

Inhibitoren der Eicosanoidbiosynthese:
Darstellung neuer Amidrazonderivate und
Entwicklung einer Testmethode auf Basis humanen Vollblutes

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Guntram Drutkowski

geb. am 14. Januar 1974 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Nuhn
2. Prof. Dr. K. Görlitzer
3. Prof. Dr. M. Gütschow

Halle (Saale), 12. September 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	IV
Verzeichnis der Abbildungen, Schemata und Tabellen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Pathophysiologische und physiologische Bedeutung der Eicosanoide	2
1.2 Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels	4
1.3 Zielstellung der Arbeit	7
2 Synthese von Hydrazonderivaten	8
2.1 Einleitung	8
2.2 Arbeitsergebnisse	10
2.2.1 Synthesen	10
2.2.1.1 Ausgangsstoffe	10
2.2.1.2 Carbonsäurearylhyaazonoylchloride	11
2.2.1.3 Amidrazone	14
2.2.1.4 Cyclisierungsreaktionen	16
2.2.1.4.1 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole	17
2.2.1.4.2 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole	19
2.2.1.4.3 Naphthotriazepine	20
2.2.1.4.4 1,6-Dihydro-1,2,4-triazin	21
2.2.2 Reaktionsschema für die Cyclisierungsreaktionen	22
2.2.3 Analytische Daten – Strukturabsicherung	24
2.2.3.1 Carbonsäurearylhyaazonoylchloride	24
2.2.3.2 Amidrazone	25
2.2.3.3 Heterocyclische Verbindungen	26
2.2.3.3.1 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole	27
2.2.3.3.2 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole	28
2.2.3.3.3 Naphthotriazepine	28
2.2.3.4 Strukturabsicherung	29
2.3 Zusammenfassung: Synthesen	32
2.4 Experimenteller Teil – Synthesen	33
2.4.1 Allgemeine Angaben	33
2.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	34
2.4.3 Synthetisierte Verbindungen	36
2.4.3.1 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindungen	36
2.4.3.2 Carbonsäurearylhyaazonoylchloride	36

2.4.3.3	Amidrazone	39
2.4.3.4	Heterocyclische Verbindungen	43
2.4.3.4.1	4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole	43
2.4.3.4.2	1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole	47
2.4.3.4.3	Naphthotriazepine	47
2.4.3.4.4	1,6-Dihydro-1,2,4-triazin	48
3	Entwicklung eines Vollbluttestsystems	49
3.1	Einleitung	49
3.2	Geräte, Materialien und Methoden	52
3.2.1	Geräte	52
3.2.2	Chemikalien, Reagenzien und Referenzsubstanzen	53
3.2.3	Methoden	54
3.2.3.1	Blutauarbeitung	54
3.2.3.1.1	Zur Testung zu verwendende Lösungen	54
3.2.3.1.2	Bearbeitung des humanen Vollblutes	54
3.2.3.2	Extraktion der Eicosanoide	55
3.2.3.2.1	Festphasenextraktion	55
3.2.3.2.2	Flüssig-flüssig-Extraktion	55
3.2.3.3	HPLC-Analytik	56
3.2.3.3.1	HPLC-Analytik – UV-Detektion	56
3.2.3.3.2	HPLC-Analytik – Fluoreszenz-Detektion	57
3.2.4	Rechnerische und statistische Auswertung	58
3.3	Entwicklung des Testsystems	59
3.3.1	Beeinflussung der Eicosanoidbildung	59
3.3.1.1	Einfluß des Lösungsmittels für Testsubstanzen und Reagenzien auf die Metabolitenbildung	61
3.3.1.2	Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Calcium-Ionophor A23187-Konzentration	62
3.3.1.3	Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Calcium- und Magnesium-Ionen-Konzentration	64
3.3.1.4	Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Arachidonsäure-Konzentration	65
3.3.1.5	Abhängigkeit der Metabolitenbildung von den Inkubationszeiten	66
3.3.1.6	Interindividuelle Unterschiede in der Hemmbarkeit der Metabolitenbildung	68
3.3.2	Abstoppen der Enzymreaktionen	69
3.3.3	Extraktion der Eicosanoide	70
3.3.3.1	Festphasenextraktion	70
3.3.3.1.1	Konditionierung der RP-18-Säulen	71
3.3.3.1.2	Vorbereiten der Blutproben durch Ansäuern	71
3.3.3.1.3	Spülen der RP-18-Säulen zum Entfernen polarer Blutbestandteile	72
3.3.3.1.4	Eluation der Eicosanoide	72
3.3.3.2	Flüssig-flüssig-Extraktion	74
3.3.3.3	Vergleich der beiden Extraktionsmethoden	75

3.3.4	Abdampfen des Lösungsmittels vor der HPLC-Analytik	76
3.3.5	HPLC-Analytik	76
3.3.5.1	Interner Standard	77
3.3.5.2	UV-Detektion	77
3.3.5.3	Fluoreszenzdetektion	79
3.3.5.3.1	Optimierung des Derivatisierungsvorgangs	80
3.3.5.3.2	Optimierung des Laufmittels	82
3.3.6	Validierung des Testsystems für die UV-Detektion	86
3.3.6.1	Validierung mit dem internen Standard PGB ₁	87
3.3.6.1.1	Stabilität der Lösungen	87
3.3.6.1.2	Stabilität des PGB ₁ beim Abdampfen	88
3.3.6.1.3	Kalibriergerade für PGB ₁ in Methanol	89
3.3.6.2	Kalibrierung für LTB ₄ , 12-HHT und 5-HETE	92
3.3.6.3	Präzision der Meßmethode	93
3.4	Ergebnisse der Vollbluttestung	96
3.4.1	Bekannte Inhibitoren	96
3.4.2	Potentielle neue Inhibitoren	99
3.4.2.1	Standardkonzentration 10 µM	99
3.4.2.2	IC ₅₀ -Bestimmung für ausgewählte Substanzen	102
3.4.2.3	Beeinflussung der einzelnen Metaboliten durch eine Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (Dosis-Wirkungs-Diagramme)	103
3.4.2.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	106
3.4.2.5	Vergleich der Testwerte im Vollblut mit den Testwerten an der Sojabohnen Lipxygenase-1	107
3.5	Zusammenfassung: Vollbluttestung	110
4	Zusammenfassung	112
5	Literaturverzeichnis	114
Anhang		
I	NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen	X
II	Strukturformeln und Testergebnisse der Inhibitoren	XX
II.1	Referenzinhibitoren	XX
II.2	Offenkettige Verbindungen	XXI
II.3	Cyclische Verbindungen	XXVII
II.4	Hydroxamsäurederivate	XXXII
III	Testergebnisse an der L-1 der Sojabohne	XXXVI
IV	Strukturformeln der AA-Metaboliten	XXXVII

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

δ	chemische Verschiebung im NMR-Spektrum
ν	Wellenzahl
A23187	Calcium-Ionophor A23187 (Calcimycin)
AA	Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure)
AcN	Acetonitril
Ar	aromatisch
ASS	Acetylsalicylsäure
APT	attached proton test
AV	Arbeitsvorschrift
ber.	berechnet
BrMMC	4-Brommethyl-7-methoxycumarin
COX	Cyclooxygenase
DAD	Diodenarraydetektor (Diode-array-detector)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid (deutert)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäure
EtOH	Ethanol
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
Fp	Schmelzbereich
GC	Gaschromatographie
gef.	Gefunden
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
12-HHT	12-Hydroxy-5,8,10-heptadecatriensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50%ige Enzymhemmung auftritt
ICH	International Conference on Harmonisation
IR	infraroter Spektralbereich
Kronenether	18-Krone-6
L-1	Lipoxygenase-1 der Sojabohne
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LM	Lösungsmittel
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
m	Multipllett
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrum

MW	Mittelwert
n	Anzahl der Parallelbestimmungen in Testreihen
NDGA	Nordihydroguajaretsäure
NMR	kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (nuclear Overhauser-effect)
NSAR	nichtsteroidales Antirheumatikum
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PG	Prostaglandin
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMNL	polymorphkernige Leukozyten (polymorphonuclear leukocytes)
q	Quartett
R	Korrelationskoeffizient
RIA	Radio-Immuno-Assay
RP-18	Umkehrphase C-18 (reversed-phase)
RSD	relative Standardabweichung
s	Singulett
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion (solid-phase-extraktion)
t	Triplett
TMS	Tetramethylsilan
Tx	Thromboxan
UV	ultravioletter Spektralbereich
ZNS	Zentralnervensystem

Verzeichnis der Abbildungen, Schemata und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1:	Einfluß des zugesetzten Lösungsmittels auf die Eicosanoidbildung	62
Abbildung 2:	Abhängigkeit der Eicosanoidbildung von der A23187-Konzentration und vom Kationenzusatz	63
Abbildung 3:	Abhängigkeit der Eicosanoidbildung vom AA-Zusatz	66
Abbildung 4:	Abhängigkeit der Eicosanoidbildung von der Stimulationsdauer	67
Abbildung 5:	Interindividuell unterschiedliche Hemmbarkeit der Eicosanoidbiosynthese	68
Abbildung 6:	Einfluß der zum Abstoppen der Reaktion benutzten Methanoldmenge auf die wiedergefundenen Eicosanoidmengen	69
Abbildung 7:	Einfluß des Ansäuerns auf die Wiederfindungsrate des PGB ₁ nach Festphasenextraktion	72
Abbildung 8:	Einfluß des Spülens und der Eluation auf die Wiederfindungsraten des PGB ₁ nach Festphasenextraktion	73
Abbildung 9:	Vergleich der Wiederfindungsraten des zugesetzten PGB ₁ bei der Festphasenextraktion mit neuen und mehrfach verwendeten Säulen	74
Abbildung 10:	Vergleich der Festphasenextraktion mit der flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat	75
Abbildung 11:	Beispielchromatogramme: HPLC-Analytik mit UV-Detektion	79
Abbildung 12:	Einflüsse auf die Fluoreszenzmarkierung	81
Abbildung 13:	Abhängigkeit der Fluoreszenzmarkierung von dem Reagenz-Reaktant-Verhältnis und der Reaktionsdauer	82
Abbildung 14:	Einfluß des HPLC-Laufmittels auf das Fluoreszenzsignal	83
Abbildung 15:	Beispielchromatogramm: fluoreszenzmarkierte Referenzmetaboliten	84
Abbildung 16:	Kalibriergeraden für PGB ₁ , PGD ₂ und PGE ₂ nach Fluoreszenzmarkierung	85
Abbildung 17:	Stabilität von PGB ₁ -Lösungen über einen Zeitraum von vier Wochen	88
Abbildung 18:	Einfluß des Abdampfprozesses auf die Wiederfindungsraten des PGB ₁	89
Abbildung 19:	Kalibriergerade, Empfindlichkeit, relative Abweichung und Residuen für die Konzentrationsreihen des PGB ₁	91
Abbildung 20:	Kalibriergeraden und Empfindlichkeiten für Konzentrationsreihen der Referenzeicosanoide LTB ₄ , 5-HETE und 12-HHT	93
Abbildung 21:	Interindividuelle Unterschiede in der detektierbaren Eicosanoidmenge im Blut von acht Probanden	94
Abbildung 22:	IC ₅₀ -Kurven der Standardinhibitoren	97
Abbildung 23:	Dosis-Wirkungs-Diagramme der Standardinhibitoren	98
Abbildung 24:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindung T10	104
Abbildung 25:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindungen T3, T4, T17, T22, T31	105
Abbildung 26:	Dosis-Wirkungs-Kurven des Amidrazons T5	106

Abbildung 27: $-\lg(\text{IC}_{50})$ ausgewählter Verbindungen an der 5-LOX im humanen Vollblut, der 5-LOX in humanen PMNL und der L-1 der Sojabohne	109
Abbildung 28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 9f in DMSO-d_6	X
Abbildung 29: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 9f in DMSO-d_6	X
Abbildung 30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 9s in DMSO-d_6	XI
Abbildung 31: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 9s in DMSO-d_6	XI
Abbildung 32: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13a in DMSO-d_6	XII
Abbildung 33: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13a in DMSO-d_6	XII
Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6	XIII
Abbildung 35: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6	XIII
Abbildung 36: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6 versetzt mit CF_3COOD (1. Tag)	XIV
Abbildung 37: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD (1. Tag)	XIV
Abbildung 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD nach elf Tagen	XV
Abbildung 39: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 13d in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD nach elf Tagen	XV
Abbildung 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 14c in DMSO-d_6	XVI
Abbildung 41: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 14c in DMSO-d_6	XVI
Abbildung 42: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 15a in DMSO-d_6	XVII
Abbildung 43: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 15a in DMSO-d_6 , APT-Technik	XVII
Abbildung 44: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 16 in Benzen-d_6	XVIII
Abbildung 45: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 16 in Benzen-d_6	XVIII
Abbildung 46: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 16 in Benzen-d_6 , APT-Technik	XIX

Schemata

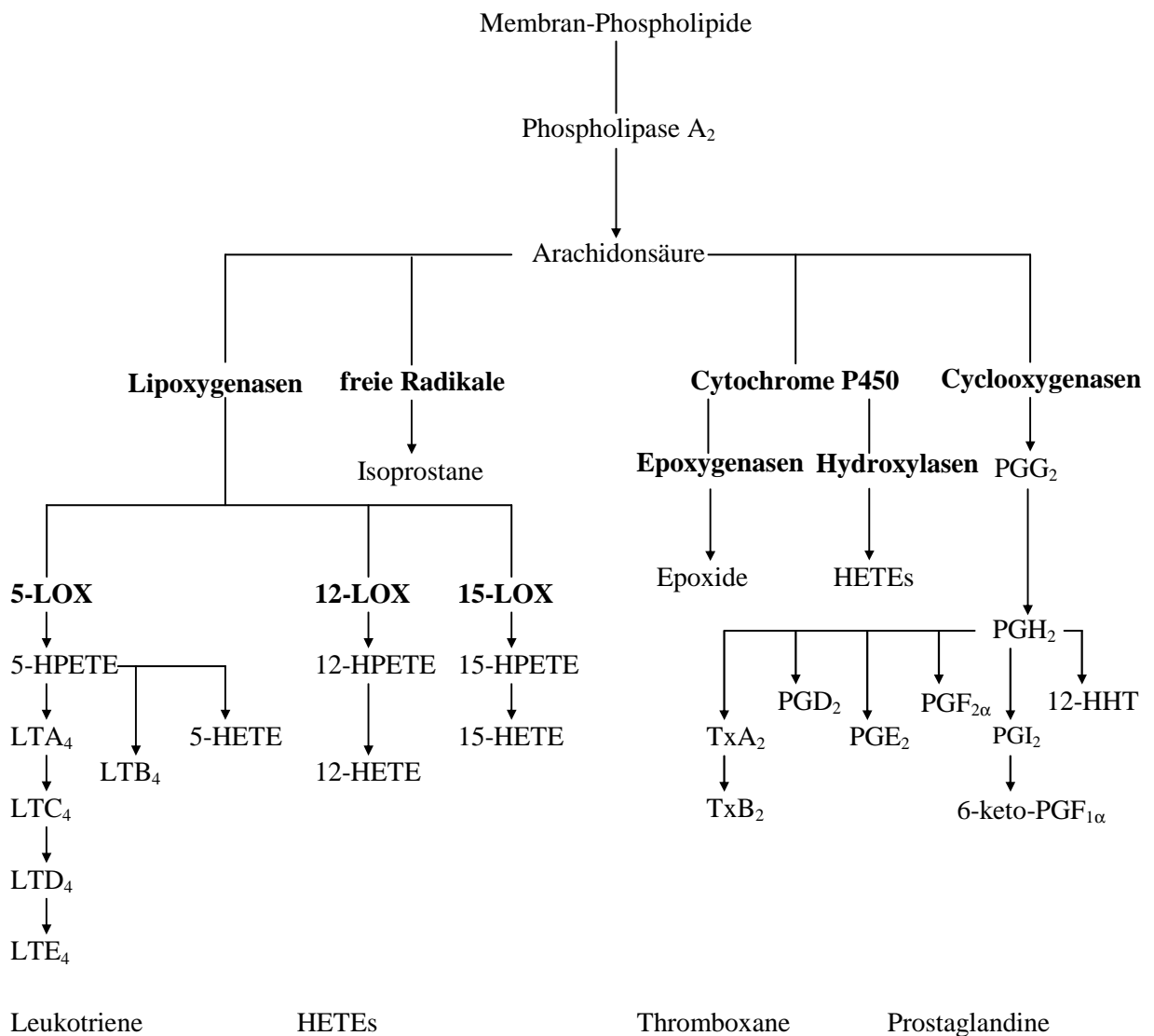
Schema 1:	schematische Darstellung wichtiger AA-Stoffwechselwege	1
Schema 2:	schematische Darstellung der Angriffspunkte für eine Beeinflussung des AA-Stoffwechsels	4
Schema 3:	Variationsmöglichkeiten in der Struktur bei Synthese von Amidrazonen und 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazolen	8
Schema 4:	Zielstrukturen I und II	9
Schema 5:	Syntheseweg zur Darstellung der Amidrazonderivate	10
Schema 6:	Darstellung der <i>N</i> -Aryl-2-chlor-3-oxobutanamide 3a-e als 2-Chlor-1,3-dicarbonyle 3	11
Schema 7:	Darstellung der α -Carbonyl-Carbonsäurearylhyaazonoylchloride 4 (Japp-Klingemann-Reaktion)	11
Schema 8:	Darstellung der 2-Oxadipinsäure-1-arylhyaazonoylchloride 4o,p durch Japp-Klingemann-Reaktion aus 2-Chlorcyclohexan-1,3-dion in MeOH	12
Schema 9:	Darstellung des Oxalsäure-2-anilid-1-(<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -phenyl-hyaazonoyl)chlorides (8)	13
Schema 10:	Darstellung der Amidrazone 9 und 10	14
Schema 11:	Oxalsäure-2-anilid- <i>N</i> ² -methyl- <i>N</i> ¹ -pentamethylen- <i>N</i> ² -phenylamidrazon (11)	15
Schema 12:	Darstellung des Oxalsäure-2-(2-chloranilid)- <i>N</i> ² -hydroxymethyl- <i>N</i> ¹ -pentamethylen- <i>N</i> ² -phenylamidrazons (12)	16
Schema 13:	Darstellung der 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole 13	17
Schema 14:	Darstellung der 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole 14	19
Schema 15:	Darstellung der Naphthotriazepine 15	20
Schema 16:	Darstellung des Ethyl-1-(4-chlorphenyl)-5-methyl-6-methylen-1,6-dihydro-1,2,4-triazin-3-carboxylats (16)	21
Schema 17:	Übersicht über die Cyclisierungsreaktionen von Amidrazonen mit Carbonylverbindungen	23
Schema 18:	Signale im ¹³ C-NMR-Spektrum der heterocyclischen 13A und offenkettigen 13B Isomeren	29
Schema 19:	tautomere Formen 13A und 13C der 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole	30
Schema 20:	Cyclisierungsreaktion der Amidrazone 9j,p zu den Naphthotriazepinen 15a,b	31
Schema 21:	Strukturformel des Calcium-Ionophors A23187 (Calcimycin)	60
Schema 22:	4-Brommethyl-7-methoxycumarin (BrMMC)	80
Schema 23:	Reaktionsschema der Fluoreszenzmarkierung von Carbonsäuren mit BrMMC	80
Schema 24:	Strukturformeln der Verbindungen, von denen IC ₅₀ -Werte ermittelt wurden	102
Schema 25:	Licofelone	103
Schema 26:	Strukturformel des Amidrazons T5	106

Tabellen

Tabelle 1:	Substitutionsmuster der <i>N</i> -Aryl-2-chlor-3-oxobutanamide 3a-e	11
Tabelle 2:	Substitutionsmuster der α -Carbonyl-Carbonsäurearylhyaazonoylchloride 4	12
Tabelle 3:	Substitutionsmuster der Amidrazone 9, 10	15
Tabelle 4:	Substitutionsmuster der 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole 13	18
Tabelle 5:	Substitutionsmuster der 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole 14	19
Tabelle 6:	Substitutionsmuster der Naphthotriazepine 15	21
Tabelle 7:	spektroskopische Daten der Carbonsäurearylhyaazonoylchloride 4	25
Tabelle 8:	spektroskopische Daten der Amidrazone 9, 10	26
Tabelle 9:	spektroskopische Daten der 4,5-Dihydro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazole 13	27
Tabelle 10:	spektroskopische Daten der 1 <i>H</i> -1,2,4-Triazole 14	28
Tabelle 11:	spektroskopische Daten der Naphthotriazepine 15	28
Tabelle 12:	Kalibrierparameter für den internen Standard PGB ₁	90
Tabelle 13:	Kalibrierparameter der Referenzeicosanoide LTB ₄ , 12-HHT und 5-HETE	92
Tabelle 14:	IC ₅₀ der Standardinhibitoren NDGA, Zileuton, Indometacin, ASS	96
Tabelle 15:	Testergebnisse der offenkettigen Verbindungen im Vollblut	100
Tabelle 16:	Testergebnisse der cyclischen Verbindungen im Vollblut	101
Tabelle 17:	IC ₅₀ ausgewählter Verbindungen	103
Tabelle 18:	IC ₅₀ ausgewählter Verbindungen gegenüber den Enzymen im humanem Vollblut, der 5-LOX in humanen PMNL und der L-1 der Sojabohne	108
Tabelle 19:	Strukturformeln der Referenzinhibitoren	XX
Tabelle 20:	Strukturformeln und Testergebnisse der offenkettigen Verbindungen	XXI
Tabelle 21:	Strukturformeln und Testergebnisse der cyclischen Verbindungen	XXVII
Tabelle 22:	Strukturformeln und Testergebnisse der Hydroxamsäurederivate	XXXII
Tabelle 23:	IC ₅₀ an der L-1 der Sojabohne	XXXVI
Tabelle 24:	Strukturformeln der AA-Metaboliten	XXXVII

1 Einleitung

Arachidonsäure (AA, 5,8,11,14-Eicosatetraensäure), ein Hauptbestandteil der zellulären Lipide, ist die Vorstufe einer großen Anzahl extrem potenter biologischer Mediatoren. Dazu gehören z.B. Prostaglandine (PGs), Thromboxane (Txs), Leukotriene (LTs) und Lipoxine. Diese werden vorwiegend von den Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) gebildet. [Dannhardt 1993, Samuelsson 1991] Zusätzlich zu den COX- und LOX-Stoffwechselwegen findet eine Metabolisierung der Arachidonsäure in vielen Geweben über Cytochrom P-450-abhängige Enzyme statt. Hierbei entstehen durch Hydroxylaseaktivität Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) [Brash 1995, McGiff 1991, Nithipatikom 2001] und durch Epoxygenaseaktivität die Epoxyeicosatriensäuren (EETs). [Chen 2001] Desweiteren sind freie Radikale in der Lage, die Arachidonsäure zu metabolisieren, wobei die Isoprostane entstehen. [Murphy 2001] (vgl. Schema 1)



Schema 1: schematische Darstellung wichtiger AA-Stoffwechselwege. Strukturformeln der Eicosanoide im Anhang Tabelle 24

Von den Metaboliten der Arachidonsäure, auch Eicosanoide genannt, wird eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen vermittelt. [Ford-Hutchinson 1985, Mayatepek 1995] Auf die Bedeutung der Eicosanoide soll nachfolgend näher eingegangen werden.

1.1 Pathophysiologische und physiologische Bedeutung der Eicosanoide

Eine aktuelle Übersicht über Bedeutung, Biosynthese, Wirkmechanismus und Beeinflussung von Prostaglandinen und Leukotrienen gibt Funk [2001].

