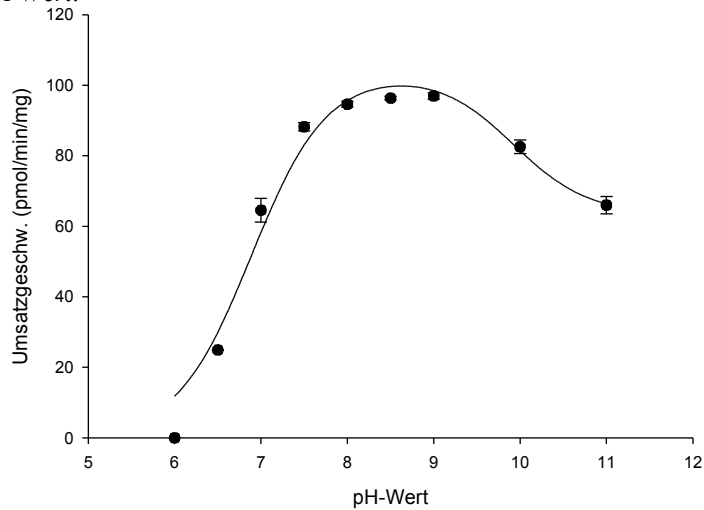


Abbildung 10.99 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.

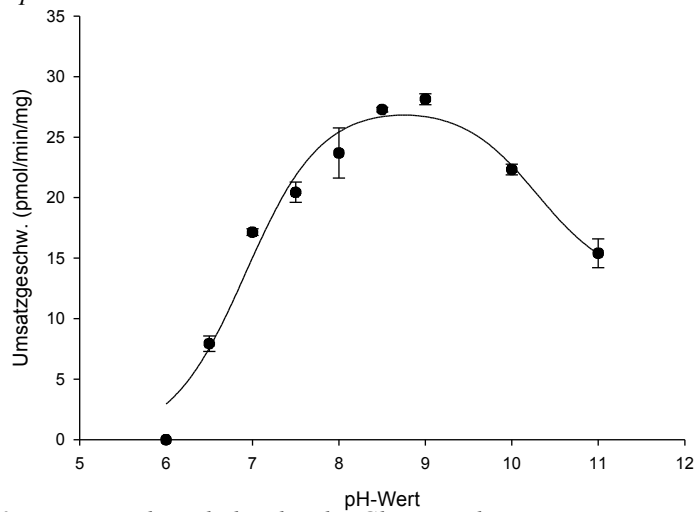


Abbildung 10.100 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit vom pH-Wert.

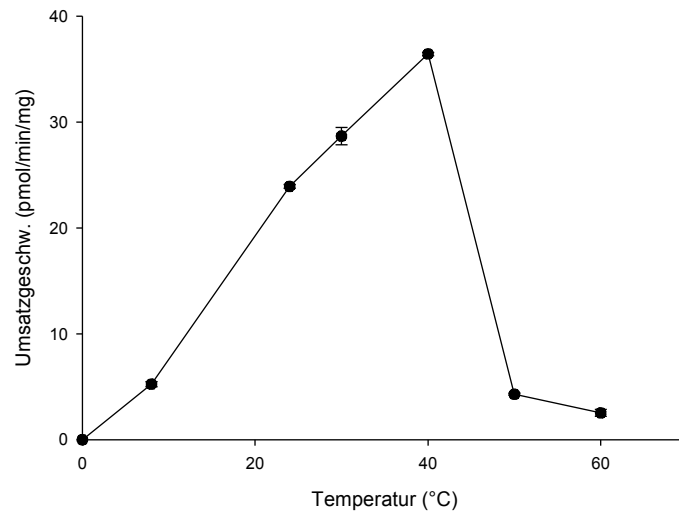


Abbildung 10.101 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von S-Oxazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.

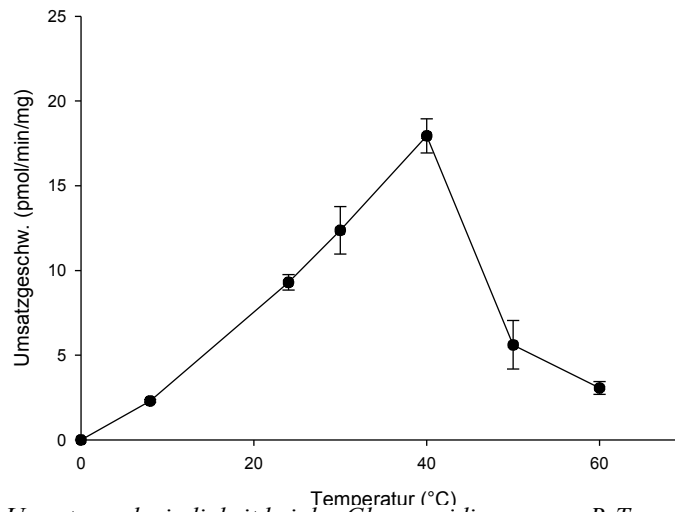


Abbildung 10.102 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.