Nach wie vor ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Eicosanoide nicht bis in alle Einzelheiten geklärt. Die sehr kurzlebigen Metaboliten sind im Unterschied zu den systemisch agierenden Hormonen in parakriner oder autokriner Art wirksam. [Katori 2000, Narumiya 1994] Eine Vielzahl von Erkrankungen wird mit der Wirkung von AA-Metaboliten in Verbindung gebracht. Aber auch eine Reihe von physiologischen Funktionen ist von der Gegenwart der Eicosanoide abhängig.

Das Enzym 5-LOX wird vorwiegend in Neutrophilen, Mastzellen, Basophilen und Macrophagen exprimiert. Eine Besonderheit dieses Enzyms ist seine Wechselwirkung mit einem speziellen Kopplungsprotein an der Kernmembran, dem 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP), als Voraussetzung für die Enzymaktivität. [Ford-Hutchinson 1991 (2)] Produkte der 5-LOX, die Leukotriene [Denzlinger 1996, Silverman 1999], stellen wichtige Mediatoren akuter entzündlicher Erkrankungen und anaphylaktischer Reaktionen dar. [Lewis 1990, Mayatepek 1995] Als Krankheitsbilder sind hier u.a. rheumatoide Arthritis, Gicht, Psoriasis und Colitis ulcerosa zu nennen. [Müller 1995, Steinhilber 1999] Die Peptido-Leukotriene C₄, D₄, E₄ – zusammengefaßt als slow reacting substance of anaphylaxis bezeichnet – sind extrem potente Spasmogene an der glatten Muskulatur. Darauf beruht ihre Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. [Crowther 2001, Kroegel 1996, Steinhilber 1999]

Die 12-LOX wird hauptsächlich in Thrombozyten, Leukozyten und Hautzellen exprimiert. [Nie 2000, Ruzicka 1984] Produkte der 12-LOX sind in die Entstehung der Psoriasis [Mitchell 1999, Müller 1994], neuronaler Degeneration und diabetischer Nephropathie [Li 1997, Müller 1994] involviert. Außerdem ist eine Beteiligung an der Tumorentwicklung, insbesondere an der Angiogenese im Tumorgewebe [Krieg 1995, Nie 2002] und an der Metastasierung nachgewiesen worden. [Honn 1994, Maccarrone 1997]

Die 15-LOX wird in Retikulozyten, Eosinophilen, Macrophagen sowie in Hautzellen exprimiert. Im Gegensatz zur 5-LOX, die nur freie Arachidonsäure verstoffwechseln kann, ist die 15-LOX der Säugetiere in der Lage, auch andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie veresterte mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu metabolisieren. [Brash 1997, Kühn 1990] Für die Produkte dieses Enzyms wird eine Wirkung auf die Entwicklung und Differenzierung von Zellen diskutiert. [Brinckmann 1998] Sie werden mit Atherosklerose [Ford-Hutchinson 1991 (1), Kühn 1999], der endothelialen Zellproliferation [Bray 1986], Ausreifung von Blutzellen [van Leyen 1998] sowie entzündlichen und immunologischen Reaktionen [Davis 1988, Prigge 1997, Vanderhoeck 1988] in Verbindung gebracht. Die von der 15-LOX gebildeten Metaboliten können die Wirkung der

Leukotriene antagonisieren [Sheran 1997, Vanderhoeck 1980] bzw. verstärken. [Fogh 1988]

Für die Produkte der Lipoxygenasen, besonders die HETEs, ist eine Beteiligung am Wachstum von Krebszellen [Ghosh 1997, Nie 2001] sowie an der Apoptoseauslösung bzw. -hemmung [Avis 2001, Goetzl 1995, Maccarrone 1997, Wong 2002] in der Literatur belegt. Außer von den Lipoxygenasen werden die HETEs auch durch Singulett-Sauerstoff, Autoxidation oder Cytochrom-P-450-abhängige Enzyme gebildet. [Capdevila 1982]

Die Cyclooxygenasen existieren in drei Isoformen. Ihre Produkte, die Prostaglandine, entfalten ihre pathophysiologische Bedeutung unter anderem in der Entwicklung von Entzündungen, Schmerzen und Fieber. [Vane 1998]

Die COX-1 wird in den meisten Zellen des menschlichen Organismus konstitutiv exprimiert. [Seibert 1997] Sie spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von physiologischen Funktionen. Welche Eicosanoide in den Zellen gebildet werden, ist jedoch von Organ zu Organ sehr verschieden. [Jakobsson 1999] Im Gastrointestinal-Trakt und im Uterus wirken die Prostaglandine muskelkontrahierend, im Magen wirken sie zytoprotektiv. In den Nieren erhöhen die Prostaglandine den renalen Blutfluß und erhalten die Homöostase der Nierenfunktion. Im ZNS erfüllt die COX-1 ebenfalls physiologische Funktionen. [Griswold 1996, Vane 1998] Für die Blutgerinnung ist die COX-1 der Blutplättchen, die hier das Thromboxan bildet, essentiell.

Die COX-2, die vor reichlich zehn Jahren entdeckt wurde, ist dagegen nur in bestimmten Organen, z.B. der Niere, dem Gehirn und dem Rückenmark, konstitutiv exprimiert. Die Tatsache, daß COX-2-knock-out-Mäuse schwere Nephropathien entwickeln und nicht lebensfähig sind, ist Ausdruck für die physiologische Bedeutung dieses Enzyms. [Dinchuk 1995, Mitchell 1999, Morteau 2000] Die COX-2 ist in die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems und in die glomeruläre Hämodynamik involviert. [Hinz 1999] Weiterhin wird die COX-2 im Uterusepithel exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der Nidation der befruchteten Eizelle und bei der Angiogenese für den Aufbau der Plazenta. [Chakraborty 1996]

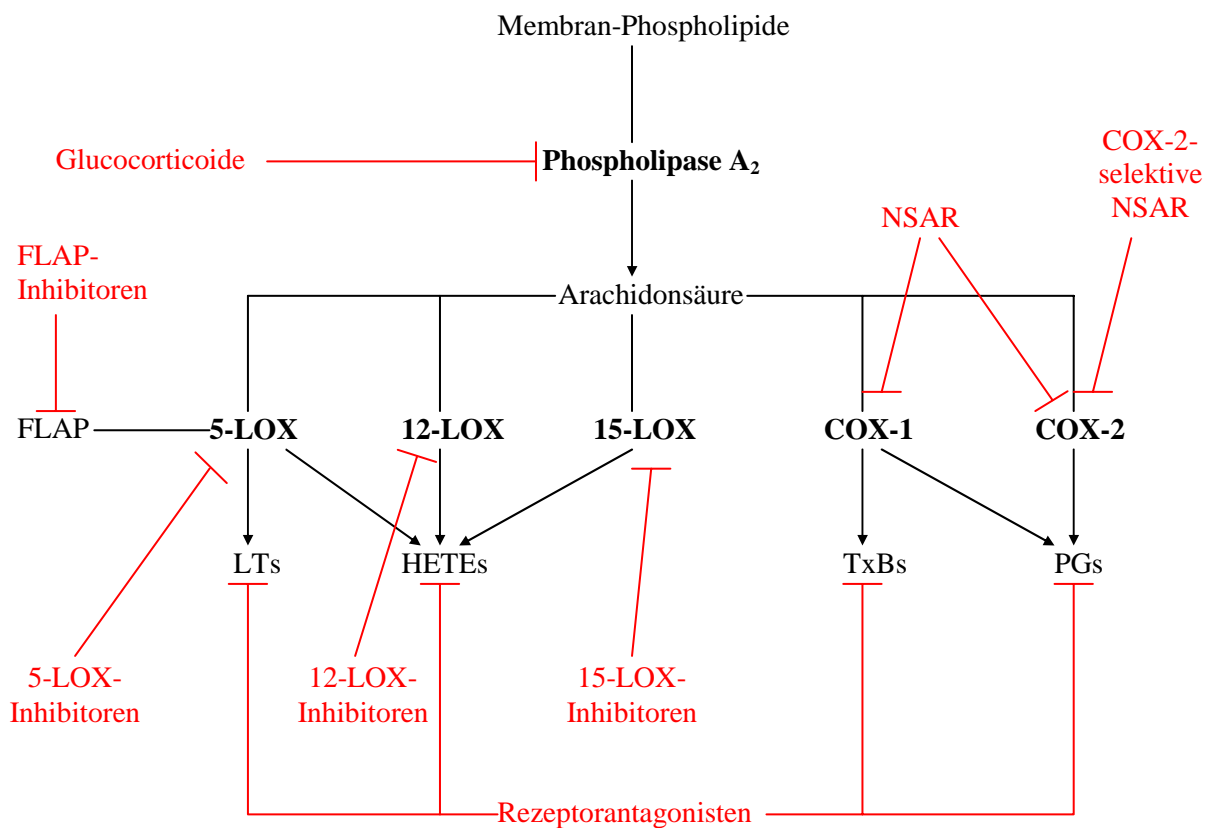
Die pathophysiologische und physiologische Bedeutung der Produkte der COX-2 erstreckt sich auf akute und proliferative Entzündungen, Arthritis, Angiogenese, Knochenabsorption, Ulcera, Kolonkrebs, Alzheimer-Krankheit, Nierenfunktion, das ZNS und die Reproduktion. [Katori 2000] Im Zuge entzündlicher Erkrankungen wird vom Organismus eine Induktion der COX-2 auch in anderen Geweben und Organen ausgelöst. Induktoren der COX-2 sind z.B. Onkogene, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mitogene. [Dempke 2001, Herschman 1996] Eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch die Prostaglandine führt zur Bildung von Ödemen. Die Prostaglandine steigern die Empfindlichkeit von Nozizeptoren auf Stimuli im traumatisierten Gewebe und führen damit zur Schmerzentscheidung. [Schaible 1993]

Die Existenz einer dritten Isoform, der COX-3, wurde schon länger vermutet [Willoughby 2000] und kürzlich nachgewiesen. Sie ist vorwiegend im ZNS lokalisiert. [Chandrasekharan 2002]

1.2 Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels

Die herausragende Bedeutung der Arachidonsäuremetaboliten im pathophysiologischen Geschehen zahlreicher Erkrankungen hat schon vor Jahren dazu geführt, daß sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von Inhibitoren der Stoffwechselwege der AA beschäftigen. Der Arachidonsäuremetabolismus bietet eine Vielzahl von Angriffspunkten, um die pathophysiologische Wirkung der Eicosanoide zu unterbinden (vgl. Schema 2).

Durch Inhibition der Phospholipase A₂ (PLA₂) läßt sich der gesamte AA-Stoffwechsel blockieren. Neben den Glucocorticoiden, die eine indirekte Hemmung der PLA₂ bewirken [Le 1975, Lewis 1979], sind weitere bislang nicht therapeutisch angewandte PLA₂-Hemmer beschrieben worden. [Tibes 1995]



Schema 2: schematische Darstellung der Angriffspunkte für eine Beeinflussung des AA-Stoffwechsels

Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), Inhibitoren der Cyclooxygenasen, wurden schon viele Jahre therapeutisch eingesetzt, bevor ihr Wirkmechanismus erkannt wurde. [Vane 1998, Vane 1971] Die älteren Vertreter dieser Wirkstoffklasse weisen meist keine Spezifität gegenüber einer der Isoformen der COX auf oder sind überwiegend Hemmer der COX-1. Die Entdeckung der COX-2 und ihrer Bedeutung hatte zur Folge, daß die Einführung von COX-2-selektiven Inhibitoren angestrebt wurde, von denen sich die ersten Vertreter, Rofecoxib, Celecoxib und Parecoxib, seit einigen Jahren unter den in der Therapie angewandten Arzneistoffen befinden. [Hinze 2002, Katori

2000, Marnett 1999]

Im Gegensatz zu den Cyclooxygenasen ist die Entwicklung auf Seite der Lipoxygenasen weniger weit fortgeschritten.

Seit einigen Jahren werden die ersten Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, Montelukast, Zafirlukast und Pranlukast, in der Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt. [Engels 1998, Schulz 1998]

Durch Hemmung des FLAP ist eine Blockade des Stoffwechsels der 5-LOX möglich. Ausgehend von dem NSAR Naproxen führten geringfügige strukturelle Abwandlungen zu FLAP-Inhibitoren, die jedoch bisher keine therapeutische Relevanz besitzen. [Ford-Hutchinson 1991 (2), Hatzelmann 1994]

Strukturvorschläge für LOX-Inhibitoren sind in der Literatur in großer Zahl zu finden. Therapeutisch angewandt wird bisher nur ein Vertreter dieser Wirkstoffgruppe – das Zileuton. [Bodem 1997]

Die beschriebenen LOX-Inhibitoren lassen sich nach ihrem Wirkmechanismus in vier Gruppen einteilen:

- Radikalfänger/ Redoxinhibitoren: Aufgrund des radikalischen Charakters der Lipoxygenasereaktion bzw. wegen des geringen Redoxpotentials der LOX ist eine Hemmung der Enzyme auf diesem Wege möglich. [Musser 1992] Vertreter dieser Gruppe von Inhibitoren sind Nordihydroguajaretsäure (NDGA) [Gronert 1995], Kaffeesäure, Hydroxylamine [Strasser 1988], Aniline [Suzuki 1997], Phenole [Kohyama 1997, Lau 1989] und Aminophenole. [Buckle 1988]
- Eisen-Komplexbildner: Das katalytische Zentrum der Lipoxygenasen enthält ein Eisenatom. Daher ist die Entwicklung von Eisen-Chelatoren ein Ansatzpunkt zur Auffindung neuer Wirkstoffe. Zu den Vertretern der Eisen-Komplexbildner gehören Hydroxylharnstoffderivate (z.B. Zileuton) [Carter 1991, Summers 1990], Hydroxamsäurederivate [Connolly 1999, Summers 1987 (2)] und Hydroxypyridone. [Abeyasinghe 1996] Speziell bei den Hydroxamsäurederivaten wurde die Hemmwirkung neben der Komplexbildung auch auf eine Reduktion des zentralen Eisens zurückgeführt. [Musser 1992]
- Substrat-Analoga: Zu dieser Gruppe gehören z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer oder mehreren Dreifachbindungen anstelle einer Doppelbindung, Ölsäure, Eruca-säure sowie länger-kettige Alkohole und Aldehyde. [Nieuwenhuizen 1997] Auch die Hydrazone bzw. Amidrazone werden von einigen Autoren in diese Wirkstoffgruppe eingeordnet. [Galey 1988] Als Referenzsubstanz ist das BW755c bekannt. [Provost 1996]
- Sonstige Inhibitoren: LOX-Inhibitoren, über deren Wirkmechanismus bisher wenig bekannt ist, sind unter anderem Knoblauchöl [Wagner 1987] und Boswelliasäure. [Ammon 1991, Safayhi 1995, Safayhi 1992]

Hudson beschrieb im Jahre 1993, daß die Blockade des COX-Stoffwechselweges durch NSAR zu einer Induktion des LOX-Stoffwechsels führen kann. [Hudson 1993] Dies wird als ein Grund für das Auftreten von Nebenwirkungen unter der Therapie mit NSAR angesehen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das aspirininduzierte Asthma. [Babu 2000] Um dies zu verhindern bzw. dem vorzubeugen scheint die Entwicklung von sogenannten Dualhemmern, also Substanzen mit inhibitorischer Wirkung sowohl auf den COX- als auch auf den LOX-Stoffwechselweg, ein

geeigneter Ansatzpunkt zu sein. [de Leval 2002, Kirchner 1997, Laufer 1995, Provost 1996]

In der klinischen Phase III befindet sich ein solcher Dualhemmer, der seine Wirkung auf die 5-LOX und COX entfaltet, das Licofelone. [Boileau 2002] Für Hypericin, einen Inhaltsstoff des Johanniskrauts, wurden unlängst ebenfalls inhibitorische Effekte sowohl auf die COX-1 als auch auf die 5-LOX beschrieben. [Panossian 1996]

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand aus zwei Teilen, die sich auch im formellen Aufbau der Arbeit widerspiegeln:

1. Im Syntheseteil (Kapitel 2) sollten neue potentielle Inhibitoren der Enzyme der Arachidonsäurekaskade mit einer Hydrazonestruktur als Grundbaustein synthetisiert werden. Zielstrukturen waren Amidrazone und sich daraus ableitende Heterocyclen. Die Synthesekonzeption war an bisherige am Institut angefertigte Arbeiten anzuschließen. Die neu dargestellten Substanzen sollten analytisch charakterisiert und in ihrer Struktur abgesichert werden.
2. Im zweiten Teil der Arbeit, dem analytischen Teil (Kapitel 3), stand das Ziel, ein entsprechendes Testsystem zu entwickeln, mit dem die inhibitorische Wirkung der Substanzen gleichzeitig auf den LOX- und COX-Stoffwechselweg bestimmt werden kann. Das neue Testsystem sollte als Enzymquelle humanes Vollblut verwenden. Es sollte einfach zu handhaben sein und einen hohen Probendurchsatz für die Anwendung als Routine-testmethode ermöglichen. Die Durchführung der Testung sollte mit der Standard-ausrüstung eines Analytiklabors möglich sein. Die experimentellen Bedingungen der zu entwickelnden Testmethode sollten systematisch optimiert werden. Das neue Testsystem war anhand bekannter Referenzsubstanzen zu evaluieren und auf seine Leistungsfähigkeit zu überprüfen.

Mit der Testmethode und mittels am Hause etablierter Screeningmodelle waren für einen Teil der neu synthetisierten und für schon früher dargestellte Verbindungen entsprechende Wirksamkeitsdaten zu ermitteln.

Wenn möglich, sollten für die getesteten Verbindungen Struktur-Wirkungsbeziehungen formuliert werden.

2 Synthese von Hydrazonderivaten

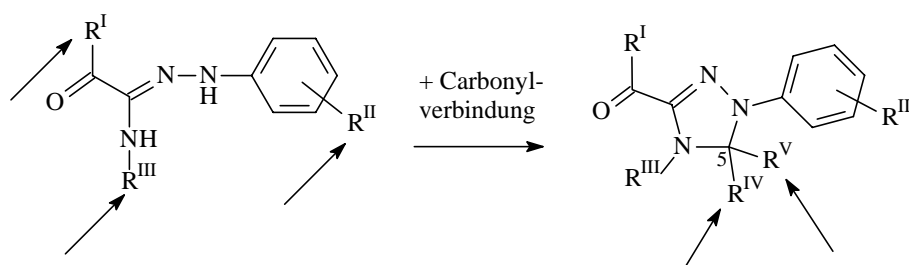
2.1 Einleitung

Die inhibitorische Aktivität von Hydrazonderivaten auf die Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels ist schon seit längerem bekannt. [Baumann 1982, Ghiglierbertez 1987] Seitdem sind eine Reihe von Verbindungen mit einem Hydrazongrundgerüst synthetisiert und hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die AA-Kaskade getestet worden. [Cuadro 1998, Galey 1988]

Dazu gehören auch die Amidrazone (Säureamidhydrazone), die als Inhibitoren von Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen beschrieben wurden. [Barja-Fidalgo 1999, Clemens 2001 (1), Nuhn 1993] In der chemischen Literatur ist diese Verbindungsklasse seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Die Amidrazone werden in einer Reihe technischer Prozesse, wie z.B. in der Farbindustrie, der Photographie, der Synthese von Polymeren und in der Schädlingsbekämpfung als Herbizide, Nematozide oder Rodentizide eingesetzt. Außerdem ist über die antimycobakterielle Wirkung einiger Amidrazonderivate berichtet worden. [Blanchard 1996, Easmon 1997, Neilson 1970, Ranft 2001]

Eine wichtige chemische Bedeutung der Amidrazone ist ihre Eignung als Ausgangsstoffe für Cyclisierungsreaktionen, die in der Literatur zahlreich beschrieben worden sind. [Zelenin 1989]

Am Institut für Pharmazeutische Chemie wird seit mehreren Jahren an der Synthese, Charakterisierung und Testung von Amidrazonen und deren cyclischen Derivaten gearbeitet. [Donner 2002, Froberg 1994, Pöppel 1994, Ranft 1999, Schulze 2001,] Als Zugang zu dieser Art von Verbindungen hat sich die Synthese aus den durch Japp-Klingemann-Reaktion erhaltenen Carbonsäurearylhyaazonoylchloriden etabliert. [Froberg 2002 (1)] Die Carbonsäurearylhyaazonoylchloride kommen aufgrund ihrer Toxizität für eine Anwendung als Enzyminhibitoren nicht in Frage. Auf dem genannten Weg kann das Substitutionsmuster der Amidrazonstruktur an drei Stellen beeinflusst werden (s. Schema 3): der Substituent R^I , je nach dem, welcher Ausgangsstoff für die Japp-Klingemann-Reaktion eingesetzt wird, der Substituent R^{II} des Hydrazon-Aromaten und der Substituent des Amidrazon-Stickstoffes R^{III} . Dabei bleiben die möglichen Strukturen auf α -carbonylsubstituierte Verbindungen beschränkt, die durch die Japp-Klingemann-Reaktion vorgegeben sind.



Schema 3: Variationsmöglichkeiten in der Struktur bei Synthese von Amidrazonen und 4,5-Dihydro-1H-1,2,4-triazolen

Die Cyclisierungen mit Carbonylverbindungen bieten einen weiteren Variationspunkt in der Struktur der dabei entstehenden Heterocyclen – die Substituenten R^{IV} und R^V in Position 5 des Ringes.

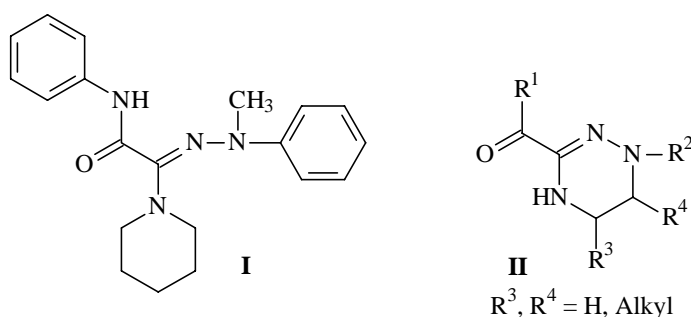
Durch die Auswahl der Carbonylkomponente kann die Art des erhaltenen Heterocyclus bestimmt werden. Die Amidrazone lassen sich zu aromatischen und nichtaromatischen Fünf-, Sechs- und Siebenringen umsetzen, was zusätzlich zu den in Schema 3 dargestellten 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazolen die Anzahl der zugänglichen Strukturen weiter erhöht.

Damit eröffnet sich die Möglichkeit, aus einer begrenzten Anzahl gut zugänglicher Ausgangsstoffe, zahlreiche Strukturabkömmlinge als potentielle Hemmstoffe der Lipoxygenasen bzw. Cyclooxygenasen zu erhalten.

In Untersuchungen an der Lipoxygenase-1 der Sojabohne (L-1) sowie an humanen polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) konnte die teilweise recht potente Hemmwirkung einiger Hydrazonderivate nachgewiesen werden. [Clemens 2001 (2), Kupfer 1996] Daher erscheint es sinnvoll, die Palette der verfügbaren Strukturen weiter zu vergrößern.

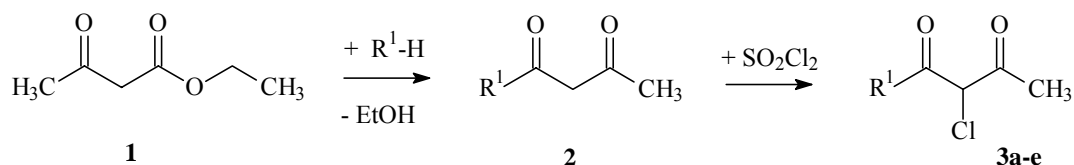
Ziel des Syntheseteils der vorliegenden Arbeit war es, in Fortführung der Diplomarbeit [Drutkowski 1999] weitere offenkettige und cyclische Derivate mit einer Hydrazonstruktur zu synthetisieren. Dabei sollten möglichst umfangreiche Abwandlungen der Struktur erreicht werden – nicht jedoch eine systematische „Abkochung“ von Derivatereihen. Durch die Strukturvielfalt ist eine große Variabilität der physikochemischen Eigenschaften zu erreichen, die Voraussetzung für eine spätere Verwendung der Daten in *in silico*-Modellen ist, um Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erkennen und zu formulieren.

Für Untersuchungen, den Wirkmechanismus der Hydrazonverbindungen betreffend – die Frage, ob das Hydrazon-*H*-Atom am N^2 für die Wirkung der Substanzen essentiell ist – sollte ein Amidrazone derivat mit Substitution am Stickstoff N^2 synthetisiert werden. Als Zielstruktur wurde eine am N^2 -Atom methylierte Verbindung vorgegeben (Schema 4, Struktur **I**).



Schema 4: Zielstrukturen **I** und **II**

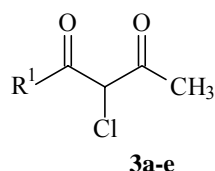
Die hervorragende Cyclisierbarkeit der Amidrazone mit Aceton und Formaldehyd zu Fünf- und Siebenringen war Ausgangspunkt für die Bestrebung, einen analogen Reaktionsweg zur Synthese von Sechsringen zu nutzen. Als Zielstruktur wurde ein 1,2,4-Triazin ohne bzw. mit einfacher Substitution in Ringposition 5 und 6 formuliert (Schema 4, Struktur **II**). In Analogie zur Reaktion der Amidrazone mit Aceton sollte das Triazin durch Umsetzung von N^1 -unsubstituierten Amidrazonen mit Dicarbonylverbindungen bzw. Dibromalkanen erhalten werden.



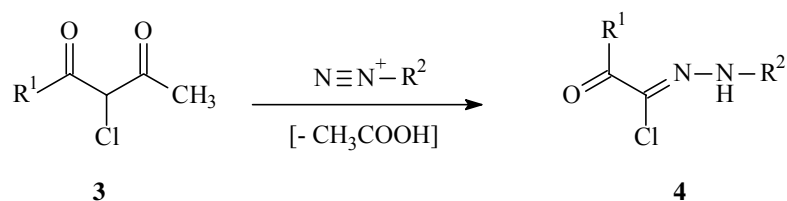
Schema 6: Darstellung der *N*-Aryl-2-chlor-3-oxobutanamide **3a-e** als 2-Chlor-1,3-dicarbonyl **3**

Tabelle 1: Substitutionsmuster der *N*-Aryl-2-chlor-3-oxobutanamide **3a-e**

	R¹
3a	C ₆ H ₅ -NH
3b	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH
3c	3-Cl-C ₆ H ₄ -NH
3d	4-Cl-C ₆ H ₄ -NH
3e	4-F-C ₆ H ₄ -NH



2.2.1.2 Carbonsäurearylhazonoylchloride

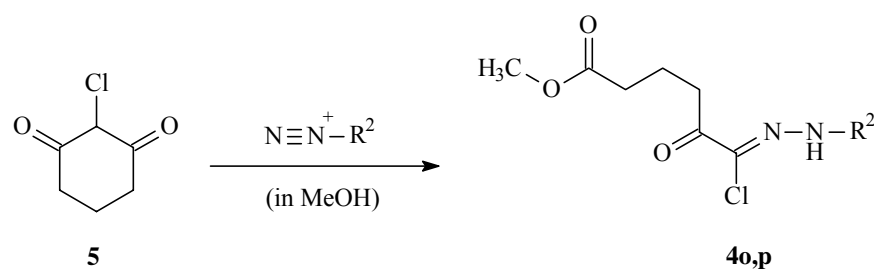


Schema 7: Darstellung der α -Carbonyl-Carbonsäurearylhazonoylchloride **4** (Japp-Klingemann-Reaktion)

Durch Japp-Klingemann-Reaktion [Shawali 1971, Shawali 1997, Stetter 1959] wurden aus den 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindungen **3** in Reaktion mit diazotierten Anilinen die α -Carbonyl-Carbonsäurearylhazonoylchloride **4** erhalten (s. Schema 7). Der Reaktionsmechanismus dieser Umsetzung ist ausführlich in der Literatur beschrieben. [Phillips 1959] Bei Durchführung der Reaktion sollte darauf geachtet werden, daß die Temperatur des Reaktionsansatzes 5 °C nicht übersteigt. [Huisgen 1967] Die Japp-Klingemann-Reaktion konnte nicht nur mit einfachen Anilinen durchgeführt werden, sondern auch mit komplexeren Strukturen. Die Reaktion führte z.B. mit dem Cumarinderivat 7-Amino-4-trifluormethyl-2*H*-chromen-2-on zum gewünschten Hydrazonoylchlorid. Allerdings wurde hierbei nur eine Ausbeute von 30 % erreicht. Die nur unvollständig ablaufende Diazotierung der Aminkomponente schien dabei der limitierende Faktor zu sein. Ein entsprechender Überschuß des Amins könnte die Reaktionsausbeute deutlich erhöhen. Besondere Bedeutung haben die Carbonsäurearylhazonoylchloride als Ausgangsstoffe für die Synthese von Heterocyclen über eine 1,3-dipolare Cycloaddition. Hierbei kommt zum Tragen, daß die Verbindungen Precursor für Nitrilimine sind, die als Dipol wirken. [Fliege 1984, Huisgen 1965] Wird als 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindung 2-Chlorcyclohexan-1,3-dion (**5**) eingesetzt, kommt es zur Ringöffnung und der Substituent R¹ ist als Butansäurerest vorgegeben. Die Auswahl des

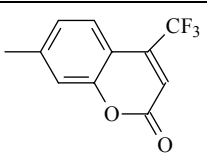
Lösungsmittels beeinflusst, ob die Pentansäure als freie Säure oder in veresterter Form vorliegt. Wird die Umsetzung in Alkoholen durchgeführt, entstehen die entsprechenden Ester – im Falle der Verbindungen **4o** und **4p** die Methylester (s. Schema 8). Die freie Säure wird erhalten, wenn die Reaktion in Wasser durchgeführt wird. [Frohberg 1997]

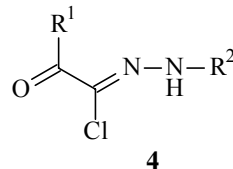
Die Carbonsäurearylhyaazonoylchloride **4** besitzen ein sehr gutes Kristallisationsvermögen und ließen sich als weiße bis schwach gelb gefärbte Kristalle isolieren. Die Substanzen waren nicht oxidationsempfindlich und bei der Lagerung über lange Zeit stabil. Untersuchungen zur Konfiguration und zum Vorliegen von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sind von Frohberg et al. vorgenommen worden. [2002 (1)]



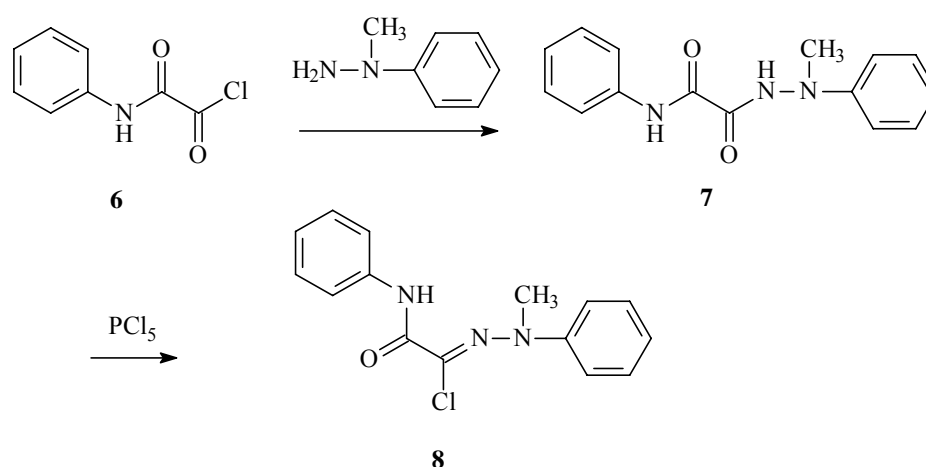
Schema 8: Darstellung der 2-Oxadipinsäure-1-arylhyaazonoylchloride **4o,p** durch Japp-Klingemann-Reaktion aus 2-Chlorcyclohexan-1,3-dion **5** in MeOH

Tabelle 2: Substitutionsmuster der α -Carbonyl-Carbonsäurearylhyaazonoylchloride **4**

	R¹	R²
4a	C ₆ H ₅ -NH	C ₆ H ₅
4b	C ₆ H ₅ -NH	2-F-C ₆ H ₄
4c	C ₆ H ₅ -NH	3-F ₃ C-C ₆ H ₄
4d	C ₆ H ₅ -NH	3-F-C ₆ H ₄
4e	C ₆ H ₅ -NH	
4f	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-Cl-C ₆ H ₄
4g	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-NC-C ₆ H ₄
4h	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	3-Cl-C ₆ H ₄
4i	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	4-HOOC-C ₆ H ₄
4j	3-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-Cl-C ₆ H ₄
4k	4-Cl-C ₆ H ₄ -NH	3-Cl-C ₆ H ₄
4l	4-F-C ₆ H ₄ -NH	3-CH ₃ OC-C ₆ H ₄
4m	C ₂ H ₅ -O	C ₆ H ₅
4n	CH ₃	4-Cl-C ₆ H ₄
4o	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	4-F-C ₆ H ₄
4p	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	3-O ₂ N-C ₆ H ₄



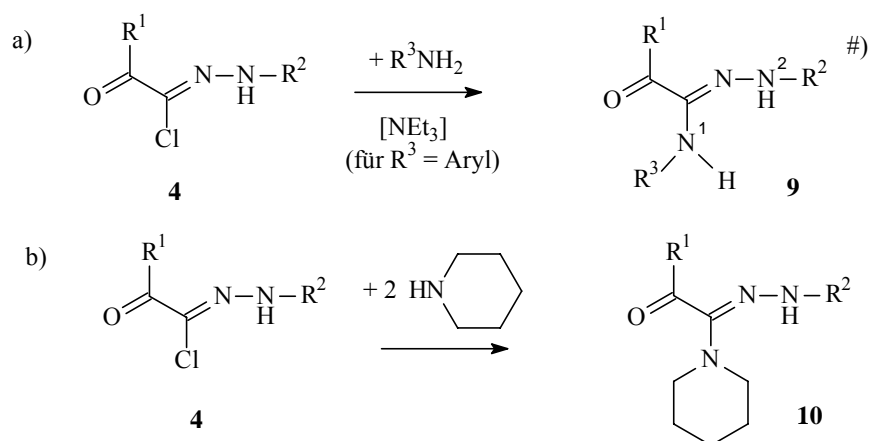
Gemäß der Synthesekonzeption war eine der gewünschten Zielstrukturen das *N*-methylierte Carbonsäurearylhyaazonoylchlorid **8** (s. Schema 9). Zur Synthese dieser Verbindung ist die Japp-Klingemann-Reaktion nicht anwendbar, da diese Reaktion auf die Darstellung von *N*-monoarylsubstituierten Hydrazonen beschränkt ist. [Frohberg 2002 (1)] In der Literatur sind keine direkt übertragbaren Vorschriften zur Lösung dieses Problems gegeben. Zunächst wurde versucht, das entsprechende Arylhyaazonoylchlorid **4a** analog der Vorschrift von Audrieth [1941] mit Methyljodid zu methylieren. Dieser Versuch war trotz verschiedentlicher Variationen der Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich. Die direkte Halogenierung des entsprechenden Hydrazons schied wegen der dabei auftretenden Halogenierung des nicht deaktivierten Aromaten aus. Daher blieb als Syntheseweg nur die Darstellung über das *N*-methylsubstituierte Hydrazid mit dessen anschließender Chlorierung (s. Schema 9).



Schema 9: Darstellung des Oxalsäure-2-anilid-1-(*N*-methyl-*N*-phenyl-hydrazoneyl)chlorides (**8**)

Der Ausgangsstoff Oxalsäure-2-anilid-1-chlorid **6**, erhalten nach Literaturvorschrift [I.G. Farben 1929], wurde in Toluol mit *N*-Methyl-*N*-phenylhydrazin bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Chlorierung des mit einer Ausbeute von 50 % erhaltenen Oxalsäure-2-anilid-1-(*N*-methyl-*N*-phenylhydrazids) **7** wurde zunächst mit Thionylchlorid versucht (nach [Kuhn 1998]). Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis. Dünnschichtchromatographisch war eine Umsetzung zu beobachten, es war jedoch nicht möglich, das gesuchte Produkt zu isolieren. Die Chlorierung mit Phosphorpentachlorid in Toluol unter moderatem Erwärmen des Reaktionsansatzes analog der Vorschrift von Rivett [1983] gelang mit einer Ausbeute von nahezu 50 %. Das Produkt **8** mußte säulenchromatographisch gereinigt werden.

2.2.1.3 Amidrazone

Schema 10: Darstellung der Amidrazone **9** und **10**a) *N*¹-unsubstituierte bzw. *N*¹-monosubstituierte Amidrazone **9**b) *N*¹-pentamethylensubstituierte Amidrazone **10**#) Die Numerierung der *N*-Atome wurde nach Reimlinger [1997] vorgenommen.

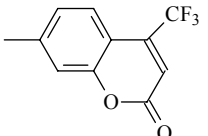
Die möglichen Synthesewege zur Darstellung von Amidrazonen (Säureamidhydrazonen) sind in einem Übersichtsartikel von Watson [1991] zusammengefaßt. Einer der Zugangswege ist die nucleophile Substitution von Carbonsäurearylhyaazonoylchloriden mit Ammoniak, primären oder sekundären aliphatischen oder aromatischen Aminen. [Watson 1975] Gemäß den Betrachtungen zur Synthese in der Einleitung wurden die Amidrazone auf diesem Weg synthetisiert. Wurde die Umsetzung mit Anilinen durchgeführt, war die Zugabe der äquimolaren Menge Triethylamin als Protonenakzeptor notwendig, um die Reaktion durchzuführen. [Benincori 1988] Da Ammoniak und aliphatische Amine eine ausreichende Basizität besitzen, um als Protonenakzeptor zu fungieren, [Heubach 1980] wurden diese Reaktionspartner in doppelt molarer Menge eingesetzt und auf den Zusatz von Triethylamin verzichtet.

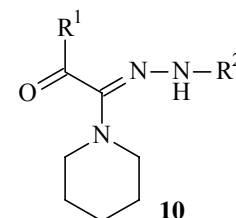
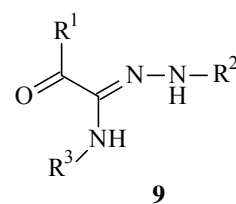
Bülow führte die Reaktion mit Ammoniak durch, indem Ammoniakgas in die ethanolische Lösung der Hydrazonoylchloride eingeleitet wurde. [Bülow 1925] Ebenso war es möglich, den Ammoniak in methanolischer Lösung zu verwenden. Dadurch wurden Nebenreaktionen unterdrückt, die bei Verwendung einer wäßrigen Ammoniaklösung auftraten und durch eine starke Verfärbung des Reaktionsansatzes sichtbar waren. Feste aliphatische oder aromatische Amine wurden in einem kleinen Volumen Dioxan gelöst.

Am besten lief die Reaktion ab, wenn die Aminkomponente im Reaktionsgefäß vorgelegt und das in Dioxan gelöste Carbonsäurearylhyaazonoylchlorid langsam dazu gegeben wurde. So konnte die Entstehung von Nebenprodukten weitestgehend vermieden werden.

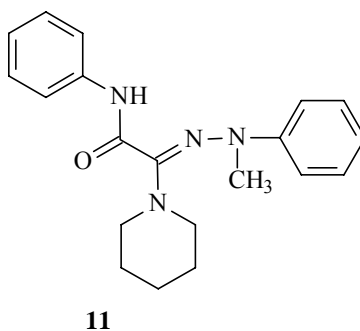
Die Reaktion verlief bei einer Temperatur von 40 bis 45 °C meist innerhalb von zwölf Stunden mit einer Ausbeute von 70 bis 80 %.

Tabelle 3: Substitutionsmuster der Amidrazone **9**, **10**

	R¹	R²	R³
9a	C ₆ H ₅ -NH	C ₆ H ₅	CH ₃
9b	C ₆ H ₅ -NH	2-F-C ₆ H ₄	H
9c	C ₆ H ₅ -NH	3-F ₃ C-C ₆ H ₄	H
9d	C ₆ H ₅ -NH	3-F-C ₆ H ₄	H
9e	C ₆ H ₅ -NH	4-F-C ₆ H ₄	H
9f	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-Cl-C ₆ H ₄	H
9g	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-NC-C ₆ H ₄	H
9h	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	3-Cl-C ₆ H ₄	H
9i	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	4-HOOC-C ₆ H ₄	H
9j	3-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-Cl-C ₆ H ₄	2-naphthyl
9k	4-Cl-C ₆ H ₄ -NH	3-Cl-C ₆ H ₄	H
9l	4-F-C ₆ H ₄ -NH	3-CH ₃ OC-C ₆ H ₄	H
9m	C ₂ H ₅ -O	C ₆ H ₅	H
9n	C ₂ H ₅ -O	4-Cl-C ₆ H ₄	H
9o	CH ₃	4-Cl-C ₆ H ₄	1-naphthyl
9p	CH ₃	4-Cl-C ₆ H ₄	2-naphthyl
9q	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
9r	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	4-F-C ₆ H ₄	H
9s	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	3-O ₂ N-C ₆ H ₄	H
10a	C ₆ H ₅ -NH		–
10b	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	C ₆ H ₅	–

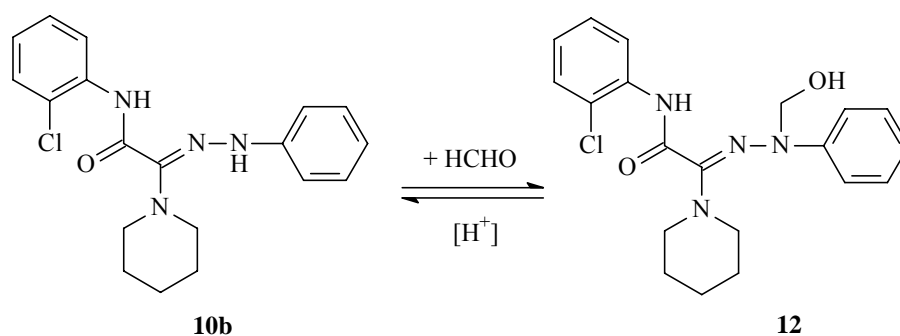


Die Synthese des *N*²-methylsubstituierten Amidrazones **11** aus der Verbindung **8** verlief ohne Unterschiede zur Umsetzung der *N*²-unsubstituierten Verbindungen. Es wurde eine Ausbeute von 50 % erreicht.

Schema 11: Oxalsäure-2-anilid-*N*²-methyl-*N*¹-pentamethylen-*N*²-phenylamidrazon (**11**)

Werden die am Stickstoff N^1 pentamethylensubstituierten Amidrazone **10** mit Carbonylverbindungen zur Reaktion gebracht, kann nicht mit der Ausbildung eines Ringschlusses in der im Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Art und Weise gerechnet werden.

Zur Abklärung der Reaktivität der Amidrazone **10** wurde ein Vertreter, das Amidrazon **10b**, dennoch mit Formaldehyd unter Katalyse mit *para*-Toluolsulfonsäure behandelt (s. Schema 12). Auf der Dünnschichtplatte wurde ein Reaktionsprodukt detektiert, das isoliert werden konnte. Die nachfolgende Strukturaufklärung brachte das Ergebnis, daß es sich bei der isolierten Substanz um ein N^2 -hydroxymethylsubstituiertes Amidrazon handelt. Mit dieser Reaktion wurde ein weiterer Syntheseweg gefunden, um Amidrazone mit zweifacher Substitution am Hydrasonstickstoff N^2 zu erhalten.

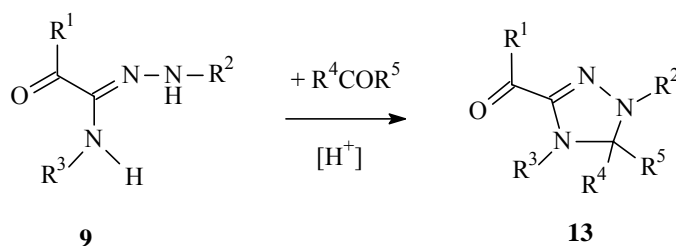


Schema 12: Darstellung des Oxalsäure-2-(2-chloranilid)- N^2 -hydroxymethyl- N^1 -pentamethylen- N^2 -phenylamidrazons (**12**)

Die synthetisierten Amidrazone bildeten meist gelb gefärbte Kristalle, die teilweise stark oxidationsempfindlich waren, was sich schon beim Stehenlassen an der Luft durch eine Intensivierung der Färbung bemerkbar machte. In verschlossenen Gefäßen bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ unter Schutzgasatmosphäre waren die Verbindungen jedoch über einen langen Zeitraum stabil.

2.2.1.4 Cyclisierungsreaktionen

In der Literatur sind zahlreiche Synthesewege beschrieben, die zu aromatischen und nichtaromatischen $1H$ -1,2,4-Triazolen führen (Übersicht in [Kadaba 1989]). Amidrazone sind als Ausgangsstoffe für die Darstellung derartiger Heterocyclen bekannt. [Zelenin 1989] Die Umsetzung von Amidrazonen mit Carbonylverbindungen (Aldehyden, Ketonen) ist trotz der Einfachheit der Reaktion bisher nur von wenigen Autoren praktiziert worden. [Zelenin 1980]

2.2.1.4.1 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazoleSchema 13: Darstellung der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13**

Die 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** wurden aus den Amidrazonen **9** und Aceton bzw. Acetaldehyd erhalten (s. Schema 13). Die Carbonylverbindung diente gleichzeitig als Lösungsmittel für die Reaktion. Die für die Cyclisierung erforderlichen sauren Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe katalytischer Mengen *para*-Toluolsulfonsäure geschaffen. [Case 1973]

Diese Art der Umsetzung ließ sich auch mit anderen Carbonylverbindungen durchführen. In [Drutkowski 1999] wurde die Cyclisierung mit Aceton, Ethylmethylketon und Cyclohexanon vorgenommen. Mit Formaldehyd entstanden die wenig stabilen, in 5-Position unsubstituierten 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole, die auf der Dünnschichtplatte nachweisbar waren, aber nicht isoliert werden konnten, da sie sofort in die aromatischen 1*H*-1,2,4-Triazole übergingen (s. Kap. 2.2.1.4.2). Meist erfolgte der Ringschluß innerhalb von 30 Minuten. Da in einigen Fällen jedoch auch Reaktionszeiten von mehreren Stunden erforderlich waren, empfahl es sich, den Reaktionsverlauf mittels DC zu verfolgen. Die Reaktionsausbeuten lagen zwischen 20 und 60 %.

Versuche, die teilweise unbefriedigenden Ausbeuten durch Katalyse mit anderen Säuren, wie z.B. verdünnter oder konzentrierter Salzsäure oder Essigsäure zu erhöhen, schlugen fehl. Hierbei wurde eine Reihe von Nebenprodukten gebildet, die dünnschichtchromatographisch nachgewiesen, aber nicht isoliert werden konnten.

Bei der Umsetzung der *N*¹-arylsubstituierten Amidrazone mit Aceton wurde auf der DC-Platte die Bildung eines zweiten Produktes beobachtet. Der Vergleich des Laufverhaltens dieser Nebenprodukte auf der DC mit dem der unten beschriebenen Triazepine (s. Kap. 2.2.1.4.3) ließ den Schluß zu, daß es sich bei diesen Verbindungen um arylkondensierte Triazepine (analog den Verbindungen **15**) handeln mußte. Alle Versuche, diese Nebenprodukte zu isolieren und zu reinigen, scheiterten.