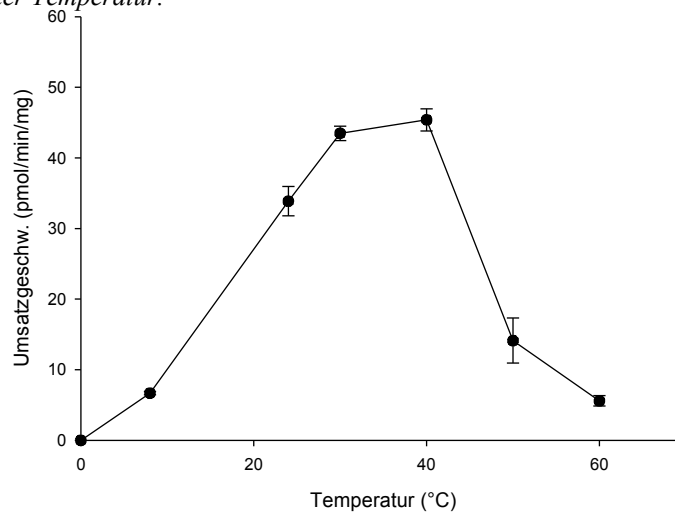


Abbildung 10.103 Umsatzgeschwindigkeit bei der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der Temperatur.

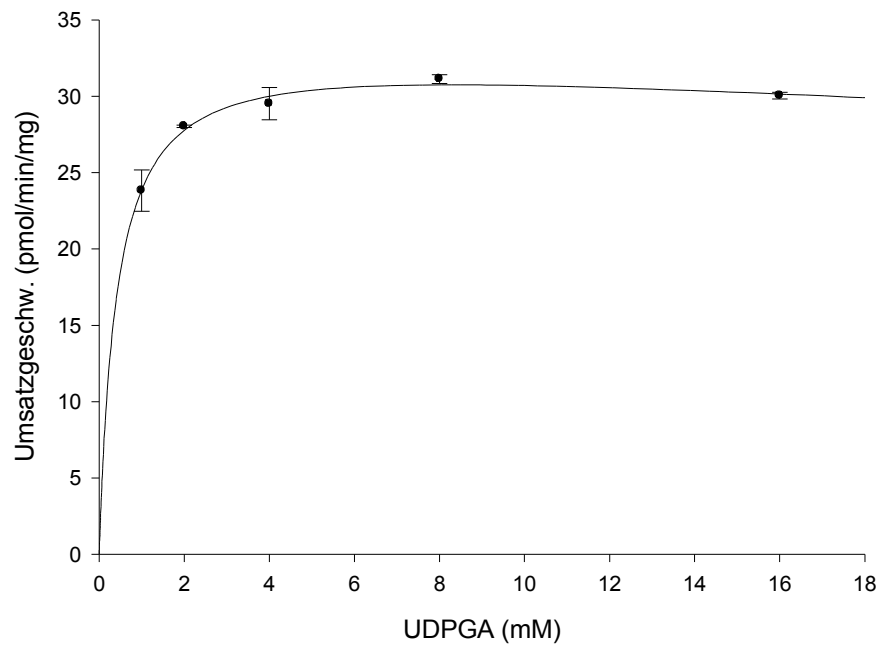


Abbildung 10.104 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.