Die Amidrazone **9b**, **9f**, **9g** und **9j** waren der Umsetzung mit Aceton unter den beschriebenen Bedingungen nicht zugänglich. Es war dünnschichtchromatographisch nur eine äußerst geringe Menge der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole nachweisbar, erkennbar an der typischen Eigenfluoreszenz dieser Verbindungen. Gemeinsames Strukturmerkmal der genannten Amidrazone ist der Substituent in *ortho*-Position des Hydrazon-Aromaten. Dieser führt zu einer sterischen Hinderung und der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem *ortho*-Substituenten und dem Wasserstoff der Hydrazon-*NH*-Gruppe, was die Reaktivität an dieser Stelle des Moleküls deutlich herabsetzen kann. [Frohberg]

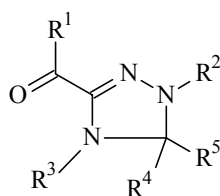
Die beschriebenen 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** waren meist gut kristallisierende Verbindungen, die intensiv gelb gefärbte Kristalle bildeten. Die Verbindungen waren in Alkoholen gut löslich, wobei eine intensiv grün-gelbe Fluoreszenz auftrat. Im festen Zustand waren die

4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole bei Raumtemperatur über lange Zeit stabil.

Bemerkenswert ist die Eigenschaft der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13**, an der Luft unter trockenem Erhitzen innerhalb weniger Stunden in die entsprechenden aromatischen 1*H*-1,2,4-Triazole überzugehen [Drutkowski 1999, Pinson 1984].

Unter stark sauren Bedingungen und bei längerem Stehenlassen an der Luft waren die Verbindungen nicht stabil. Dies wurde durch die Abnahme bzw. das völlige Verschwinden der Fluoreszenz erkennbar. Im Kapitel 2.2.3.4 sind die Ergebnisse von NMR-Experimenten beschrieben, mit denen dieser Sachverhalt näher untersucht wurde.

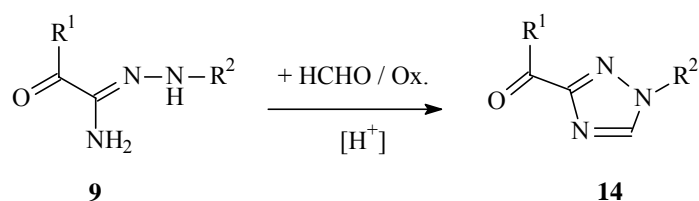
Zwischen Amidrazonen und Alkylaryl- oder Diarylketonen fand keine Reaktion in der oben beschriebenen Art und Weise statt. Hierfür war die niedrige Carbonylreaktivität der arylsubstituierten Ketone verantwortlich. Der Ersatz der Ketone durch α,α -Dichlormethanderivate sollte auch diese Art der Cyclisierung ermöglichen [Neugebauer 1995].



13

Tabelle 4: Substitutionsmuster der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13**

	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵
13a	C ₆ H ₅ NH	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
13b	C ₆ H ₅ NH	3-F-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13c	C ₆ H ₅ NH	4-F-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13d	2-Cl-C ₆ H ₄ NH	3-Cl-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13e	2-Cl-C ₆ H ₄ NH	4-HOOC-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13f	4-Cl-C ₆ H ₄ NH	3-Cl-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13g	4-F-C ₆ H ₄ NH	3-CH ₃ OC-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13h	C ₂ H ₅ -O	C ₆ H ₅	H	CH ₃	CH ₃
13i	C ₂ H ₅ -O	4-Cl-C ₆ H ₄	H	CH ₃	H
13j	CH ₃	4-Cl-C ₆ H ₄	1-naphthyl	CH ₃	CH ₃
13k	CH ₃	4-Cl-C ₆ H ₄	2-naphthyl	CH ₃	CH ₃
13l	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃
13m	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	4-F-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃
13n	CH ₃ OCOC ₃ H ₆	3-O ₂ N-C ₆ H ₄	H	CH ₃	CH ₃

2.2.1.4.2 1H-1,2,4-TriazoleSchema 14: Darstellung der 1H-1,2,4-Triazole **14**

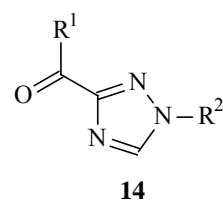
Die Umsetzung *N*¹-unsubstituierter Amidrazone **9** mit Formaldehyd anstelle von Ketonen führte unter saurer Katalyse zu 1H-1,2,4-Triazolen **14** (s. Schema 14). Die Reaktion wurde in Ethanol am Rückfluß durchgeführt. Die entsprechenden 4,5-Dihydro-1H-1,2,4-triazole **13** wurden als Intermediate im Reaktionsansatz anhand ihrer typischen Fluoreszenz auf der DC-Platte detektiert. Ihre Isolierung gelang aber nicht, da sie beim Versuch der Aufreinigung sofort in die aromatischen Verbindungen übergingen. Diese Erscheinung des spontanen oxidativen Übergangs der 4,5-Dihydro-1H-1,2,4-triazole **13** zu den aromatischen 1H-1,2,4-Triazolen **14** ist in der Literatur bekannt. [Case 1970]

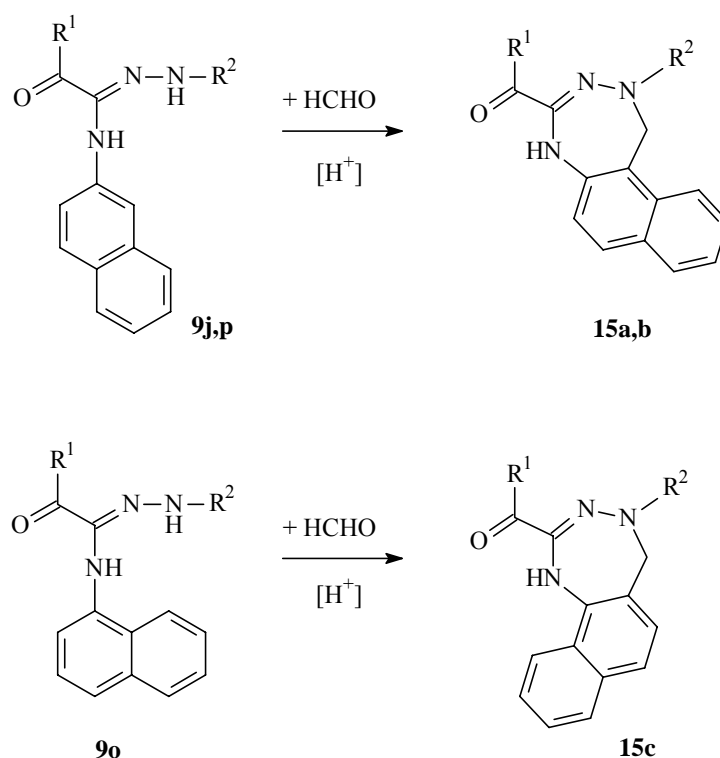
Auch die Amidrazone mit *ortho*-Substitution am Hydrazonaromaten, die mit Aceton keine Reaktion eingingen, reagierten mit Formaldehyd problemlos zu 1H-1,2,4-Triazolen **14**. Offensichtlich ist der Raumbedarf des Formaldehydmoleküls so gering, daß hier die sterische Hinderung keine Rolle spielt. Desweiteren wird die Reaktion durch die im Vergleich zum Aceton höhere Reaktivität des Formaldehyds begünstigt.

Die 1H-1,2,4-Triazole **14** kristallisierten aus Alkoholen in feinen, farblosen Nadeln. Auf der Dünnschichtplatte waren die Verbindungen gut erkennbar an einer intensiven bläulichen Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

Tabelle 5: Substitutionsmuster der 1H-1,2,4-Triazole **14**

	R¹	R²
14a	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-Cl-C ₆ H ₄
14b	2-Cl-C ₆ H ₄ -NH	2-NC-C ₆ H ₄
14c	4-F-C ₆ H ₄ -NH	3-CH ₃ OC-C ₆ H ₄



2.2.1.4.3 NaphthotriazepineSchema 15: Darstellung der Naphthotriazepine **15**

Wurden *N*¹-arylsubstituierte Amidrazone mit Formaldehyd umgesetzt, führte die Reaktion zu arylkondensierten Triazepinen **15** (s. Schema 15). Die Synthese solcher Benzotriazepine und Arbeiten zur Strukturaufklärung sind in der Literatur beschrieben. [Drutkowski 1999, Froberg 1996] Eine Übersicht über 1,3,4-Triazepine liefert Morgenstern. [2000] Die beschriebene Reaktion der *N*¹-phenyl-substituierten Amidrazone ließ sich gleichermaßen mit den *N*¹-naphthyl-substituierten Amidrazonen **9j,o,p** durchführen. Mittels DC konnte im Reaktionsansatz die Bildung von 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazolen **13** in Analogie zu der im Kap. 2.2.1.4.1 beschriebenen Cyclisierungsreaktion nachgewiesen werden. Die Isolierung dieser Nebenprodukte gelang jedoch in keinem Fall. Die Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Naphthotriazepinen **15** wurden analog der Synthese der Fünfringe gestaltet. Die Umsetzung erfolgte in siedendem Ethanol unter Katalyse mit *para*-Toluolsulfonsäure. Die Reaktionszeiten waren sehr kurz. Bereits nach wenigen Minuten fiel das Produkt aus, welches nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes in fast reinem Zustand abgesaugt werden konnte. Die Naphthotriazepine waren als ausgesprochen gut kristallisierende, intensiv gelb-orange gefärbte Verbindungen isolierbar.

Diese Art der Umsetzung von Amidrazonen mit Diacetyl wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Die Ausbeute der Reaktion betrug etwa 30 %. Durch Erwärmen des Reaktionsansatzes ließ sich die Ausbeute nicht erhöhen, da hierbei eine Reihe von Nebenprodukten entstand, welche aber nicht näher charakterisiert wurden.

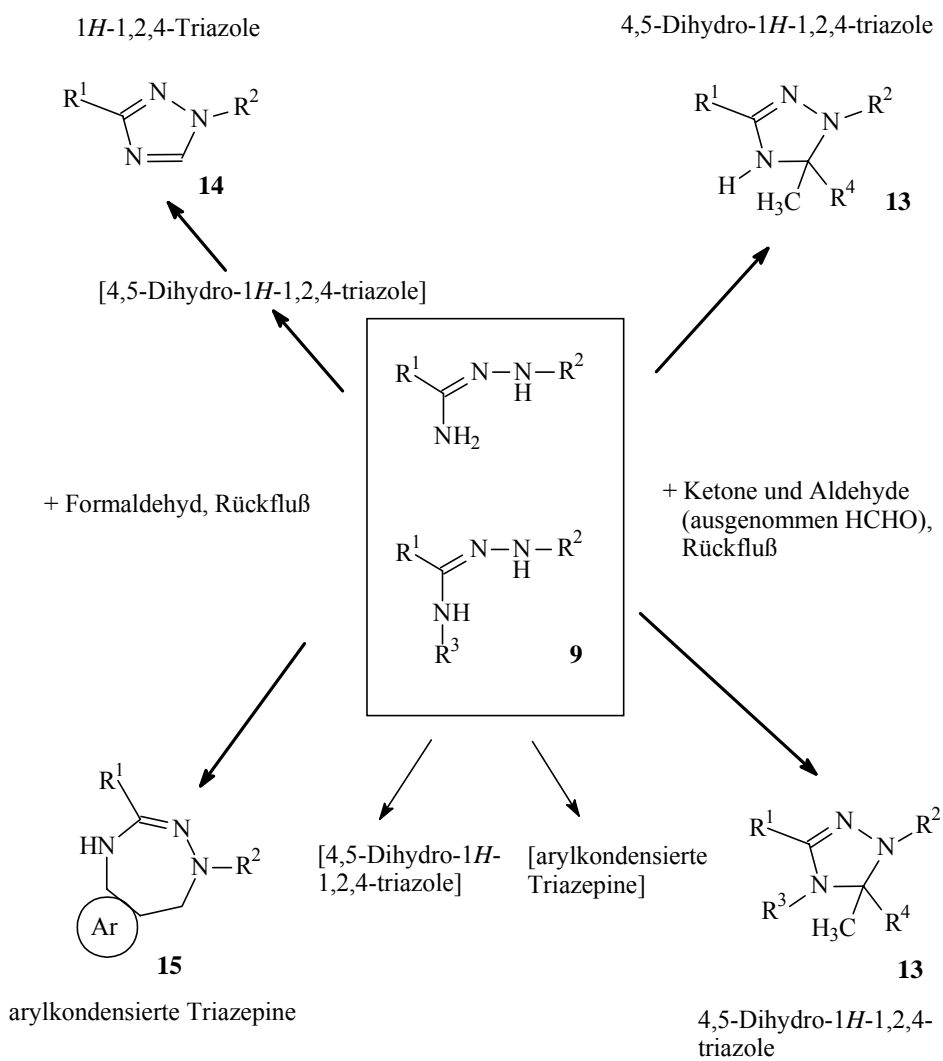
Auf der Dünnschichtplatte war auch nach Reaktion bei Raumtemperatur ein weiteres Produkt detektierbar, welches nach seinem Aussehen und seinen Laufeigenschaften ein entsprechendes 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazol **13** sein sollte.

2.2.2 Reaktionsschema für die Cyclisierungsreaktionen

In Zusammenfassung der hier vorgestellten Ergebnisse und denen aus [Drutkowski 1999] kann ein verallgemeinerndes Reaktionsschema (Schema 17) erstellt werden. Es beschreibt die möglichen Richtungen der chemischen Umsetzungen, welche ausgehend von Amidrazonen mit Carbonylverbindungen bevorzugt sind.

Hierbei ist zum einen zwischen den *N*¹-unsubstituierten und *N*¹-substituierten Amidrazonen zu unterscheiden. Zum anderen bestehen Unterschiede zwischen den Reaktionen mit Formaldehyd und denen mit Ketonen und Aldehyden (ausgenommen Formaldehyd).

Die Reaktionen mit Aceton oder Acetaldehyd ergeben bevorzugt 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole. Umsetzungen mit Formaldehyd ergeben aus *N*¹-unsubstituierten bzw. *N*¹-alkylsubstituierten Amidrazonen bevorzugt 1*H*-1,2,4-Triazole und aus *N*¹-arylsubstituierten Amidrazonen bevorzugt arylkondensierte Triazepine. Mit dem Auftreten der entsprechenden alternativen Produkte als Nebenprodukte der Reaktionen ist in jedem Fall zu rechnen. Alle genannten Umsetzungen laufen unter saurer Katalyse mit *para*-Toluolsulfonsäure ab.



Schema 17: Übersicht über die Cyclisierungsreaktionen von Amidrazonen mit Carbonylverbindungen

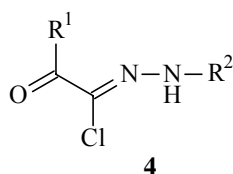
2.2.3 Analytische Daten – Strukturabsicherung

Zur Strukturabsicherung und -aufklärung der im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Verbindungen wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Experimente durchgeführt sowie IR- und Massenspektren aufgenommen. Die Reinheit der isolierten Produkte wurde mit der elementaranalytischen Bestimmung des C-, H-, N- und Halogengehaltes der Verbindungen nachgewiesen.

Die Daten der ^1H -, ^{13}C -NMR- und IR-Analytik sind für wesentliche Strukturelemente der beschriebenen Verbindungen in den Tabellen 7 bis 11 zusammengestellt. Weitere Signale der NMR-Spektren sind im experimentellen Teil bei den Beschreibungen der jeweiligen Verbindungen aufgeführt, ebenso die massenspektrometrischen Daten sowie die Ergebnisse der Elementaranalysen. Im Anhang (Teil I) sind NMR-Spektren der in den Tabellen mit \diamond gekennzeichneten Verbindungen abgebildet. Ausgangsstoffe, die nach Literaturvorschriften synthetisiert wurden, sind in den Tabellen nicht aufgeführt.

2.2.3.1 Carbonsäurearylhyaazonoylchloride

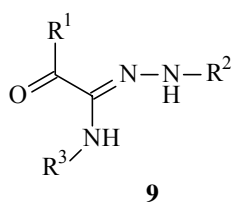
In den ^1H -NMR-Spektren der Carbonsäurearylhyaazonoylchloride treten neben den Signalen der Aromaten die der H-Atome der Hydrazonstruktur zwischen 9 und 10 ppm hervor. In den ^{13}C -NMR-Spektren finden sich zwei charakteristische Signale für die C=O- und die C=N-Gruppierungen bei 157 ppm bzw. 120 ppm. Das IR-Spektrum zeigt Banden für die C=O- und die NH-Struktur.

Tabelle 7: spektroskopische Daten der Carbonsäurearylhyaazonoylchloride **4**

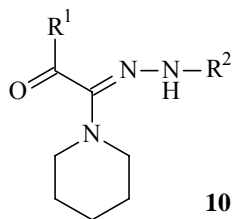
	¹ H-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]	¹³ C-NMR- spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]		IR-spektroskopische Daten (KBr) ν [cm ⁻¹]	
		NNH (s, 1H)	C=O (1C)	C=N (1C)	NH
4b	9,41	157,0	121,5	3324	1658
4d	10,11	157,4	119,6	3386, 3233	1667
4e	10,24	158,9	122,2	3400, 3258	1702, 1731
4f	9,01	157,1	121,8	3371, 3320	1691
4g	10,62	156,9	121,2	3354, 3208	1687
4h	10,61	157,2	118,9	3348, 3275	1680
4i	9,88	157,1	119,6	3434	1690
4j	8,89	156,9	122,3	3313, 3272	1651
4k	10,46	157,4	119,5	3370, 3246	1669
4l	10,32	157,7	119,4	3306, 3237	1650
8	–	158,5	117,7	3315	1651

2.2.3.2 Amidrazone

Die ¹H-NMR-Spektren der Amidrazone in DMSO zeigen zwei den Stickstoffgruppierungen zuzuordnende Signale: ein Singulett der Hydrazone-Gruppe zwischen 8 und 9 ppm und das Singulett der NH₂- bzw. NH-Gruppe bei 6 bzw. 8 ppm. Im Falle der Oxalsäure-2-anilid-1-arylamidrazone kommt ein weiteres NH-Signal für die Säureamid-Gruppe hinzu, welches eine chemische Verschiebung um 10 ppm aufweist (s. Angaben im experimentellen Teil). In den ¹³C-NMR-Spektren sind das C=O-Signal bei 160 ppm (bzw. 190 ppm) und das C=N-Signal bei 137 ppm typisch für die Amidrazone-Struktur. Im IR-Spektrum sind die Banden der C=O- und NH-Valenzschwingungen bei 1650 und 3300 bis 3400 cm⁻¹ zu erkennen.



9



10

Tabelle 8: spektroskopische Daten der Amidrazone 9, 10

	¹ H-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]		¹³ C-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]		IR-spektroskopische Daten (KBr) ν [cm ⁻¹]	
	NNH (s, 1H)	NH ₂ /NH	C=O (1C)	C=N (1C)	NH	C=O
9b	8,25	6,44 (s, 2H)	160,2	138,0	3357, 3441	1654
9c	8,94	6,16 (s, 2H)	159,9	138,1	3360	1647
9d	8,80	6,12 (s, 2H)	160,1	136,7	3440, 3361	1648
9f^o	8,02	6,71 (s, 2H)	159,6	137,7	3418, 3329	1691
9g	9,13	6,55 (s, 2H)	159,6	137,7	3460, 3356	1701, 1672
9h	8,99	6,25 (s, 2H)	159,5	136,2	3324	1678
9i	9,32	6,42 (s, 2H)	159,3	136,6	3333	1686
9j	8,96	8,04 (s, 1H)	160,8	133,9	3345, 3307	1678
9k	8,79	6,12 (s, 2H)	160,0	137,1	3359	1675
9l	8,83	6,10 (s, 2H)	160,2	137,8	3339, 3437	1667
9m	8,65	5,86 (s, 2H)	162,4	133,5	3365	1714
9o	9,94	7,73 (s, 1H)	193,6	134,7	3331	1671
9p	9,83	6,61 (s, 1H)	193,5	136,4	3343	1669
9r	8,90	5,70 (s, 2H)	196,2	141,5	3446, 3362	1740, 1667
9s^o	9,39	5,91 (s, 2H)	196,5	132,0	3361	1684
10a	8,89	–	160,6	138,1	3426, 3314	1659, 1716
11	–	–	162,3	152,5	3435	1660
12	–	–	152,5	136,9	3436	1668

2.2.3.3 Heterocyclische Verbindungen

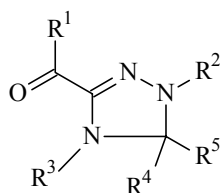
In den ¹H-NMR-Spektren der nichtaromatischen, heterocyclischen Verbindungen sind die Signale der NH-Gruppe des Heterocyclus im Bereich der Verschiebung der Signale der Aromatenprotonen sichtbar. Im Falle der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** sind die NH-Signale um etwa 7 ppm verschoben. Bei den Triazepinen **15** beträgt die Verschiebung dieses Signals etwa 9 ppm. Durch Aufnahme von Spektren, die den Nuclear-Overhauser-Effekt (NOE) zeigen, und ¹H, ¹³C-NMR-long-range-Experimente wurde die Zuordnung der NH-Signale zu den entsprechenden Gruppierungen gesichert. Hinzu kommen jeweils die Signale der Alkylgruppen in 5-Position der Ringe.

Verglichen mit den ¹³C-Spektren der offenkettigen Verbindungen sind die Signale der

C=O-Gruppen der Heterocyclen etwa 3 ppm hochfeldverschoben, wohingegen die Signale der C=N-Gruppen meist um mehr als 7 ppm tieffeldverschoben auftreten. Die Signale des C-5-Atoms der Heterocyclen treten bei etwa 85 ppm im Falle der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** und bei etwa 58 ppm im Falle der Naphthotriazepine **15** auf. Bei den 1*H*-1,2,4-Triazolen **14**, als Aromaten, erscheint das Signal des C-5-Atoms im Bereich der aromatischen C-Atome bei etwa 130 ppm. Die typischen Banden im IR-Spektrum treten bei 1680 bis 1700 cm⁻¹ für die Carbonylfunktion und bei 3300 bis 3400 cm⁻¹ für die NH-Gruppe auf.

Die Zuordnung des ¹³C-Signals der C=N-Gruppe sowohl in den offenkettigen als auch den cyclischen Verbindungen gestaltete sich oft schwierig, da die Verschiebung des aromatischen C-Atoms in α -Position zur Hydrazonstruktur die gleiche Größenordnung aufweist. Um zwischen beiden Signalen zu unterscheiden, wurden ¹H, ¹³C-NMR-long-range-Experimente durchgeführt.

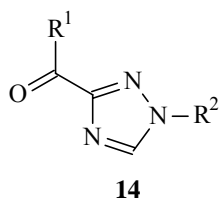
2.2.3.3.1 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole



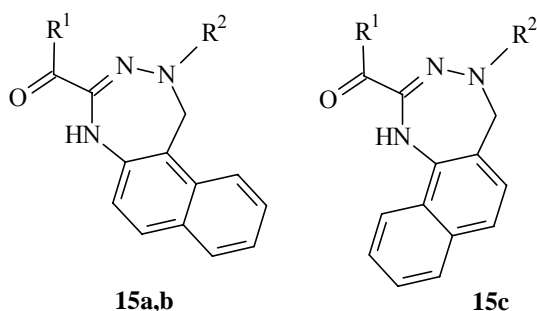
13

Tabelle 9: spektroskopische Daten der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13**

	¹ H-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]		¹³ C-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]				IR-spektroskopische Daten (KBr) ν [cm ⁻¹]	
	NH (R ³) (s, 1H)	CH ₃ (s)	C=O (1C)	C=N (1C)	C-5 (1C)	CH ₃	NH	C=O
13a ^o	–	1,52 (6H)	157,4	144,2	87,3	22,1 (2C)	3331	1678
13b	7,55	1,60 (6H)	156,5	144,5	83,8	26,4 (2C)	3294	1668
13c	7,30	1,47 (6H)	156,7	144,8	84,7	26,5 (2C)	3381, 3325	1679
13d ^o	7,69	1,60 (6H)	156,5	144,3	84,2	26,5 (2C)	3358	1697
13e	7,84	1,69 (6H)	156,4	144,5	83,7	26,6 (2C)	3341	1686
13f	7,58	1,58 (6H)	156,6	144,5	83,9	26,5 (2C)	3317	1674
13g	7,53	1,58 (6H)	156,6	144,7	84,0	26,6 (2C)	3290	1676
13h	7,19	1,52 (6H)	158,8	141,1	84,1	26,6 (2C)	3292	1722
13i	7,66	1,26 (3H)	158,7	142,3	73,7	20,2 (1C)	3419	1717
13j	–	1,51 (6H)	189,4	148,4	90,5	27,2 (2C)	3435	1685
13k	–	1,56 (6H)	188,4	146,4	89,1	25,5 (2C)	3468	1680
13l	–	1,49 (6H)	189,8	145,6	88,5	25,4 (2C)	3460	1680
13m	7,09	1,47 (6H)	190,7	147,5	84,4	26,6 (2C)	3348	1665
13n	7,52	1,62 (6H)	191,4	148,9	83,9	26,4 (2C)	3360	1667

2.2.3.3.2 1H-1,2,4-TriazoleTabelle 10: spektroskopische Daten der 1H-1,2,4-Triazole **14**

	¹ H-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]	¹³ C-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]			IR-spektroskopische Daten (KBr) ν [cm ⁻¹]	
		C(5)-H (s, 1H)	C=O (1C)	C=N (1C)	C-5 (1C)	NH
14a	9,22	156,5	147,2	130,5	3346	1703
14b	9,41	157,9	147,9	129,5	3436	1701
14c [◇]	9,63	157,1	144,1	130,5	3372	1698

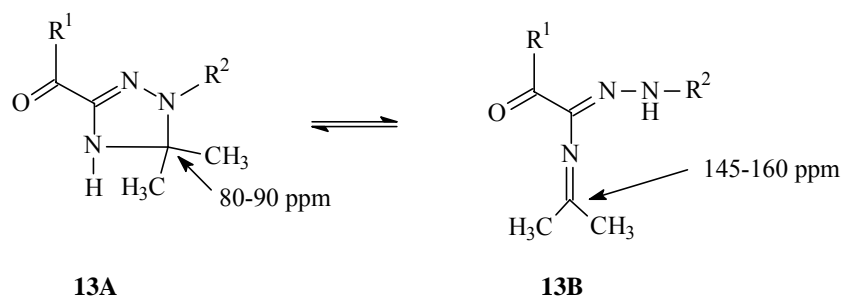
2.2.3.3.3 NaphthotriazepineTabelle 11: spektroskopische Daten der Naphthotriazepine **15**

	¹ H-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]		¹³ C-NMR-spektroskopische Daten (DMSO-d ₆) δ [ppm]			IR-spektroskopische Daten (KBr) ν [cm ⁻¹]	
	NH (s, 1H)	CH ₂ (s, 2H)	C=O (1C)	C=N (1C)	C-5 (1C)	NH	C=O
15a [◇]	9,09	4,86	160,5	133,2	58,8	3337	1685
15b	8,77	5,27	194,2	147,8	52,5	3322	1692
15c	8,62	5,05	194,5	147,3	56,9	3363	1691

Die NMR-Spektren des 1,6-Dihydro-1,2,4-triazins **16** finden sich im Anhang (Abbildungen 44 bis 46). Die Daten sind im experimentellen Teil aufgeführt.

2.2.3.4 Strukturabsicherung

Die Reaktion der unsubstituierten Amidrazone mit Ketonen zu Verbindung **13** kann prinzipiell zu zwei Produkten führen (s. Schema 18): dem heterocyclischen 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazol **13A** und für den Fall, daß die Carbonylkomponente nur am Stickstoff N^1 angreift, zu der offenkettigen Analogform **13B**.



Schema 18: Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum der heterocyclischen **13A** und offenkettigen **13B** Isomeren

Das Signal mit der chemischen Verschiebung von 80 bis 90 ppm in den ^{13}C -NMR-Spektren beweist den erfolgten Ringschluß in Übereinstimmung mit Literaturangaben. [Zelenin 1989, Zelenin 1980] Wenn der Ringschluß nicht stattfindet, ist im ^{13}C -NMR-Spektrum ein Signal bei 145 bis 160 ppm zu erwarten. [Kadaba 1989]

Im sauren Milieu waren die in der Form **13A** vorliegenden 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** nicht stabil. Um dies näher zu untersuchen, wurden mit der Verbindung **13d** NMR-Experimente durchgeführt. Wurde diese Substanz in $\text{DMSO-}d_6$ gelöst und mit einem Tropfen deuterierter Trifluoressigsäure versetzt, so war bereits nach einem Tag im ^{13}C -NMR-Spektrum zu beobachten, daß das Signal des Kohlenstoffs in Position 5 des Heterocyclus bei 84,4 ppm kleiner wurde. Zusätzlich entstand ein Signal mit der chemischen Verschiebung 147,3 ppm, welches auf das Vorliegen der Form **13B** hindeutete (s. Schema 18). Auch für die zwei Methylgruppen war nach dem Ansäuern im ^{13}C -NMR-Spektrum ein neues Signal bei 30,6 ppm nachzuweisen (ohne Ansäuern: 26,4 ppm).

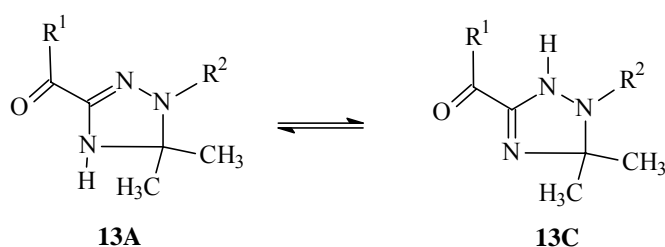
Die ursprüngliche Vermutung, daß unter sauren Bedingungen der Ringschluß reversibel ist und das Ausgangsamidrazon **9h** und Aceton nebeneinander vorliegen, konnte anhand der Daten nicht bestätigt werden. Im ^{13}C -NMR-Spektrum des angesäuerten 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazols fehlten die Signale des Amidrazons. Selbes gilt für die ^1H -NMR-Spektren, in denen die typischen NH-Peaks des Ausgangsamidrazons **9h** bei 9,97 ppm, 8,99 ppm (NH) und bei 6,25 ppm (NH_2) fehlten. Im ^1H -NMR-Spektrum verringerte sich die Größe der Signale mit der chemischen Verschiebung von 9,73 ppm (NH) und 1,59 ppm (CH_3) unter dem Einfluß von Trifluoressigsäure innerhalb kurzer Zeit deutlich. Dafür waren bei 10,09 ppm und bei 2,06 ppm neue Signale entstanden, die der offenkettigen tautomeren Form **13B** zugeordnet wurden. Bei Einstrahlung einer Zweitfrequenz entsprechend der chemischen Verschiebung des neu entstandenen Signals der CH_3 -Gruppen (2,06 ppm) trat kein NOE auf, da die räumliche Nähe dieser Gruppen zu den Protonen des Aromaten und der NH-Gruppe nun nicht mehr gegeben war. Nach elf Tagen hatte sich das Verhältnis der Integrale der NH-Signale auf 1,5 : 1 zugunsten der offenkettigen Form eingestellt (s.

Abbildungen 36 bis 39).

Auch wenn das 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazol **13d** in Chloroform-*d* gelöst und mit deuterierter Trifluoressigsäure versetzt wurde, waren die gleichen Veränderungen in den ¹H-NMR-Spektren zu beobachten, wie in DMSO.

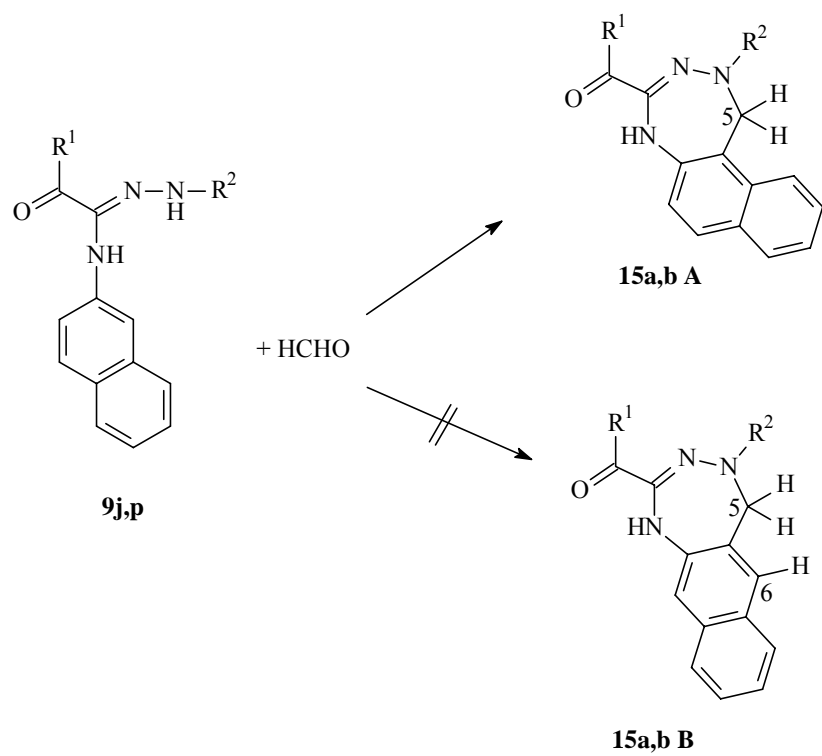
Beim Stehenlassen der nicht mit Trifluoressigsäure angesäuerten Chloroform-Lösung wurde jedoch nach einer Woche eine Zersetzung des Heterocyclus zum Amidrazon **9h** festgestellt. In diesem Fall traten im ¹H-NMR-Spektrum die charakteristischen NH-Signale des Amidrazons bei 9,97 ppm, 8,99 ppm und 6,25 ppm auf.

Für die Struktur der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole **13** können zwei tautomere Formen **13A** und **13C** angenommen werden (Schema 19). Mit Hilfe von NOE-Experimenten wurde gezeigt, daß die Heterocyclen in der tautomeren Form **13A** vorliegen. [Drutkowski 1999]



Schema 19: tautomere Formen **13A** und **13C** der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole

Die Cyclisierungsreaktion der *N*¹-2-naphthylsubstituierten Amidrazone **9j,p** mit Formaldehyd kann theoretisch zu zwei möglichen Produkten führen (Schema 20). Mit ¹H, ¹³C-NMR-long-range-Experimenten wurde nachgewiesen, daß als Produkt der Cyclisierungsreaktion die Form **15A** vorlag. Es war keine Fernkopplung des C-5-Kohlenstoffes mit irgendeinem Proton zu beobachten. Bei Vorliegen der isomeren Form **15B** sollte eine Kopplung zwischen dem C-5-Kohlenstoff und dem Proton in Position 6 auftreten.

Schema 20: Cyclisierungsreaktion der Amidrazone **9j,p** zu den Naphthotriazepinen **15a,b**

2.3 Zusammenfassung: Synthesen

Im Syntheseteil der vorliegenden Arbeit konnte die Palette der in den vergangenen Jahren am Institut für Pharmazeutische Chemie synthetisierten Hydrazone-Verbindungen um zahlreiche neue Vertreter erweitert werden. Die Synthesekonzeption und die Zugangswege zu den Strukturen blieben dabei im wesentlichen unverändert. Schwerpunktmäßig standen die synthetischen Arbeiten unter dem Ziel, Amidrazone und hiervon abgeleitete Heterocyclen zu erhalten.

Ausgehend von 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindungen wurden durch Japp-Klingemann-Reaktion zunächst Carbonsäurearylhyaazonoylchloride erhalten. Diese wurden mit Ammoniak, Anilinen oder Alkylaminen zu den Amidrazonen umgesetzt. In sauer katalysierten Reaktionen ließen sich die Amidrazone mit Carbonylverbindungen zu verschiedenen Heterocyclen umsetzen. Als Carbonylkomponenten kamen in diesen Heterocyclensynthesen Aceton, Acetaldehyd und Formaldehyd zum Einsatz. Die Synthesen ergaben je nachdem, welche Partner miteinander zur Reaktion gebracht wurden, fünfgliedrige (4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole bzw. 1*H*-1,2,4-Triazole) oder siebengliedrige Heterocyclen (Naphthotriazepine). Die bevorzugte Richtung des Reaktionsverlaufs wurde in einer Übersicht (Schema 17) verallgemeinernd dargestellt. Als Katalysator, um die sauren Reaktionsbedingungen zu schaffen, eignete sich *para*-Toluolsulfonsäure.

Eine völlig neuartige Synthese wurde mit der Reaktion eines Amidrazons mit Diacetyl zu einem 1,6-Dihydro-1,2,4-triazin durchgeführt. Die Umsetzung der Amidrazone mit 1,2-Dibromethan gelang dagegen nicht.

Das nicht durch Japp-Klingemann-Reaktion zugängliche *N*-methylierte Carbonsäurearylhyaazonoylchlorid wurde aus Oxalsäure-2-anilid-1-chlorid und *N*-Methyl-*N*-phenylhydrazin und nachfolgender Chlorierung erhalten. Durch Reaktion mit Piperidin wurde das entsprechende *N*²-methylsubstituierte Amidrazon erhalten. Ein alternativer Weg, *N*²-substituierte Amidrazone darzustellen, wurde mit der Reaktion von *N*¹-disubstituierten Amidrazonen mit Formaldehyd gefunden. Es konnte ein *N*²-hydroxymethylsubstituiertes Amidrazon isoliert werden.

Alle erstmals synthetisierten Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Struktur mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und IR-Spektroskopie analytisch untersucht. Die spektroskopischen Arbeiten dienten der Strukturaufklärung und -absicherung. Mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und NOE-Experimenten konnte das Vorliegen der Heterocyclen in den vorgeschlagenen tautomeren bzw. isomeren Formen nachgewiesen werden. NMR-analytisch wurde auch die Instabilität der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole im sauren Milieu aufgezeigt. Hier liegen diese Verbindungen in der tautomeren offenkettigen Form vor.

Die weitere Charakterisierung der in der Arbeit beschriebenen neuen Substanzen fand elementar-analytisch sowie über den Schmelzpunkt statt.

Für die durchgeführten Reaktionen wurden im experimentellen Teil der Arbeit allgemeine Arbeitsvorschriften formuliert, nach denen bei der Synthese weiterer analoger Verbindungen vorgegangen werden kann.

2.4 Experimenteller Teil – Synthesen

2.4.1 Allgemeine Angaben

Die angegebenen Schmelzbereiche wurden mit einem Heitztischmikroskop nach Boetius bestimmt und stellen unkorrigierte Werte dar.

Die Elementaranalyse zur Bestimmung des C-, H-, N-Gehaltes erfolgte an einem Gerät von Leco im automatischen Mikroverfahren, der Halogengehalt wurde im Halbmikroverfahren titrimetrisch ermittelt.

DC-Alufolien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck, Darmstadt wurden zur dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktionsverläufe und zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Substanzen verwendet. Als Laufmittel wurde, wenn nicht anders angegeben, Chloroform / Ether (7 / 3, V/V) verwendet. Die Detektion erfolgte nach dem Trocknen der Platten mittels UV-Licht der Wellenlängen 366 nm und 254 nm und in einigen Fällen durch Besprühen der Platten mit Bromthymolblaulösung (0,4 g KOH und 0,2 g Bromthymolblau auf 1000 ml Wasser).

Für die Flash- und Säulenchromatographie wurden Kieselgel 60H bzw. Kieselgel 60 der Firma Merck verwendet.

Zur Aufnahme der einzelnen Spektren dienten folgende Geräte:

- NMR-Spektroskopie: Gemini 2000 und Gemini 200 mit den Arbeitsfrequenzen 399,96 MHz und 199,95 MHz für ¹H-NMR-Spektren und 100,6 MHz und 50,3 MHz für ¹³C-NMR-Spektren. TMS wurde als interner Standard verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in δ [ppm] angegeben und beziehen sich auf die Symmetrieachse der Signale.
- Massenspektroskopie: AMD 402 der Firma AMD INTEDRA (Elektronenstoßionisation bei 70 eV)
- IR-Spektroskopie: Spectrum BX FT-IR der Firma Perkin-Elmer

Für die charakteristischen Strukturbausteine sind die Daten der NMR- und IR-Analytik in den Tabellen 7 bis 11 im Kapitel 2.2.3 aufgeführt. In den nachfolgenden Kapiteln sind lediglich die zusätzlichen Signale in den NMR-Spektren angegeben.

2.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 für die Synthese von *N*-Aryl-2-chlor-3-oxobutanamiden **3** (AV 1)

In einem Dreihalskolben mit aufgesetzter Destillationsapparatur werden 1,5 mol (190 ml) Acetessigester auf 150 – 160 °C erhitzt. Das frisch destillierte oder umkristallisierte Arylamin (0,5 mol; feste Arylamine werden in einem kleinen Volumen DMF gelöst) wird unter Rühren innerhalb von 30 min zugetropft. Dabei muß die Temperatur im Bereich von 150 – 160 °C gehalten werden. Die Temperatur wird weiter konstant gehalten bis kein Ethanol oder Ethanol-Ester-Azeotrop mehr überdestilliert. Der Ansatz wird danach auf 80 °C abgekühlt und der Überschuß an Acetessigester im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in eine Porzellanschale gebracht und über Nacht auskristallisieren gelassen. Der Feststoff wird mit eiskaltem Ether gewaschen und ohne weitere Reinigung der Chlorierung unterzogen.

Zu einer gerührten Suspension der 1,3-Dicarbonylverbindung (30 mmol) in 150 ml trockenem Toluol wird langsam eine äquimolare Menge Sulfurylchlorid (4,5 g) getropft. Bei Bedarf wird der Reaktionsansatz mit Eis gekühlt. Nach vollständigem Umsatz der Ausgangsstoffe (DC-Kontrolle) wird das Produkt abgesaugt und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 für die Synthese von Carbonsäurearyldiazonoylchloriden **4** (AV 2)

Das entsprechende Arylamin (20 mmol) wird in 40 ml halbkonzentrierter Salzsäure gelöst und unter Eiskühlung bei 0 – 5 °C mit 20 mmol Natriumnitrit (1,4 g in 5 ml Wasser) diazotiert. Die frisch bereitete Lösung des diazotierten Anilins wird tropfenweise zu der gekühlten Mischung aus 16 g Natriumacetat und 20 mmol 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindung **3** in 100 ml Methanol gegeben. Die Temperatur sollte bei diesem Vorgang 5 – 10 °C betragen. Nach zwei Stunden Rühren wird der Feststoff abgesaugt, gewaschen, getrocknet und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 für die Synthese von Amidrazonen **9** und **10** (AV 3)

Eine Lösung des Carbonsäurearyldiazonoylchlorides **4** (20 mmol) in ca. 50 ml Dioxan wird langsam zur doppelt molaren Menge des Amins gegeben. Im Falle der Umsetzung mit aromatischen Aminen werden jeweils 20 mmol Amin und Triethylamin (2,8 ml) eingesetzt. Feste Amine werden in wenigen ml Dioxan gelöst. Ammoniak wird in methanolischer Lösung (5,7 ml einer 7 N Lösung in MeOH) eingesetzt. Man rührt mindestens zwölf Stunden bei einer Temperatur von 35 – 40 °C. Nachdem das Aryldiazonoylchlorid vollständig umgesetzt ist (DC-Kontrolle) wird der gesamte Reaktionsansatz unter kräftigem Rühren in ca. 300 ml kaltes Wasser eingegossen. Das Produkt fällt in der Regel sofort - teilweise auch erst nach Stehenlassen - als Feststoff aus. Anschließend wird abgesaugt und aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Die *N*¹-unsubstituierten-*N*²-Arylamidrazone sind, besonders wenn sie nicht ganz rein vorliegen, nicht stabil. Man bewahrt sie daher unter Sauerstoffausschluß auf.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 für die Synthese von 5,5-Dialkyl-1-aryl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazolen 13 (AV 4)

10 mmol des entsprechenden Amidrazons **9** und 0,1 g *para*-Toluolsulfonsäure werden in etwa 50 ml des Ketons bzw. Aldehyds gelöst. Der Ansatz wird solange unter Rückfluß erhitzt, bis der Ausgangsstoff dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar ist. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Erfolgt die Umsetzung sehr langsam und unvollständig werden zusätzlich 50 ml Ethanol oder Toluol in das Reaktionsgefäß gegeben und weiter unter Rückfluß erhitzt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 für die Synthese von 1-Aryl-1H-1,2,4-triazolen 14 (AV 5)

10 mmol des entsprechenden Amidrazons **9** werden in 50 ml Ethanol gelöst. Diese Lösung wird mit 15 mmol Formaldehyd (1,2 ml einer 37 %-igen Lösung) und 0,1 g *para*-Toluolsulfonsäure versetzt. Man erhitzt unter Rückfluß bis der Ausgangsstoff dünnschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar ist. Dann entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum, nimmt den Rückstand in Methanol auf und läßt im Tiefkühlschrank auskristallisieren. Es fällt zunächst ein Gemisch aus 1H-1,2,4-Triazol und der entsprechenden 4,5-Dihydroverbindung aus. Durch Stehenlassen des abgesaugten Rohproduktes an der Luft oxidiert dieses zur gewünschten Verbindung (DC-Kontrolle). Zum Reinigen des Produktes kristallisiert man aus dem angegebenen Lösungsmittel um.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 für die Synthese von arylkondensierten Dihydro-[1,2,4]-triazepinen 15 (AV 6)

10 mmol des entsprechenden Amidrazons **9**, 15 mmol Formaldehyd (1,2 ml einer 37 %-igen Lösung) und 0,1 g *para*-Toluolsulfonsäure werden in 50 ml Ethanol unter Rückfluß erhitzt. Nach kurzer Zeit färbt sich der Reaktionsansatz intensiv gelb. Man erhitzt noch weitere 30 Minuten. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus. Man saugt ab und kristallisiert aus dem angegebenen Lösungsmittel um.

2.4.3 Synthetisierte Verbindungen

2.4.3.1 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindungen

Nach Literaturvorschriften wurden die Verbindungen **3a** [Bülow 1924], **3b,c** [Kettrup 1970] und **3d** [Frohberg 2002 (2)] synthetisiert.

2-Chlor-N-(4-fluorphenyl)-3-oxobutanamid (3e): (publiziert in [Frohberg 2001 (2)]) Die Verbindung wurde aus 4-Fluoranilin (11,1 g, 100 mmol), Acetessigester (39 g, 300 mmol) und Sulfurylchlorid (13,4 g, 100 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 1 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Ethanol wurden 8,0 g (35 %) der Verbindung **3e** als weiße Nadeln erhalten. Fp: 126-127 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,29 (s, 3H, CH₃), 5,33 (s, 1H, CHCl), 10,71 (s, 1H, CONH), 7,2-7,6 (4H, Ar-H). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] = 26,9 (1C, CH₃), 63,8 (1C, CH), 115,8-159,1 (6C, Ar-C), 163,2 (1C, CONH), 197,5 (1C, COCH₃). IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3236 (NH), 1728, 1647 (C=O). MS m/z: 229 ([M]⁺, 25), 111 (100). Elementaranalyse C₁₀H₉NO₂ClF (229,6) ber.: C 52,30 %, H 3,95 %, N 6,10 %, Cl 15,44 %, F 8,27 %; gef.: C 52,11 %, H 3,95 %, N 6,12 %, Cl 15,40 %, F 7,92 %.