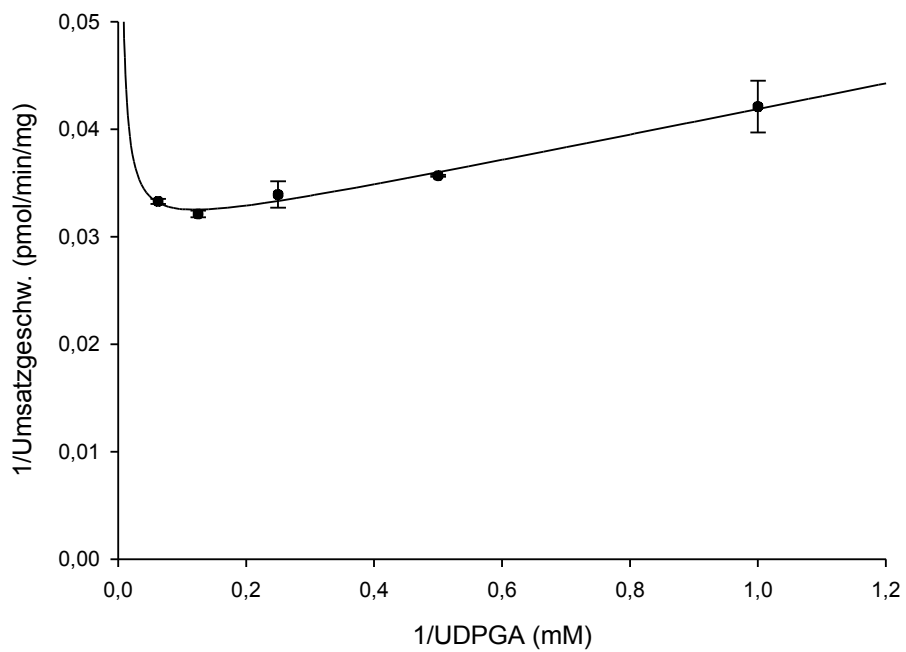


Abbildung 10.105 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Oxazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.

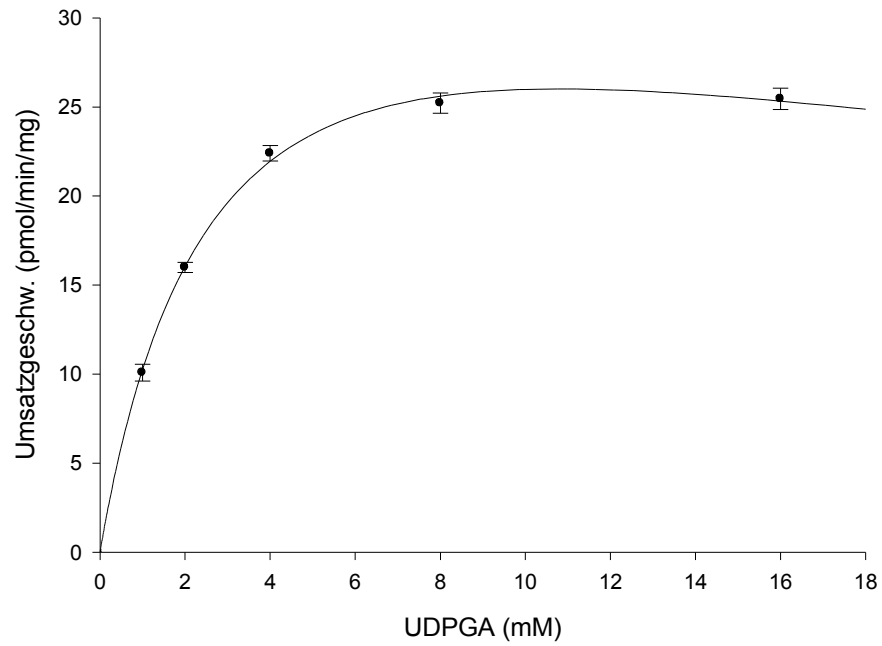


Abbildung 10.106 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.

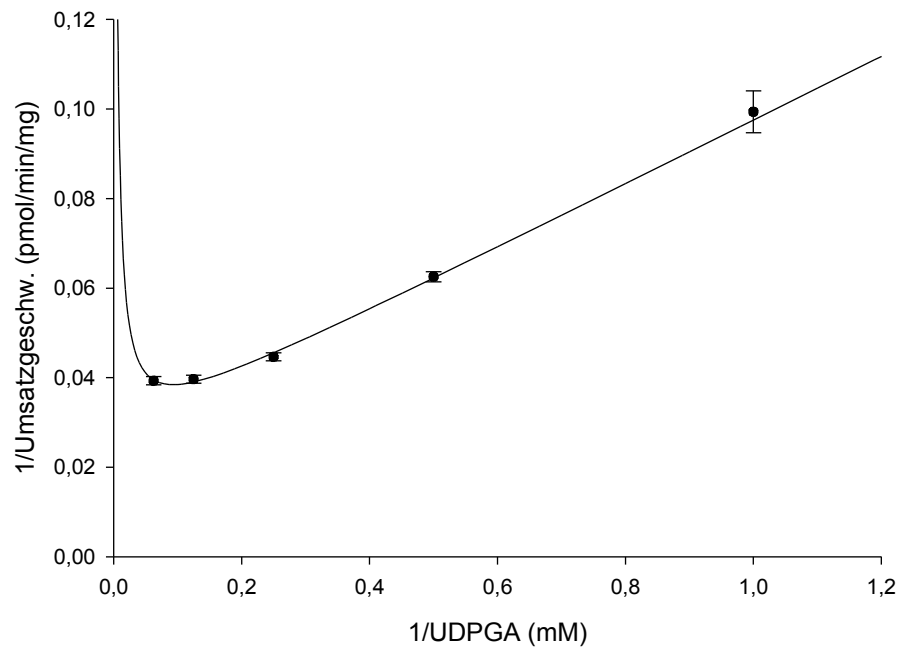


Abbildung 10.107 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von R-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.