2.4.3.2 Carbonsäurearylhyaazonoylchloride

Nach Literaturvorschriften wurden die Verbindungen **4a,c,m,n,o** [Frohberg 1995] synthetisiert.

2-Anilino-N-(2-fluorphenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4b): (publiziert in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-N-phenyl-3-oxobutanamid (**3a**) (4,2 g, 20 mmol) und 2-Fluoranilin (2,2 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,1 g (70 %) der Verbindung **4b** als feine, hellgelbe Nadeln erhalten. Fp: 129-134 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,02-7,92 (9H, Ar-H), 10,14 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 115,6-152,2 (12C, Ar-C). MS m/z: 291 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₁N₃OCIF (291,7) ber.: C 57,65 %, H 3,80 %, N 14,40 %, Cl 12,15 %, F 6,51 %; gef.: C 57,26 %, H 3,67 %, N 14,44 %, Cl 12,16 %, F 6,41 %.

2-Anilino-N-(3-fluorphenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4d): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-N-phenyl-3-oxobutanamid (**3a**) (4,2 g, 20 mmol) und 3-Fluoranilin (2,2 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,8 g (82 %) der Verbindung **4d** als weiße Nadeln erhalten. Fp: 168-170 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 6,7-7,7 (9H, Ar-H), 10,45 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 101,9-163,4 (12C, Ar-C). MS m/z: 291 ([M]⁺, 72), 93 (100). Elementaranalyse C₁₄H₁₁N₃OCIF (291,7) ber.: C 57,65 %, H 3,80 %, N 14,40 %, Cl 12,15 %, F 6,51 %; gef.: C 57,82 %, H 3,78 %, N 14,30 %, Cl 12,06 %, F 6,52 %.

2-Anilino-2-oxo-*N*-[2-oxo-4-(trifluormethyl)-2*H*-chromen-7-yl]ethanhydrazonoylchlorid (4e):

Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-*N*-phenyl-3-oxobutanamid (**3a**) (4,2 g, 20 mmol) und 7-Amino-4-(trifluormethyl)-2*H*-chromen-2-on (4,6 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Aceton wurden 2,5 g (30 %) der Verbindung **4e** als feine, hellgelbe Nadeln erhalten. Fp: 231-236 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,1-7,8 (8H, Ar-*H*), 10,90 (s, 1H, CONH), 6,81 (s, 1H, CH=C). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 102,1-156,8 (12C, Ar-C), 155,8 (1C, C=O), 113,5 (1C, CCF₃), 112,8 (1C, CF₃). MS m/z: 409 ([M]⁺, 78), 93 (100). Elementaranalyse C₁₈H₁₁N₃O₃ClF₃ (409,8) ber.: C 52,76 %, H 2,70 %, N 10,25 %, Cl 8,65 %, F 13,91 %; gef.: C 52,39 %, H 2,67 %, N 9,99 %, Cl 8,61 %, F 13,97 %.

***N*-(2-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4f):** (publiziert

in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3b**) (4,9 g, 20 mmol) und 2-Chloranilin (2,5 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,2 g (60 %) der Verbindung **4f** als schwach gelbe Nadeln erhalten. Fp: 170-172 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,0-7,9 (8H, Ar-*H*), 10,00 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 117,0-137,7 (12C, Ar-C). MS m/z: 341 ([M]⁺, 50), 127 (100). Elementaranalyse C₁₄H₁₀N₃OCl₃ (342,6) ber.: C 49,08 %, H 2,94 %, N 12,26 %, Cl 31,04 %; gef.: C 48,63 %, H 2,81 %, N 12,20 %, Cl 31,05 %.

***N*-(2-Chlorphenyl)-2-[(2-cyanophenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4g):** (publiziert

in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3b**) (4,9 g, 20 mmol) und 2-Cyanoanilin (2,1 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 3,7 g (55 %) der Verbindung **4g** als weiße Kristalle erhalten. Fp: 165-167 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,1-7,8 (8H, Ar-*H*), 9,75 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 113,6-144,6 (12C, Ar-C). MS m/z: 332 ([M]⁺, 20), 297 (100). Elementaranalyse C₁₅H₁₀N₄OCl₂ (333,2) ber.: C 54,08 %, H 3,02 %, N 16,81 %, Cl 21,28 %; gef.: C 54,01 %, H 2,99 %, N 16,77 %, Cl 21,27 %.

***N*-(3-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4h):** (publiziert

in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3b**) (4,9 g, 20 mmol) und 3-Chloranilin (2,5 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform wurden 2,8 g (41 %) der Verbindung **4h** als blaßgelbe Nadeln erhalten. Fp: 206-209 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,0-7,8 (8H, Ar-*H*), 9,89 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 113,5-144,5 (12C, Ar-C). MS m/z: 341 ([M]⁺, 35), 127 (100). Elementaranalyse C₁₄H₁₀N₃OCl₃ (342,6) ber.: C 49,08 %, H 2,94 %, N 12,26 %, Cl 31,04 %; gef.: C 48,63 %, H 2,76 %, N 12,25 %, Cl 30,52 %.

4-(2-{1-Chlor-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethyliden}hydrazino)benzoesäure (4i): Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3b**) (4,9 g, 20 mmol) und

4-Aminobenzoesäure (2,7 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,4 g (63 %) der Verbindung **4i** als weiße Kristalle erhalten. Fp: > 360 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,2-7,9 (8H, Ar-H), 10,78 (s, 1H, CONH), 10,13 (s, 1H, COOH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 114,2-146,7 (12C, Ar-C), 167,2 (1C, COOH). MS m/z: 353 ([M]⁺, 33), 127 (100). Elementaranalyse C₁₅H₁₁N₃O₃Cl₂ (352,2) ber.: C 51,16 %, H 3,15 %, N 11,93 %, Cl 20,13 %; gef.: C 51,11 %, H 3,20 %, N 11,67 %, Cl 19,75 %.

N-(2-Chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4j): (publiziert in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-N-(3-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3c**) (4,9 g, 20 mmol) und 2-Chloranilin (2,5 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Aceton wurden 3,4 g (50 %) der Verbindung **4j** als weiße Plättchen erhalten. Fp: 184-188 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,0-8,0 (8H, Ar-H), 10,33 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 117,2-139,7 (12C, Ar-C). MS m/z: 341 ([M]⁺, 65), 127 (100). Elementaranalyse C₁₄H₁₀N₃OCl₃ (342,6) ber.: C 49,08 %, H 2,94 %, N 12,26 %, Cl 31,04 %; gef.: C 48,98 %, H 2,99 %, N 12,20 %, Cl 30,92 %.

N-(3-Chlorphenyl)-2-[(4-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4k): (publiziert in [Frohberg 2002 (1)]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-N-(4-chlorphenyl)-3-oxobutanamid (**3d**) (4,9 g, 20 mmol) und 3-Chloranilin (2,5 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Aceton wurden 4,4 g (65 %) der Verbindung **4k** als weiße Kristalle erhalten. Fp: 200-204 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,0-7,8 (8H, Ar-H), 10,26 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 113,7-144,6 (12C, Ar-C). MS m/z: 341 ([M]⁺, 35), 127 (100). Elementaranalyse C₁₄H₁₀N₃OCl₃ (342,6) ber.: C 49,08 %, H 2,94 %, N 12,26 %, Cl 31,04 %; gef.: C 48,89 %, H 2,91 %, N 12,28 %, Cl 31,01 %.

N-(3-Acetylphenyl)-2-[(4-fluorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (4l): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Chlor-N-(4-fluorphenyl)-3-oxobutanamid (**3e**) (4,6 g, 20 mmol) und 1-(3-Aminophenyl)ethanon (2,7 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 2 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 4,2 g (63 %) der Verbindung **4l** als kurze, dunkelgelbe Nadeln erhalten. Fp: 232-234 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 6,9-7,8 (8H, Ar-H), 10,15 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 114,4-160,9 (12C, Ar-C). MS m/z: 333 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₆H₁₃N₃O₂ClF (333,7) ber.: C 57,58 %, H 3,92 %, N 12,59 %, Cl 10,62 %, F 5,69 %; gef.: C 57,70 %, H 4,02 %, N 12,51 %, Cl 10,59 %, F 5,78 %.

2-(2-Methyl-2-phenylhydrazino)-2-oxo-N-phenylacetamid (7): (publiziert in [Frohberg 2002 (1)]) Oxalsäure-2-anilid-1-chlorid (**6**) [I.G. Farben 1929] (9,1 g, 50 mmol) und 1-Methyl-1-phenylhydrazin (6,1 g, 50 mmol) werden in trockenem Toluol bei Raumtemperatur gerührt bis dünnschichtchromatographisch kein Ausgangsstoff mehr nachweisbar ist (Laufmittel für DC: Hexan/ Ethylacetat = 5 / 7). Der Feststoff wird abgesaugt, mit Toluol und Methanol gründlich ge-

waschen und aus Chloroform/ Heptan umkristallisiert. Es wurden 6,7 g (50 %) der Verbindung **7** als amorpher Feststoff erhalten. Fp: 230-231 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] = 6,8-7,8 (10H, Ar-H), 3,13 (s, 3H, CH₃), 10,69 (s, 1H, CONH), 11,00 (s, 1H, CONHN). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] = 112,7-149,3 (12C, Ar-C), 39,9 (1C, CH₃), 158,8 (1C, CONH), 159,9 (1C, CONHN). IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3300, 3244 (NH), 1755 (C=O). MS m/z: 269 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₅H₁₅N₃O₂ (269,3) ber.: C 66,90 %, H 5,61 %, N 15,60 %; gef.: C 66,61 %, H 5,63 %, N 15,33 %.

2-Anilino-N-methyl-2-oxo-N-phenylethanhydrazonoylchlorid (8): (publiziert in [Frohberg 2002 (1)]) 2-(2-Methyl-2-phenylhydrazino)-2-oxo-N-phenylacetamid (**7**) (5,4 g, 20 mmol) werden in 35 ml trockenem Toluol suspendiert. Dazu wird langsam Phosphorpentachlorid (4,1 g, 20 mmol) gegeben und vier Stunden bei 60 °C gerührt. Dann wird der Ansatz auf Eis gegossen, mit Ether ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Toluol als Laufmittel gereinigt. Umkristallisation aus Chloroform/ Heptan ergab 2,9 g (50 %) der Verbindung **8** als feine, hellgelbe Nadeln erhalten. Fp: 126-131 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 7,1-7,7 (10H, Ar-H), 10,05 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 7 und δ [ppm] = 117,5-147,9 (12C, Ar-C). MS m/z: 287 ([M]⁺, 45), 105 (100). Elementaranalyse C₁₅H₁₄N₃OCl (287,8) ber.: C 62,61 %, H 4,90 %, N 14,60 %, Cl 12,32 %; gef.: C 62,30 %, H 4,91 %, N 14,52 %, Cl 12,36 %.

2.4.3.3 Amidrazone

Nach Literaturvorschriften wurden die Verbindungen **9a**, **10b** [Frohberg], **9e** [Keilhau 1991], **9n,q** [Frohberg 1995] synthetisiert.

2-Amino-2-[(2-fluorphenyl)hydrazono]-N-phenyl-acetamid (9b): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Anilino-N-(2-fluorphenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4b**) (5,8 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,8 g (52 %) der Verbindung **9b** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 158-160 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,7-7,8 (9H, Ar-H), 9,80 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 115,6-150,9 (12C, Ar-C). MS m/z: 272 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₃N₄OF (272,3) ber.: C 61,76 %, H 4,81 %, N 20,57 %, F 6,98 %; gef.: C 61,62 %, H 4,79 %, N 20,60 %, F 7,01 %.

2-Amino-2-[(3-trifluormethylphenyl)hydrazono]-N-phenyl-acetamid (9c): Die Verbindung wurde aus 2-Anilino-N-(3-trifluormethylphenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4c**) (6,8 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,1 g (64 %) der Verbindung **9c** als braunes Pulver erhalten. Fp: 170-173 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,0-7,8 (9H, Ar-H), 9,91 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 108,4-146,4 (12C, Ar-C). MS m/z: 322 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₅H₁₃N₄OF₃ (322,3) ber.: C 55,90 %, H 4,06 %, N 17,38 %, F 17,68 %; gef.: C 55,85 %, H 4,18 %, N 17,22 %, F 17,52 %.

2-Amino-2-[(3-fluorphenyl)hydrazono]-*N*-phenyl-acetamid (9d): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Anilino-*N*-(3-fluorphenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4d**) (5,8 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,0 g (74 %) der Verbindung **9d** als weißes Pulver erhalten. Fp: 175-178 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,4-7,8 (9H, Ar-*H*), 9,83 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 104,2-164,9 (12C, Ar-*C*). MS m/z: 272 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₃N₄OF (272,3) ber.: C 61,76 %, H 4,81 %, N 20,57 %, F 6,98 %; gef.: C 61,52 %, H 4,96 %, N 20,53 %, F 6,93 %.

2-Amino-*N*-(2-chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (9f): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(2-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4f**) (6,8 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,8 g (75 %) der Verbindung **9f** als weiße Nadeln erhalten. Fp: 172-174 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,8-8,2 (8H, Ar-*H*), 9,96 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 114,6-142,0 (12C, Ar-*C*). MS m/z: 322 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₂N₄OCl₂ (323,2) ber.: C 52,03 %, H 3,74 %, N 17,33 %, Cl 21,94 %; gef.: C 51,64 %, H 3,69 %, N 16,97 %, Cl 21,80 %.

2-Amino-*N*-(2-chlorphenyl)-2-[(2-cyanophenyl)hydrazono]acetamid (9g): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-[(2-Chlorphenyl)amino]-*N*-(2-cyanophenyl)-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4g**) (6,6 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Ethanol wurden 4,7 g (76 %) der Verbindung **9g** als amorpher, schwach gelber Feststoff erhalten. Fp: 222-223 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,8-8,0 (8H, Ar-*H*), 9,71 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 114,9-147,6 (12C, Ar-*C*). MS m/z: 313 ([M]⁺, 10), 135 (100). Elementaranalyse C₁₅H₁₂N₅OCl (313,75) ber.: C 57,43 %, H 3,85 %, N 22,32 %, Cl 11,30 %; gef.: C 57,22 %, H 3,76 %, N 21,94 %, Cl 11,16 %.

2-Amino-*N*-(2-chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (9h): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(3-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonoylchlorid (**4h**) (6,5 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 3,9 g (62 %) der Verbindung **9h** als weiße Kristalle erhalten. Fp: 192-194 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,7-8,2 (8H, Ar-*H*), 9,97 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 111,0-147,3 (12C, Ar-*C*). MS m/z: 322 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₂N₄OCl₂ (323,2) ber.: C 52,03 %, H 3,74 %, N 17,33 %, Cl 21,94 %; gef.: C 52,10 %, H 3,71 %, N 17,23 %, Cl 21,78 %.

4-(2-{1-Amino-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethyliden}hydrazino)benzoesäure (9i): Die Verbindung wurde aus 4-(2-{1-Chlor-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethyliden}hydrazino)benzoesäure (**4i**) (7,0 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan und Dioxan wurden 3,4 g (51 %) der Verbindung **9i** als dunkelgelbe Kristalle erhalten. Fp: 256-260 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und

δ [ppm] = 7,0-8,2 (8H, Ar-*H*), 9,97 (s, 1H, CONH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 111,2-149,3 (12C, Ar-C). MS m/z: 332 ($[\text{M}]^+$, 100). Elementaranalyse $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$ (332,8) ber.: C 54,14 %, H 3,94 %, N 16,83 %, Cl 10,65 %; gef.: C 54,23 %, H 4,12 %, N 16,69 %, Cl 10,47 %.

***N*-(3-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)hydrazono]-2-(2-naphthylamino)acetamid (9j)**: (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(2-Chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonylchlorid (**4j**) (6,8 g, 20 mmol) und 2-Naphthylamin (2,9 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol und Chloroform/ Heptan wurden 5,9 g (66 %) der Verbindung **9j** als kleine, weiße Nadeln erhalten. Fp: 198-200 °C. ^1H -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,8-7,9 (15H, Ar-*H*), 10,44 (s, 1H, CONH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 112,0-140,2 (22C, Ar-C). MS m/z: 448 ($[\text{M}]^+$, 100). Elementaranalyse $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{OCl}_2$ (449,3) ber.: C 64,16%, H 4,04%, N 12,47%, Cl 15,78%; gef.: C 64,50%, H 4,05%, N 12,26%, Cl 15,36%.

Für die Reaktionskontrolle mittels DC wurde als Laufmittel Toluol verwendet.

2-Amino-*N*-(4-chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (9k): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(3-Chlorphenyl)-2-[(4-chlorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonylchlorid (**4k**) (6,8 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,7 g (74 %) der Verbindung **9k** als weißer, amorpher Feststoff erhalten. Fp: 188-189 °C. ^1H -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,7-7,8 (8H, Ar-*H*), 9,99 (s, 1H, CONH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 111,1-147,2 (12C, Ar-C). MS m/z: 322 ($[\text{M}]^+$, 100). Elementaranalyse $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{OCl}_2$ (323,2) ber.: C 52,03 %, H 3,74 %, N 17,33 %, Cl 21,94 %; gef.: C 52,05 %, H 3,67 %, N 17,01 %, Cl 21,37 %.

2-[(3-Acetylphenyl)hydrazono]-2-amino-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (9l): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(3-Acetylphenyl)-2-[(4-fluorphenyl)amino]-2-oxoethanhydrazonylchlorid (**4l**) (6,6 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 5,4 g (86 %) der Verbindung **9l** als gelber Feststoff erhalten. Fp: 232-234 °C. ^1H -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,1-7,8 (8H, Ar-*H*), 9,92 (s, 1H, CONH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 111,9-159,7 (12C, Ar-C). MS m/z: 314 ($[\text{M}]^+$, 100). Elementaranalyse $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}$ (314,3) ber.: C 61,14 %, H 4,81 %, N 17,82 %, F 6,04 %; gef.: C 60,56 %, H 4,86 %, N 17,62 %, F 6,22 %.

Ethyl-2-amino-2-phenylhydrazonoacetat (9m): Die Verbindung wurde aus Ethyl-chlor-phenyl-hydrazonoacetat (**4m**) (4,5 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 1,0 g (48 %) der Verbindung **9m** als grün-gelbe Kristalle erhalten. Fp: 124-126 °C. ^1H -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,7-7,2 (5H, Ar-*H*), 1,27 (t, 3H, CH_3), 4,21 (q, 2H, CH_2). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 112,4-145,9 (6C, Ar-C), 60,9 (1C, CH_2), 14,0 (1C, CH_3). MS m/z: 207 ($[\text{M}]^+$, 100). Elementaranalyse $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (207,3) ber.: C 57,96 %, H 6,32 %, N 20,27 %; gef.: C 57,83 %, H 6,36 %, N 20,06 %.

***N*²-(4-Chlorphenyl)-*N*¹-(1-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (9o):** Die Verbindung wurde aus *N*-(4-Chlorphenyl)-2-oxopropanhydrazonoylchlorid (**4n**) (4,6 g, 20 mmol) und 1-Naphthylamin (2,9 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 6,1 g (91 %) der Verbindung **9o** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 135-136 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,2-8,3 (11H, Ar-*H*), 2,49 (s, 3H CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 110,2-143,6 (16C, Ar-*C*), 25,4 (1C, CH₃). MS m/z: 337 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₉H₁₆N₃OCl (337,8) ber.: C 67,56 %, H 4,77 %, N 12,44 %, Cl 10,49 %; gef.: C 67,22 %, H 4,57 %, N 12,09 %, Cl 10,44 %.

***N*²-(4-Chlorphenyl)-*N*¹-(2-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (9p):** Die Verbindung wurde aus *N*-(4-Chlorphenyl)-2-oxopropanhydrazonoylchlorid (**4n**) (4,6 g, 20 mmol) 2-Naphthylamin (2,9 g, 20 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 4,6 g (68 %) der Verbindung **9p** als gelb-braune Kristalle erhalten. Fp: 140-142 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,1-8,0 (11H, Ar-*H*), 2,52 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 109,4-143,1 (16C, Ar-*C*), 24,9 (1C, CH₃). MS m/z: 337 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₉H₁₆N₃OCl (337,8) ber.: C 67,56 %, H 4,77 %, N 12,44 %, Cl 10,49 %; gef.: C 67,18 %, H 4,76 %, N 12,21 %, Cl 10,54 %.

Methyl-6-amino-6-[(4-fluorphenyl)hydrazono]-5-oxohexanoat (9r): Die Verbindung wurde aus Methyl-6-chlor-6-[(4-fluorphenyl)hydrazono]-5-oxohexanoat (**4o**) (6,0 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 3,8 g (65 %) der Verbindung **9r** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 127-129 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,0-7,2 (4H, Ar-*H*), 1,78 (quint., 2H, CH₂), 2,33 (t, 2H, CH₂), 2,88 (t, 2H, CH₂), 3,56 (s, 3H, CH₃O). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 114,9-158,8 (6C, Ar-*C*), 21,4 (1C, CH₂), 34,0 (1C, CH₂), 35,4 (1C, CH₂), 52,6 (1C, CH₃O). MS m/z: 281 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₃H₁₆N₃O₃F (281,3) ber.: C 55,51 %, H 5,73 %, N 14,93 %, F 6,75 %; gef.: C 55,60 %, H 5,57 %, N 14,98 %, F 6,86 %.

Methyl-6-amino-6-[(3-nitrophenyl)hydrazono]-5-oxohexanoat (9s): Die Verbindung wurde aus Methyl-6-chlor-6-[(3-nitrophenyl)hydrazono]-5-oxohexanoat (**4p**) (6,6 g, 20 mmol) und Ammoniak nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan wurden 3,4 g (56 %) der Verbindung **9s** als rote Kristalle erhalten. Fp: 147-149 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 7,4-8,0 (4H, Ar-*H*), 3,57 (s, 3H, CH₃O), 2,93 (t, 2H, CH₂CO), 2,34 (t, 2H, CH₂COO), 1,80 (quint., 2H, CH₂). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 107,6-150,4 (6C, Ar-*C*), 52,6 (1C, CH₃O), 35,6 (1C, CH₂CO), 34,0 (1C, CH₂COO), 21,2 (1C, CH₂). MS m/z: 308 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₃H₁₆N₄O₅ (308,4) ber.: C 50,64 %, H 5,23 %, N 18,17 %; gef.: C 50,51 %, H 5,19 %, N 18,14 %.

2-[[2-Oxo-4-(trifluormethyl)-2*H*-chromen-7-yl]hydrazono]-2-piperidyl-*N*-phenylacetamid (10a): Die Verbindung wurde aus 2-Anilino-2-oxo-*N*-[2-oxo-4-(trifluormethyl)-2*H*-chromen-7-yl]ethanhydrazonoylchlorid (**4e**) (8,2 g, 20 mmol) und Piperidin (4,0 ml, 40 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Heptan wurden 6,1 g (67 %) der Verbindung **10a** als orangefarbene Kristalle erhalten. Fp: 215-218 °C. ¹H-NMR

(DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,5-8,6 (8H, Ar-*H*), 11,54 (s, 1H, CONH), 6,48 (s, 1H, CH=C), -0,02 (s, 6H, 3CH₂), 3,31 (s, 4H, 2CH₂). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 120,3-156,6 (12C, Ar-C), 23,4 (1C, CH₂), 25,9 (2C, 2CH₂), 51,3 (2C, 2CH₂), 141,0 (1C, CCF₃), 159,6 (1C, C=O), 110,8 (1C, C=C), 125,1, 113,5, 107,7, 102,8 (1C, CF₃). MS m/z: 458 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₂₃H₂₁N₄O₃F₃ (458,5) ber.: C 60,26 %, H 4,61 %, N 12,22 %, F 12,43 %; gef.: C 59,93 %, H 4,51 %, N 11,83 %, F 11,73 %.

2-[Methyl(phenyl)hydrazono]-*N*-phenyl-2-piperidin-1-ylacetamid (11): Die Verbindung wurde aus 2-Anilino-2-oxo-*N*-phenylethanhydrazonylchlorid (**8**) (5,7 g, 20 mmol) und Piperidin (4,0 ml, 40 mmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Heptan wurden 4,6 g (68 %) der Verbindung **11** als weiße Kristalle erhalten. Fp: 158-160 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,8-7,7 (10H, Ar-*H*), 7,06 (s, 1H, CONH), 3,08 (s, 3H, CH₃), 1,68 (s, 6H, 3CH₂), 3,51 (s, 4H, 2CH₂). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 115,2-138,1 (16C, Ar-C), 46,0 (1C, CH₃), 23,9 (1C, CH₂), 24,9 (2C; 2CH₂), 42,3 (2C, 2CH₂). MS m/z: 336 ([M]⁺, 80), 84 (100). Elementaranalyse C₂₀H₂₄N₄O (336,4) ber.: C 71,40 %, H 7,19 %, N 16,65 %; gef.: C 71,08 %, H 7,21 %, N 16,39 %.

***N*-(2-Chlorphenyl)-2-[(hydroxymethyl)(phenyl)hydrazono]-2-piperidin-1-ylacetamid (12):** Die Verbindung wurde aus *N*-(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-piperidin-1-ylacetamid (**10b**) (3,6 g, 10 mmol) und Formaldehyd analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 5 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 3,6 g (92 %) der Verbindung **12** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 128-130 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 6,9-7,6 (9H, Ar-*H*), 7,26 (s, 1H, CONH), 1,60 (s, 6H, 3CH₂), 3,25 (s, 4H, 2CH₂), 5,22 (2H, CH₂OH). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 8 und δ [ppm] = 114,7-147,4 (12C, Ar-C), 24,0 (1C, CH₂), 24,7 (2C, 2CH₂), 48,2 (2C, 2CH₂), 63,2 (1C, CH₂OH). MS m/z: 368 ([M]⁺-H₂O, 100). Elementaranalyse C₂₀H₂₃N₄O₂Cl (386,9) ber.: C 62,09 %, H 5,99 %, N 14,48 %, Cl 9,16 %; gef.: C 62,92 %, H 5,64 %, N 14,91 %, Cl 9,13 %.

2.4.3.4 Heterocyclische Verbindungen

2.4.3.4.1 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole

4,5,5-Trimethyl-*N*,1-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13a): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Methylamino-*N*-phenyl-2-phenylhydrazonoacetamid (**9a**) (2,7 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,3 g (42 %) der Verbindung **13a** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 100-102 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,9-7,7 (10H, Ar-*H*), 10,15 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 117,4-143,8 (12C, Ar-C). MS m/z: 308 ([M]⁺, 11), 292 (100). Elementaranalyse C₁₈H₂₀N₄O (308,4) ber.: C 70,11 %, H 6,53 %, N 18,16 %; gef.: C 69,79 %, H 6,40 %, N 17,95 %.

1-(3-Fluorphenyl)-5,5-dimethyl-N-phenyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13b): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Amino-2-[(3-fluorphenyl)hydrazono]-N-phenyl-acetamid (**9d**) (2,7 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,2 g (70 %) der Verbindung **13b** als gelbe Plättchen erhalten. Fp: 172-175 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,6-7,8 (9H, Ar-H), 10,06 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 102,4-164,4 (12C, Ar-C). MS m/z: 312 ([M]⁺, 18), 204 (100). Elementaranalyse C₁₇H₁₇N₄OF (312,3) ber.: C 65,37 %, H 5,48 %, N 17,93 %, F 6,08 %; gef.: C 65,27 %, H 5,59 %, N 17,91 %, F 5,96 %.

1-(4-Fluorphenyl)-5,5-dimethyl-N-phenyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13c): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Amino-2-[(4-fluorphenyl)hydrazono]-N-phenyl-acetamid (**9e**) (2,7 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Heptan wurden 1,7 g (54 %) der Verbindung **13c** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 119-123 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,0-7,8 (9H, Ar-H), 10,05 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 114,9-159,6 (12C, Ar-C). MS m/z: 312 ([M]⁺, 18), 204 (100). Elementaranalyse C₁₇H₁₇N₄OF (312,3) ber.: C 65,37 %, H 5,48 %, N 17,93 %, F 6,08 %; gef.: C 65,44 %, H 5,50 %, N 17,70 %, F 6,36 %.

N-(2-Chlorphenyl)-1-(3-chlorphenyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13d): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Amino-N-(2-chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (**9h**) (3,2 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus 2-Propanol wurden 2,6 g (72 %) der Verbindung **13d** als dunkelgelbe Kristalle erhalten. Fp: 149-149 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,7-7,8 (8H, Ar-H), 9,73 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 113,4-144,8 (12C, Ar-C). MS m/z: 362 ([M]⁺, 7), 220 (100). Elementaranalyse C₁₇H₁₆N₄OCl₂ (363,3) ber.: C 56,21 %, H 4,44 %, N 15,42 %, Cl 19,52 %; gef.: C 56,32 %, H 4,48 %, N 15,72 %, Cl 19,45 %.

4-(3-[(2-Chlorphenyl)amino]carbonyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzoesäure (13e): Die Verbindung wurde aus 4-(2-{1-Amino-2-[(2-chlorphenyl)amino]-2-oxoethyliden}hydrazino)benzoesäure (**9i**) (3,3 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/ Heptan und Aceton wurden 3,3 g (89 %) der Verbindung **13e** als dunkelgelbe Kristalle erhalten. Fp: 203-206 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,1-7,9 (8H, Ar-H), 9,70 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 113,4-146,4 (12C, Ar-C). MS m/z: 372 ([M]⁺, 8), 230 (100). Elementaranalyse C₁₈H₁₇N₄O₃Cl (372,8) ber.: C 57,99 %, H 4,59 %, N 15,02 %, Cl 9,51 %; gef.: C 57,74 %, H 4,68 %, N 15,65 %, Cl 9,56 %.

1-(3-Chlorphenyl)-N-(4-chlorphenyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13f): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Amino-N-(4-chlorphenyl)-2-[(3-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (**9k**) (3,2 g, 10 mmol) und Aceton nach der allge-

meinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,3 g (36 %) der Verbindung **13f** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 175-177 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,8-7,8 (8H, Ar-H), 10,24 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 113,3-144,8 (12C, Ar-C). MS m/z: 362 ([M]⁺, 9), 220 (64). Elementaranalyse C₁₇H₁₆N₄OCl₂ (363,3) ber.: C 56,21 %, H 4,44 %, N 15,42 %, Cl 19,52 %; gef.: C 56,32 %, H 4,33 %, N 15,41 %, Cl 19,32 %.

1-(3-Acetylphenyl)-N-(4-fluorphenyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (13g): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-[(3-Acetylphenyl)hydrazono]-2-amino-N-(4-fluorphenyl)acetamid (**9l**) (3,1 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,8 g (50 %) der Verbindung **13g** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 146-148 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,1-7,8 (8H, Ar-H), 10,22 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 114,9-160,9 (12C, Ar-C). MS m/z: 354 ([M]⁺, 13), 228 (100). Elementaranalyse C₁₉H₁₉N₄O₂F (354,4) ber.: C 64,40 %, H 5,40 %, N 15,81 %, F 5,36 %; gef.: C 64,23 %, H 5,41 %, N 15,73 %, F 5,38 %.

Ethyl-5,5-dimethyl-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxylat (13h): Die Verbindung wurde aus Ethyl-2-amino-2-phenylhydrazonoacetat (**9m**) (2,1 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,9 g (78 %) der Verbindung **13h** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 135-139 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,8-7,3 (5H, Ar-H), 1,72 (t, 3H, CH₃), 4,25 (quint., 2H, CH₂). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 116,1-143,1 (6C, Ar-C), 14,0 (1C, CH₃), 61,1 (1C, CH₂). MS m/z: 247 ([M]⁺, 20), 186 (100). Elementaranalyse C₁₃H₁₇N₃O₂ (247,3) ber.: C 63,14 %, H 6,92 %, N 16,99 %; gef.: C 62,98 %, H 6,86 %, N 16,84 %.

Ethyl-1-(4-chlorphenyl)-5-methyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-carboxylat (13i): Die Verbindung wurde aus Ethyl-2-amino-2-[(4-chlorphenyl)hydrazono]acetat (**9n**) (2,4 g, 10 mmol) und Acetaldehyd analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 unter Verwendung von Acetaldehyd (0,8 ml, 15 mmol) in 50 ml Ethanol synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,2 g (45 %) der Verbindung **13i** als gelbe Kristalle erhalten. Fp: 116-118 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,9-7,5 (4H, Ar-H), 1,28 (t, 3H, CH₃), 4,25 (q, 2H, CH₂), 5,76 (q, 1H, CH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 114,5-142,9 (6C, Ar-C), 13,9 (1C, CH₃), 61,3 (1C, CH₂). MS m/z: 267 ([M]⁺, 35), 206 (100). Elementaranalyse C₁₂H₁₄N₃O₂Cl (267,7) ber.: C 53,84 %, H 5,27 %, N 15,69 %, Cl 13,24 %; gef.: C 53,57 %, H 5,37 %, N 15,53 %, Cl 13,24 %.

Das entsprechende 1H-1,2,4-Triazol konnte dünnschichtchromatographisch nachgewiesen aber nicht isoliert werden.

1-[1-(4-Chlorphenyl)-5,5-dimethyl-4-(1-naphthyl)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]ethanon (13j): Die Verbindung wurde aus N²-(4-Chlorphenyl)-N¹-(1-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (**9o**) (3,4 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,5 g (66 %) der Verbindung **13j** als zitronengelbe

Kristalle erhalten. Fp: 129-132 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,3-7,9 (11H, Ar-H), 2,34 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 120,14-142,7 (16C, Ar-C), 26,1 (1C, CH₃). MS m/z: 377 ([M]⁺, 9), 362 (100). Elementaranalyse C₂₂H₂₀N₃OCl (377,9) ber.: C 69,93 %, H 5,33 %, N 11,12 %, Cl 9,38 %; gef.: C 70,04 %, H 5,17 %, N 11,06 %, Cl 9,33 %.

Die dünnstschichtchromatographische Reaktionskontrolle erfolgte mit dem Laufmittel Toluol.

1-[1-(4-Chlorphenyl)-5,5-dimethyl-4-(2-naphthyl)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]ethanon (13k): Die Verbindung wurde aus *N*²-(4-Chlorphenyl)-*N*¹-(2-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (**9p**) (3,4 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,0 g (54 %) der Verbindung **13k** als zitronengelbe Kristalle erhalten. Fp: 174-176 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,3-7,9 (11H, Ar-H), 2,44 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 119,2-141,2 (16C, Ar-C), 26,5 (1C, CH₃). MS m/z: 377 ([M]⁺, 8), 362 (100). Elementaranalyse C₂₂H₂₀N₃OCl (377,9) ber.: C 69,93 %, H 5,33 %, N 11,12 %, Cl 9,38 %; gef.: C 70,08 %, H 5,57 %, N 11,16 %, Cl 9,32 %.

Methyl-5-(1,4-diphenyl-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl)-5-oxopentanoat (13l): Die Verbindung wurde aus Methyl-6-anilino-5-oxo-6-phenylhydrazonohexanoat (**9q**) (3,4 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,8 g (48 %) der Verbindung **13l** als orangefarbene Kristalle erhalten. Fp: 45-48 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 6,8-7,4 (4H, Ar-H), 3,58 (s, 3H, CH₃), 3,33 (t, 2H, CH₂COO), 1,76 (q, 2H, CH₂), 2,93 (t, 2H, CH₂CO). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 117,8-142,0 (6C, Ar-C), 51,2 (1C, CH₃O), 37,1 (1C, CH₂COO), 32,4 (1C, CH₂CO), 19,2 (1C, CH₂), 172,9 (1C, COO). MS m/z: 379 ([M]⁺, 5), 364 (100). Elementaranalyse C₂₂H₂₅N₃O₃ (379,5) ber.: C 69,63 %, H 6,64 %, N 11,07 %; gef.: C 69,99 %, H 6,53 %, N 11,03 %.

Methyl-5-[1-(4-fluorphenyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]-5-oxopentanoat (13m): Die Verbindung wurde aus Methyl-6-amino-6-[(4-fluorphenyl)hydrazono]-5-oxohexanoat (**9r**) (2,8 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,0 g (30 %) der Verbindung **13m** als orangefarbene Kristalle erhalten. Fp: 70-74 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,1-7,3 (4H, Ar-H), 3,58 (s, 3H, CH₃), 2,84 (t, 2H, CH₂COO), 1,81 (quint, 2H, CH₂), 2,35 (t, 2H, CH₂CO). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 115,2-158,4 (6C, Ar-C), 51,2 (1C, CH₃O), 35,9 (1C, CH₂COO), 32,4 (1C, CH₂CO), 19,4 (1C, CH₂), 172,8 (1C, COO). MS m/z: 321 ([M]⁺, 18), 274 (100). Elementaranalyse C₁₆H₂₀N₃O₃F (321,4) ber.: C 59,80 %, H 6,27 %, N 13,07 %, F 5,91 %; gef.: C 59,35 %, H 6,53 %, N 12,98 %, F 5,99 %.

Methyl-5-[1-(3-nitrophenyl)-5,5-dimethyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]-5-oxopentanoat (13n): Die Verbindung wurde aus Methyl-6-amino-6-(3-nitrophenyl)hydrazono-5-oxohexanoat (**9s**) (3,1 g, 10 mmol) und Aceton nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 4 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,7 g (77 %) der Verbindung **13n** als dunkelrote Kristalle erhalten. Fp: 137-139 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 7,5-8,0 (4H, Ar-H), 3,58 (s, 3H, CH₃), 2,90 (t, 2H, CH₂COO), 1,82 (quint, 2H, CH₂), 2,37 (t, 2H, CH₂CO). ¹³C-NMR

(DMSO- d_6): s. Tab. 9 und δ [ppm] = 109,1-147,9 (6C, Ar-C), 51,2 (1C, CH₃O), 36,1 (1C, CH₂COO), 32,4 (1C, CH₂CO), 19,0 (1C, CH₂), 173,2 (1C, COO). MS m/z: 348 ([M]⁺, 24), 301 (100). Elementaranalyse C₁₆H₂₀N₄O₅ (348,4) ber.: C 55,16 %, H 5,78 %, N 16,08 %; gef.: C 55,19 %, H 5,73 %, N 15,95 %.

2.4.3.4.2 1H-1,2,4-Triazole

N,1-Bis-(2-chlorphenyl)-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (14a): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-Amino-*N*-(2-chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)hydrazono]acetamid (**9f**) (3,2 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 5 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus 2-Propanol wurden 1,4 g (42 %) der Verbindung **14a** als weißes Pulver erhalten. Fp: 132-134 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 7,2-8,0 (8H, Ar-*H*), 10,07 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 124,7-134,1 (12C, Ar-C). MS m/z: 332 ([M]⁺, 11), 297 (100). Elementaranalyse C₁₅H₁₀N₄OCl₂ (333,2) ber.: C 54,08 %, H 3,11 %, N 16,81 %, Cl 21,28 %; gef.: C 53,46 %, H 3,14 %, N 16,99 %, Cl 20,96 %.

N-(2-Chlorphenyl)-1-(2-cyanophenyl)-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (14b): Die Verbindung wurde aus 2-Amino-*N*-(2-chlorphenyl)-2-[(2-cyanophenyl)hydrazono]acetamid (**9g**) (3,1 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 5 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus 2-Propanol und MeOH wurden 1,6 g (50 %) der Verbindung **14b** als weißes Pulver erhalten. Fp: 137-140 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 7,1-7,9 (8H, Ar-*H*), 10,08 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 120,3-137,7 (12C, Ar-C). MS m/z: 323 ([M]⁺, 10), 288 (100). Elementaranalyse C₁₆H₁₀N₅OCl₂ (323,7) ber.: C 59,36 %, H 3,11 %, N 21,63 %, Cl 10,95 %; gef.: C 59,14 %, H 3,15 %, N 21,88 %, Cl 10,74 %.

1-(3-Acetylphenyl)-*N*-(4-fluorphenyl)-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamid (14c): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus 2-[(3-Acetylphenyl)hydrazono]-2-amino-*N*-(4-fluorphenyl)acetamid (**9l**) (3,1 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 5 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,9 g (58 %) der Verbindung **14c** als weiße Nadeln erhalten. Fp: 190-192 °C. ¹H-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 7,2-8,5 (8H, Ar-*H*), 10,65 (s, 1H, CONH), 2,68 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO- d_6): s. Tab. 10 und δ [ppm] = 115,2-138,4 (12C, Ar-C), 197,4 (1C, CO), 26,9 (1C, CH₃). MS m/z: 324 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₇H₁₃N₄O₂F (324,3) ber.: C 62,96 %, H 4,04 %, N 17,27 %, F 5,86 %; gef.: C 62,26 %, H 3,99 %, N 17,05 %, F 5,84 %.

2.4.3.4.3 Naphthotriazepine

2-(2-Chlorphenyl)-*N*-(3-chlorphenyl)-2,5-dihydro-1H-naphtho[2,1-e][1,2,4]triazepin-4-carboxamid (15a): (publiziert in [Drutkowski 2002]) Die Verbindung wurde aus *N*-(3-Chlorphenyl)-2-[(2-chlorphenyl)hydrazono]-2-(2-naphthylamino)acetamid (**9j**) (4,5 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 6 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol/ Chloroform wurden 2,0 g (43 %) der Verbindung **15a** als hellgelbe Nadeln erhalten. Fp:

155-156 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 7,2-8,1 (14H, Ar-H), 10,12 (s, 1H, CONH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 120,3-149,1 (22C, Ar-C). MS m/z: 460 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₂₅H₁₈N₄OCl₂ (461,4) ber.: C 65,09 %, H 3,93 %, N 12,14 %, Cl 15,37 %; gef.: C 64,76 %, H 3,80 %, N 12,12 %, Cl 15,25 %.

1-[2-(4-Chlorphenyl)-2,5-dihydro-1H-naphtho[2,1-e][1,2,4]triazepin-4-yl]ethanon (15b): Die Verbindung wurde aus N²-(4-Chlorphenyl)-N¹-(2-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (**9p**) (6,7 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 6 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 2,0 g (58 %) der Verbindung **15b** als orangefarbene Nadeln erhalten. Fp: 193-195 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 7,4-8,2 (10H, Ar-H), 2,51 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 116,9-140,6 (16C, Ar-C), 24,5 (1C, CH₃). MS m/z: 349 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₂₀H₁₆N₃OCl (349,8) ber.: C 68,67 %, H 4,61 %, N 12,01 %, Cl 10,13 %; gef.: C 68,72 %, H 4,57 %, N 11,69 %, Cl 10,14 %.

1-[4-(4-Chlorphenyl)-4,5-dihydro-1H-naphtho[1,2-e][1,2,4]triazepin-2-yl]ethanon (15c): Die Verbindung wurde aus N²-(4-Chlorphenyl)-N¹-(1-naphthyl)-2-oxopropanhydrazonamid (**9o**) (3,4 g, 10 mmol) und Formaldehyd nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 6 synthetisiert. Nach Umkristallisieren aus Ethanol wurden 2,7 g (77 %) der Verbindung **15c** als orangefarbene Nadeln erhalten. Fp: 187-190 °C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 7,3-7,9 (10H, Ar-H), 2,56 (s, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-d₆): s. Tab. 11 und δ [ppm] = 116,7-136,2 (16C, Ar-C), 23,9 (1C, CH₃). MS m/z: 349 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₂₀H₁₆N₃OCl (349,8) ber.: C 68,67 %, H 4,61 %, N 12,01 %, Cl 10,13 %; gef.: C 67,96 %, H 4,62 %, N 12,08 %, Cl 10,20 %.

2.4.3.4.4 1,6-Dihydro-1,2,4-triazin

Ethyl-1-(4-chlorphenyl)-5-methyl-6-methylen-1,6-dihydro-1,2,4-triazin-3-carboxylat (16): 10 mmol Ethyl-2-amino-2-[(4-chlorphenyl)hydrazono]acetat (**9n**) (2,4 g, 10 mmol) und frisch destilliertes Diacetyl (1 ml, 10 mmol) werden in 50 ml Ethanol gelöst. Es werden 0,1 g *para*-Toluolsulfonsäure zu dem Reaktionsansatz gegeben. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das ausgefallene Produkt abgesaugt und aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 0,9 g (30 %) der Verbindung **16** als orangefarbene Nadeln erhalten. Fp: 190-193 °C. ¹H-NMR (Benzen-d₆): δ [ppm] = 6,8-7,3 (4H, Ar-H), 4,15 (q, 2H, CH₂), 1,02 (t, 3H, CH₃), 1,81 (s, 3H, =CH₃), 3,67/ 3,87 (2H, =CH₂). ¹³C-NMR (Benzen-d₆): δ [ppm] = 124,6-129,8 (6C, Ar-C), 61,1 (1C, CH₂), 14,1 (1C, CH₃), 83,9 (1C, =CH₂), 22,0 (1C, =CH₃), 142,8 (1C, C=N), 161,5 (1C, C=O), 130,1 (2C, =C-C). IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3444 (NH), 1725 (C=O). MS m/z: 290 ([M]⁺, 100). Elementaranalyse C₁₄H₁₄N₃O₂Cl (291,8) ber.: C 57,64 %, H 4,84 %, N 14,40 %, Cl 12,15 %; gef.: C 57,50 %, H 4,76 %, N 14,31 %, Cl 11,90 %.

3 Entwicklung eines Vollbluttestsystems

3.1 Einleitung

Um die im Syntheseteil beschriebenen potentiellen Hemmstoffe der Arachidonsäurekaskade und zahlreiche in den letzten Jahren am Institut synthetisierte Verbindungen auf ihre Wirksamkeit gegenüber den Enzymen LOX und COX zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Testsystem entwickelt und genutzt werden.

Die folgenden Anforderungen wurden an die zu erstellende Methode gestellt:

- Testbedingungen möglichst nahe an den Gegebenheiten im menschlichen Organismus,
- gleichzeitige Erfassung jeweils mindestens eines Metaboliten der Enzyme 5-LOX, 12-LOX, 15-LOX und COX-1,
- einfache, gut handhabbare Durchführung der Testung,
- möglichst geringe Testkosten pro zu testender Substanz,
- Durchführbarkeit mit der standardmäßigen Geräteausstattung eines analytischen Labors,
- Probendurchsatz in einer Größenordnung, die den routinemäßigen Einsatz der Methode erlaubt.

Die Eckdaten für das zu entwickelnde Testsystem wurden folgendermaßen festgelegt:

- Probenmatrix: humanes Vollblut,
- Quantifizierung der Eicosanoide mittels HPLC-Analytik mit UV-Detektion und/ oder Fluoreszenz-Detektion.

Zur analytischen Erfassung von Metaboliten der Arachidonsäure ist in der Literatur in den vergangenen zwanzig Jahren bereits eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden (Übersicht in [Brideau 1996]). An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick über die etablierten Testsysteme gegeben und begründet werden, warum in der vorliegenden Arbeit die Neuentwicklung einer Vollbluttestmethode mit den oben genannten Charakteristika angestrebt wurde.