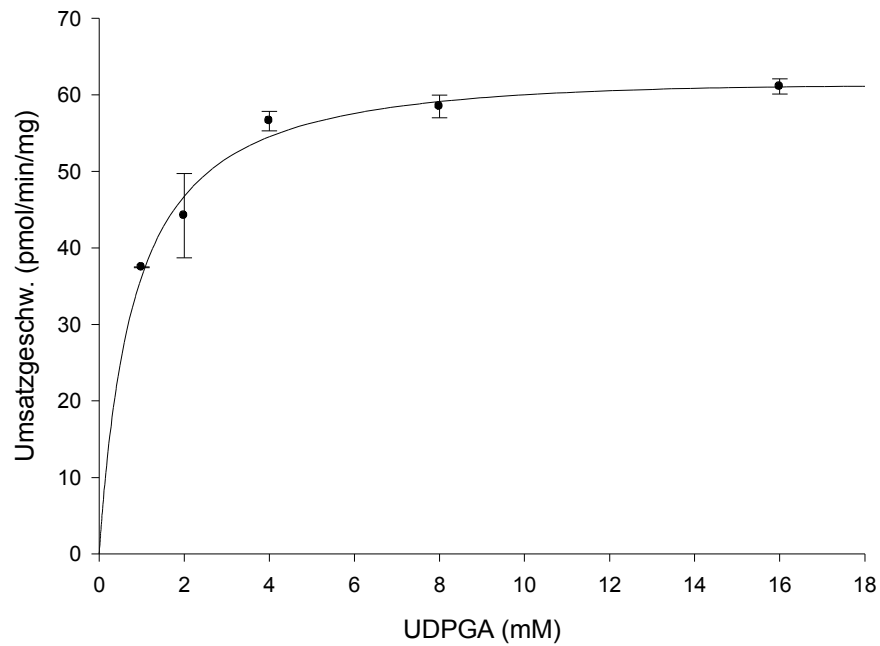


Abbildung 10.108 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Michaelis-Menten-Diagramm.

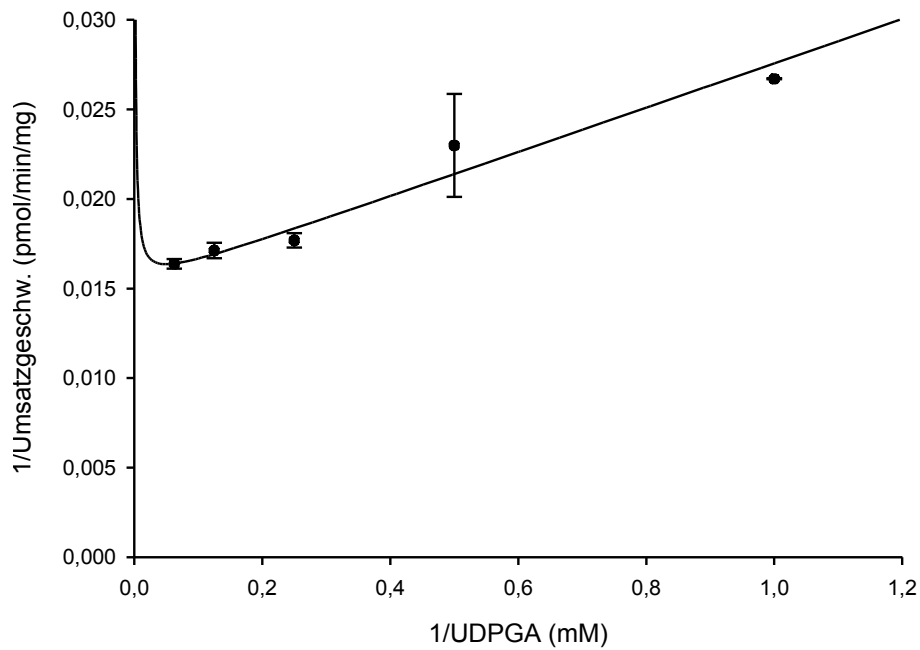


Abbildung 10.109 Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung von *S*-Temazepam in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration dargestellt im Lineweaver-Burk-Diagramm.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Käferstein in Kooperation mit dem Pharmazeutischen Institut der Universität Marburg und Frau Prof. Dr. M. Petersen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H. Käferstein für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, eigene Ideen mit einzubringen. Außerdem bedanke ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang sowie für die schnelle und präzise Durchsicht der Dissertation, auch am Ende dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. M. Petersen für die aufmerksame Mitbetreuung meiner Promotion und die stets motivierenden Hilfestellungen auch bei Tiefpunkten während dieser Arbeit. Ihre ausgeglichene Art, die Fähigkeit immer positiv zu denken, werden mir in Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. M. A. Rothschild für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Rechtsmedizin durchzuführen, die Unterstützung und das Vertrauen auf Kongressen meine Arbeit präsentieren zu können sowie für sein Mitwirken in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. M. Schlitzer für die Bereitschaft, sich als Prüfer zur Verfügung zu stellen.

Frau Dr. Katja Bender für ihr unermüdliches Engagement, ihre Begeisterungsfähigkeit, ihrer Idee vom perfekten Forschungsumfeld, das Vertrauen, mich ans Max Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz zu bringen, unsere Streitgespräche und vieles mehr inner- und außerhalb des Instituts.

Den Mitarbeitern der Blutalkoholuntersuchungsstelle Christa Herold, Yvonne Weingarten und Thomas Fischer für die Einrichtung und Überlassung eines Arbeitsplatzes, ein hervorragendes Arbeitsklima und ihrer Bereitschaft, mich als gleichberechtigte Mitarbeiterin ihrer Abteilung aufzunehmen.

Herrn Dr. Martin Jübner für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit, den damit verbundenen Gedankenaustausch, den vielen guten Einfällen und Tipps und sein immer offenes Ohr für alle Belange.

Herrn Dr. G. Sticht für seine kompetente Hilfe, seinen vielen Ratschlägen bei Problemen jeglicher Art, die bei dieser Arbeit auftauchten. Sein chemischer Sachverstand verbunden mit praktischer Kreativität haben mich oft zum Staunen gebracht.

All den Mitarbeitern der Rechtsmedizin, die meinen Alltag am Institut bereichern haben.

Herrn Prof. Dr. W. Knoll vom Max Planck-Institut für Polymerforschung für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und die damit verbundene Kooperation. Frau Dr. Melanie Jungblut für die pharmakologischen Untersuchungen dieser Arbeit sowie Dr. Uli Jonas und Dr. Manfred Wagner für ihre Ratschläge und Diskussionsbereitschaft rund um die NMR-Messungen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Thevis von der Sporthochschule Köln für die angenehme Kooperation bezüglich der LC/MS-Messungen.

Meinem Mann Mike für seine Bereitschaft, diese Arbeit mit mir zu tragen, für die Unterstützung in allen Bereichen der Arbeit und das damit verbundene Durchleben aller Höhen und Tiefen während dieser Zeit.

Meinen Eltern für ihr Vermitteln der für mich wichtigen Eigenschaften im Leben. Meiner ganzen Familie, besonders meiner Schwester und meiner Dote für ihren Glauben an mich und ihre Bereitschaft stets zuzuhören.

Meinen Freunden für ihre Unterstützung, besonders Dani für unglaublich lange Telefongespräche, ihr Interesse und Beistand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Pallmann
Vorname	Tanja
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	28. Mai 1974
Geburtsort	Pforzheim
Familienstand	verheiratet, keine Kinder

Schulbildung

Aug 1980 - Juli 1984	Grundschule Schömberg, Kreis Calw
Aug 1984 - Juni 1993	Hermann-Hesse Gymnasium, Calw

Berufsausbildung

Aug 1993 - Feb 1996	Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin, Kerschensteiner Schule, Stuttgart
---------------------	--

Studium

April 1996 - Okt 1998	Pharmaziestudium an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt
Okt 1998 - Okt 2000	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität, Marburg
Dez 2000	2. Staatsexamen
Dez 2000 - Juni 2001	1. Teil des Praktischen Jahres, Hirsch-Apotheke, Essen
Juli 2001 - Dez 2001	2. Teil des Praktischen Jahres, University of Otago, Dunedin, Neuseeland, Abschluss: Postgraduate Certificate
Mai 2002	3. Staatsexamen mit Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Erfahrungen

Mai 2003 - Aug 2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut der Universität zu Bonn
April 2004 - Dez 2007	Doktorandin am Institut für Rechtsmedizin des Klinikums der Universität zu Köln, Forensische Toxikologie
Okt 2004 - Dez 2004	Forschungsaufenthalt am Max Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz
Mai 2005 - Mai 2007	Promotionsstipendium des Köln Fortune-Programms