Sofern bei der Testung nicht mit isolierten Enzymen gearbeitet wird, dienen als Analysenmatrix und damit als Enzymquelle entweder isolierte Zellen in Puffer [Benrezzouk 2001, Laufer 1995] oder Vollblut. [Brideau 1999, Surette 1994] Das Blut kann in beiden Fällen – zur Gewinnung von Zellen oder für die Vollbluttestung – vom Menschen [Sirois 1991, Sweeney 1987 (2)] oder von Tieren (Maus [Matthews 1981], Ratte [Kiyomiya 1986], Rind [Walstra 1984], Pferd [Lindberg 1998] u.a.) stammen. Wird die Testung mit isolierten Zellen durchgeführt, so werden zur Untersuchung der 5-LOX polymorphkernige Leukozyten (PMNL), zur Bestimmung der COX und der 12-HETE Blutplättchen und zur Erfassung der 15-LOX Monozyten verwendet. [Dadaian 1999, Dannhardt 1992]

Die Möglichkeit, isolierte Enzyme zur Testung heranzuziehen, wird aufgrund der schlechten Verfügbarkeit der humanen Enzyme kaum genutzt. Lediglich als Screeningmethode ist die Verwen-

derung pflanzlicher Enzyme, wie z.B. der L-1 der Sojabohne (einer 15-LOX, bezogen auf AA), anzusehen. [Clemens 2002 (2), Prigge 1996]

Zwischen tierischen und menschlichen Enzymen besteht bezüglich der erhaltenen Testwerte sowohl mit isolierten Zellen als auch im Vollblut eine weitestgehende Übereinstimmung. [de Leval 2001]

In der Literatur wurde in vergleichenden Studien gezeigt, daß die mit isolierten Zellen erhaltenen Testergebnisse mit den im Vollblut erhaltenen Werten übereinstimmen. [Gresele 1986] Trotzdem sind bei der Entscheidung, ob die Testung mit isolierten Zellen oder mit Vollblut durchgeführt werden soll, weitere Aspekte zu betrachten. Die Verwendung isolierter Zellen als Enzymquelle bietet den Vorteil, daß eventuell durch andere Blutbestandteile hervorgerufene Störeffekte stark reduziert bzw. ganz zu vernachlässigen sind. Es können lediglich die Enzyme, die zur Ausstattung der betreffenden Zellen gehören, durch die Testsubstanzen beeinflusst werden. Umgekehrt können auch nur diese Enzyme einen Einfluß auf die Testsubstanzen ausüben, z.B. durch Metabolisierungsreaktionen. Bei einer im Zellassay wirksamen Verbindung kann wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß die Wirksamkeit tatsächlich durch eine Wechselwirkung der Substanz mit dem entsprechenden Enzym zustande kommt. Im Vollbluttestsystem dagegen können die Wirkstoffe durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Als ein bedeutsamer Einflußfaktor ist die Plasmaproteinbindung zu nennen. Weiterhin sind eine Reihe von abbauenden Enzymen und andere potentiell durch die Testsubstanzen hemmbare Enzyme im Blut vorhanden. So kann eine im Zellassay gut wirksame Substanz bei der Testung im Vollblutassay unter Umständen eine sehr schlechte oder gar keine Wirksamkeit zeigen, weil z.B. die Verbindung eine starke Plasmaproteinbindung eingeht, welche verhindert, daß die Substanz überhaupt an ihren eigentlichen Wirkort, die Enzyme, gelangen kann. Da jedoch vorrangig eine Wirksamkeit der untersuchten Substanzen im menschlichen Organismus interessant ist, sollten diese Faktoren bei der Testung durchaus Berücksichtigung finden. Für die Entwicklung des Testsystems sollte ein Weg gefunden werden, die Testbedingungen den Gegebenheiten im menschlichen Organismus so weit wie möglich anzugleichen. Weiterhin ist die Blutaufarbeitung in einem Vollblutassay mit weit weniger Arbeitsaufwand verbunden als zur Isolierung der Zellen notwendig ist. Aus diesen Gründen wurde als Probenmatrix humanes Vollblut gewählt.

Für die Detektion der zu erfassenden Arachidonsäuremetaboliten werden in der Literatur verschiedene Methoden angewandt.

Der Trend ist in den letzten Jahren dahin gegangen, die Erfassung der Eicosanoide mittels Radio-Immuno-Assay (RIA) [Patrignani 1987, Tries 2002] oder einem fluoreszenzgekoppelten Immunoassay vorzunehmen. [Carlson 1999] Diese Methoden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und äußerst geringe Nachweisgrenzen aus und haben den Vorteil, daß das Blut vor der Messung nur wenig oder gar nicht aufgearbeitet werden muß. Nachteilig wirken sich die hohen Kosten und die Tatsache aus, daß immer nur ein Metabolit erfaßt werden kann. Jeder zusätzliche Metabolit, der bestimmt werden soll, steigert demzufolge die Kosten der Testung erheblich.

Die anderen angewandten Erfassungsmethoden erfordern vor der eigentlichen Messung eine Auftrennung der Metaboliten, in der Regel mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Üblicherweise kommt eine Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) zum Einsatz. Die Detektion kann UV-spektrometrisch mit [Terragno 1981] und ohne [Mathews 1981, Radmark 2000] vorherige

Derivatisierung erfolgen. Weiterhin sind die Radioisotopen-Detektion nach Verstoffwechslung ^{14}C -markierter AA [Matsuo 1997], die Fluoreszenz-Detektion nach entsprechender Markierung [Kelly 1987, Toyo'oka 1995, Yasaka 1994] und die elektrochemische Detektion [Herrmann 1987] beschrieben worden.

Aufwand und Kosten für die Durchführung der Routinetestung sind bei Einsatz der UV-Detektion ohne Derivatisierung am geringsten. Allerdings besteht hierbei der Nachteil, daß einige AA-Metaboliten, besonders die COX-Metaboliten, kein Absorptionsmaximum im UV-Wellenlängenbereich oberhalb von 200 nm besitzen und somit nicht ohne weiteres UV-spektroskopisch erfaßbar sind. In der Literatur ist ein HPLC-System zur Erfassung von Eicosanoiden beschrieben worden, welches für die Prostaglandine und Thromboxane die Wellenlänge 192,5 nm zur Detektion nutzt. [Kim 1998] Dies war mit den zur Verfügung stehenden Geräten technisch nicht nachvollziehbar. Lediglich der COX-Metabolit 12-HHT besitzt ein Absorptionsmaximum bei 230 nm und kann mit den üblichen UV-Detektoren quantifiziert werden.

Mit den beschriebenen UV- und fluoreszenzspektrometrischen Verfahren, die eine Derivatisierung der Eicosanoide beinhalten, sind prinzipiell zwar alle AA-Metaboliten erfaßbar, jedoch ist die Durchführung eines Derivatisierungsschrittes immer auch eine mögliche Fehlerquelle, welche die Meßergebnisse negativ beeinflussen kann. Zudem sind die Derivatisierungsschritte oftmals mit einem großen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden.

Die elektrochemische Detektion hat den Nachteil, daß bei den erforderlichen Redox-Potentialen von über 1 V viele Bestandteile des Blutes erfaßt werden, was die Auswertung erschweren kann und die Empfindlichkeit und Spezifität der Methode stark beeinträchtigt.

Als weitere Methode der Eicosanoidefassung sei der Vollständigkeit halber die selten angewandte Massenspektrometrie-gekoppelte Gaschromatographie (GC-MS) genannt. Notwendigerweise ist hierbei vor der Gaschromatographie ein Derivatisierungsschritt durchzuführen. [Guido 1983, Sirois 1991] Da viele der Eicosanoide die gleichen molaren Massen besitzen, können die AA-Metaboliten mit Hilfe der massenselektiven Detektion nicht ohne weiteres unterschieden werden, was als Nachteil zu werten ist. Das gleiche Problem stellt sich auch bei den LC-MS-Methoden, die zur Analyse verschiedener Lipidverbindungen ebenfalls zur Anwendung kommen. [Sajiki 1998]

Für die Entwicklung des neuen Testsystems wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst zwei Detektionsvarianten näher betrachtet: einmal die UV-Detektion ohne vorherige Derivatisierung und zum anderen die Fluoreszenzdetektion nach Markierung der Eicosanoide mit einem Fluoreszenzmarker.

Seit einigen Jahren besteht ein großes Interesse an der Entwicklung selektiv auf die COX-2 wirkender Inhibitoren. Zur Differenzierung zwischen COX-1- und COX-2-Aktivität der Testsubstanzen wäre die Durchführung einer weiteren Testung notwendig, da zur Stimulation der beiden Isoformen der COX jeweils andere Bedingungen erforderlich sind. [Dannhardt 2001, Demasi 2000, Laufer 1999] Da die Strukturen der zu untersuchenden Substanzen keinen Anhaltspunkt für eine mögliche COX-2-Selektivität bieten, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Bestimmung der COX-2 verzichtet und die Testung auf das Enzym COX-1 beschränkt.

3.2 Geräte, Materialien und Methoden

3.2.1 Geräte

Blutabnahme:

Kanülen	VASUFLO® Perfusionsbesteck
Spritzen	Transcoject® Luer-Einmalspritzen, 60 ml

Blutauarbeitung:

Bechergläser aus Polypropylen	VIT LAB
Zentrifugengläser mit Verschuß aus Polypropylen	VIT LAB
Zentrifuge	Labofuge A, Haereus Sepatech bzw. MLW T 52.2
Wasserbad	Heidolph, WB 4000
Schüttler	MLW S 420
Abdampfblock	Anfertigung der Werkstatt des Fachbereichs Pharmazie
Ultraschallbad	USG 50
Einkanal-Mikroliterpipetten	Carl Roth GmbH

Festphasenextraktion:

Vakuumapparatur	Baker-SPE System, Adsorbex® SPU
RP-18 Extraktionssäulen	Bakerbond spe Octadecyl Disposable Extraction Columns, 500 mg, 3 ml bzw. Merck LiChrolut® RP-18 500 mg, 3 ml

HPLC-Anlage mit UV- und Fluoreszenz-Detektion:

HPLC-System der Firma Merck:	
Vorsäule	LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Trennsäule	LiChroCART® 250-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Säulenofen	L-7360
Diodenarray-Detektor	L-7455
Fluoreszenz-Detektor	L-7480
Gradientenpumpe	L-7100
Laufmittelentgaser	L-7612
Autosampler	L-7200
Computer-Interface	D-7000

Meß- und Steuerprogramm	HSM 3.1
Aufbereitung des Wassers (aqua bidest.)	ELGA Maxima Ultra Pure Water

3.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Referenzsubstanzen

Referenzeicosanoide:

PGB ₁ , LTB ₄ , 12-HHT, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α} , TxB ₂	Cayman Chemical
---	-----------------

Standardhemmsubstanzen:

Zileuton	Zyflo™ Filmtab®, Abbott
Acetylsalicylsäure, Indometacin	VEB Berlin Chemie
NDGA	Fluka Chemical

Reagenzien:

Heparin	Liquemin® N 10000, Roche
Calcium Ionophor A23187 (Calciycin)	Serva bzw. Fluka Chemical
Arachidonsäure	Fluka Chemical
Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Kaliumcarbonat	Riedel-de Haen
BrMMC	Sigma-Aldrich
Kronenether 18-Krone-6	Fluka Chemical
Essigsäure, Salzsäure	Grüssing GmbH
Trifluoressigsäure, Ameisensäure	Fluka Chemical
MeOH für HPLC, Acetonitril für HPLC	Carl Roth GmbH
Dulbeccos Puffer-Substanz ohne Phenolrot, Ca und Mg	Serva
PBS-Puffer	Dulbeccos Puffer-Substanz 9,55 g Aqua bidest. ad 1000 ml

3.2.3 Methoden

Die im folgenden beschriebenen Methoden stellen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimierten Arbeitsvorschriften zur Versuchsdurchführung dar, die für die Routinetestung genutzt werden sollen. Für die im Ergebnisteil beschriebenen Experimente wurden teilweise abgewandelte Versuchsdurchführungen praktiziert. Diese Abweichungen sind bei den entsprechenden Ergebnissen vermerkt.

3.2.3.1 **Blutauarbeitung**

Alle verwendeten Geräte und Gefäße, die mit dem Blut in Berührung kommen, bestehen aus Polypropylen. Alternativ können Glasgeräte und -gefäße verwendet werden, wenn diese vorher silikonisiert werden.

3.2.3.1.1 Zur Testung zu verwendende Lösungen

Zur Durchführung der Vollbluttestung werden die folgenden Lösungen benötigt:

- Die zu testenden Substanzen (Inhibitoren) werden so in DMSO gelöst, daß die gewünschte Testkonzentration durch Zugabe von 6 µl der Substanzlösung zu 3 ml Blut erhalten wird. Die Lösungen der Testverbindungen werden unmittelbar vor Beginn der Testung frisch hergestellt. Für die Routinetestung wird eine Lösung der Konzentration 5 mM hergestellt (Endkonzentration in den Blutproben: 10 µM).
- Calcium-Ionophor A23187 in DMSO 15 mM (7,85 mg/ ml)
- Arachidonsäure in Ethanol 5 mM (1,52 mg/ ml)
- CaCl₂ 0,25 M (27,7 g) und MgCl₂ 0,25 M (23,8 g) gemeinsam in 1 l Wasser
- Interner Standard PGB₁ in MeOH 7,4 µM (2,5 µg/ ml), Lösung bis zur Verwendung bei – 18 °C unter Argon lagern (= Lösung zum Abstoppen der Enzymreaktion).

Die Reagenzienlösungen A23187 und Arachidonsäure können unter Argonatmosphäre bei – 18 °C über lange Zeit aufbewahrt werden.

3.2.3.1.2 Bearbeitung des humanen Vollblutes

Die Verwendung des menschlichen Blutes wurde bei der Ethikkommission der Universität angezeigt und durch diese genehmigt. Die Probanden werden mittels eines Hinweisblattes über die Art der Verwendung ihres Blutes informiert.

Von gesunden, freiwilligen Probanden, die mindestens fünf Tage keine NSAR eingenommen haben, werden unter den entsprechenden hygienischen Bedingungen ca. 60 ml Blut aus der Armvene entnommen und in ein Becherglas, welches 10 I.E. Heparin (= 10 µl Liquemin[®] N 10000) je ml Blut enthält, überführt und gut geschüttelt. Das Blut wird unmittelbar anschließend in Portionen zu je 3 ml aufgeteilt und ohne Vorinkubation weiterverwendet.

Nach Zugabe der DMSO-Lösung der Testsubstanzen (6 µl) werden die Blutproben 30 min bei 38 °C im Wasserbad inkubiert. Zu den Kontrollproben (Blindwerten) jeder Testreihe wird anstelle einer Substanzlösung reines DMSO (6 µl) gegeben.

Anschließend wird die Enzymreaktion durch Zugabe der Calcium-Ionophor A23187-Lösung (6 µl, Endkonzentration 30 µM), Arachidonsäurelösung (6 µl, Endkonzentration 10 µM) sowie der Ca-/Mg-Salzlösungen (6 µl, Endkonzentration jeweils 0,5 mM) gestartet. Die Proben werden 40 min bei 38 °C im Wasserbad inkubiert.

Danach wird die Reaktion mit 500 µl der eiskalten PGB₁-Lösung in Methanol abgestoppt. Die Proben werden nun mindestens zwei Stunden bei – 18 °C aufbewahrt.

Je nach gewählter Methode wird mit der Festphasenextraktion oder der flüssig-flüssig-Extraktion fortgefahren.

Die Standardmethode zur Routinetestung setzt mit der Festphasenextraktion (Kap. 3.2.3.2.1) fort.

3.2.3.2 Extraktion der Eicosanoide

3.2.3.2.1 Festphasenextraktion

Die C-18 Festphasensäulen werden vor dem Auftragen des Blutes nacheinander mit jeweils 10 ml Methanol und 10 ml Wasser konditioniert. Dabei ist darauf zu achten, daß die Säulen nicht trockenlaufen. Um die konditionierten Säulen vor dem Austrocknen zu schützen, werden sie bis zur weiteren Verwendung unter Wasser aufbewahrt.

Vor der Extraktion werden die Blutproben mit 4 ml einer 0,1 %-igen Salzsäure-Lösung angesäuert. Anschließend wird 25 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugates wird auf die Festphasensäulen aufgebracht und mit einem leichten Unterdruck durch die Sorbensschicht gesaugt. Bis die gesamte Blutprobe aufgetragen ist, dürfen die Säulen nicht trockenlaufen. Anschließend werden die Säulen mit 2 ml Wasser gewaschen und 15 min bei angelegtem maximalen Unterdruck weitestgehend von Feuchtigkeitsresten befreit. Die Eluation der lipophilen Arachidonsäuremetaboliten erfolgt in drei Schritten mit HPLC-reinem Methanol (400 µl + 400 µl + 200 µl) bei einem Unterdruck von ca. 10 mmHg.

Das Eluat wird unter Argonstrom bei einer Temperatur von 38 °C zur Trockene eingedampft.

Die Festphasensäulen können etwa vier- bis fünfmal verwendet werden.

Es wird mit der HPLC-Analytik fortgefahren.

3.2.3.2.2 Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Blutproben werden vor Beginn der Extraktion mit 4 ml einer 0,1 %-igen Salzsäure-Lösung angesäuert. Zu jeder Probe werden 2 ml Ethylacetat gegeben und gut geschüttelt. Die Proben werden 20 min bei 2000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird abgenommen. Es wird noch zweimal mit jeweils 1,5 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und unter Argonstrom bei 38 °C zur Trockene abgedampft. Es wird mit der HPLC-Analytik fortgefahren.

3.2.3.3 HPLC-Analytik

Je nach gewählter Erfassungsmethode für die Arachidonsäuremetaboliten wird mit einer der folgenden HPLC-Methoden weitergearbeitet.

Die Standardmethode zur Routinetestung nutzt die HPLC-Analytik mit UV-Detektion (Kap. 3.2.3.3.1).

3.2.3.3.1 HPLC-Analytik – UV-Detektion

Der Rückstand des abgedampften Eluats bzw. Extraktes wird in 120 µl MeOH aufgenommen und der HPLC-Analytik zugeführt.

Die underivatisierten Metaboliten werden zur nachfolgenden UV-Detektion mit folgender Laufmittelzusammensetzung aufgetrennt:

Laufmittel A: Methanol; Laufmittel B: Wasser / Essigsäure (100 / 0,1; V/V).

Es wird folgender Gradientenverlauf gewählt:

0 bis 12 min: isokratisch A / B = 70 / 30, Fluß = 1,2 ml/ min; 12 bis 15 min: linearer Gradient auf A / B = 75 / 25, lineare Erhöhung des Flusses auf 1,5 ml/ min; 15 bis 30 min: isokratisch A / B = 75 / 25, Fluß = 1,5 ml/ min.

Auf die Säule werden 20 µl der Probenlösung injiziert. Die Trennung erfolgt bei Raumtemperatur.

Die Retentionszeiten der Arachidonsäuremetaboliten unter den angegebenen Bedingungen betragen etwa:

Interner Standard PGB₁: 8 min; LTB₄: 11 min; 12-HHT: 15 min; 15-HETE: 21 min; 12-HETE: 24 min; 5-HETE: 26 min.

Das UV-Absorptions-Spektrum wird im Bereich von 200 bis 320 nm aufgenommen. Zur Quantifizierung der Metaboliten werden die Peaks bei folgenden Wellenlängen ausgewertet:

Interner Standard PGB₁: 280 nm; LTB₄: 270 nm; 12-HHT: 230 nm; 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE: 235 nm.

Die Arachidonsäuremetaboliten werden über die Peakflächenverhältnisse zum internen Standard quantifiziert.

Alternativ ist es möglich, die oben genannten Arachidonsäuremetaboliten durch einen isokratischen Laufmittelfluß mit nachfolgender UV-Detektion zu trennen. Mit dem Laufmittelgemisch Methanol / Wasser / Essigsäure (78 / 22 / 0,1; V/V, Fluß = 1 ml/ min) erfolgt die Trennung innerhalb von 20 min. Allerdings kann es hierbei vorkommen, daß die Peaks von PGB₁, LTB₄ und 12-HHT von Störpeaks (z.B. vom Peak der Testsubstanz) überlagert werden und damit nicht auswertbar sind. Die Retentionszeiten bei Verwendung dieses isokratischen Laufmittels betragen etwa:

Interner Standard PGB₁: 6 min; LTB₄: 8 min; 12-HHT: 12 min; 15-HETE: 14 min; 12-HETE: 16 min; 5-HETE: 18 min.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt wie oben beschrieben.

3.2.3.3.2 HPLC-Analytik – Fluoreszenz-Detektion

Für die Derivatisierung zu verwendende Lösungen:

- BrMMC in Acetonitril (1 mg/ 3 ml)
- Kronenethersuspension (nach [Wolf 1990]): 35 mg Kronenether (18-Krone-6) und 100 mg Kaliumcarbonat werden in einer Mischung aus 5 ml Acetonitril und 50 μ l Wasser 30 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend werden erneut 5 ml Acetonitril hinzugegeben, die Suspension nochmals kurz im Ultraschallbad behandelt, der klare Überstand abgenommen und zur Derivatisierung verwendet.

Zur HPLC mit Fluoreszenzdetektion wird der Rückstand des unter Argon abgedampften Eluats in 90 μ l der BrMMC-Lösung aufgenommen und mit 30 μ l der Kronenethersuspension versetzt. Es wird 90 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß geschüttelt. Anschließend wird die Lösung der HPLC-Analytik zugeführt.

Die Auftrennung der derivatisierten Metaboliten mit anschließender fluoreszenzspektrometrischer Detektion erfolgt unter Verwendung folgender Laufmittel:

Laufmittel A: Methanol; Laufmittel B: Wasser / Essigsäure (100 / 0,1; V/V).

Es wird folgender Gradientenverlauf gewählt:

0 bis 22 min: A / B = 72 / 28, Fluß = 1,0 ml/ min; 22 bis 30 min: linearer Gradient auf A / B = 85 / 15, lineare Erhöhung des Flusses auf 1,25 ml/ min; 30 bis 45 min: A / B = 85 / 15, Fluß = 1,25 ml/ min.

Auf die Säule werden 20 μ l der Probenlösung injiziert. Die Trennung erfolgt bei einer konstanten Temperatur von 25 °C.

Die Retentionszeiten der Arachidonsäuremetaboliten unter den angegebenen Bedingungen betragen etwa:

Interner Standard PGB₁: 22 min; LTB₄: 23 min; PGE₂: 9 min; PGD₂: 11 min; PGF_{2 α} : 8 min; TxB₂: 7,5 min; 5-HETE: 34 min.

Die Fluoreszenz wird bei der Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 400$ nm gemessen. Als Anregungswellenlänge wird $\lambda_{ex} = 320$ nm eingestellt. Eine zusätzliche Kontrolle, insbesondere der vollständigen Umsetzung bei der Derivatisierung, bietet die gleichzeitige Aufnahme des UV-Spektrums zwischen 200 und 420 nm.

Die Arachidonsäuremetaboliten werden über die Verhältnisse ihrer Peakflächen zu denen des internen Standards quantifiziert.

3.2.4 Rechnerische und statistische Auswertung

Die Wirkstärke der Testsubstanzen wird bei Nutzung der UV-Detektion als prozentuale Hemmung der Bildung von LTB₄, 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE für die Lipoxygenasen und 12-HHT für die Cyclooxygenase-1 berechnet (bei Fluoreszenzdetektion entsprechend für die anderen Metaboliten). Die Testung wird in der Regel als Dreifachbestimmung (n = 3) durchgeführt. Meßwerte sind in allen Fällen die Flächen der Peaks. Die Peakflächen werden gegen den internen Standard korrigiert. Die für weitere Kalkulationen genutzte Rechengröße (korrigierte Peakfläche) ist der Quotient:

korrigierte Peakfläche = $\frac{\text{Peakfläche des Analyten}}{\text{Peakfläche des internen Standards}}$. Die weiteren Berechnungen werden

jeweils mit dem arithmetischen Mittel der Ergebnisse der parallelen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zur Angabe der Hemmaktivität einer Probe wird der prozentuale Anteil des errechneten Mittelwerts gegen den Mittelwert der Blindwerte der jeweiligen Meßserie herangezogen. Die Ergebnisse (Hemmwerte) werden als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Negative Werte stehen für eine Stimulation der Bildung dieses Metaboliten.

Die statistische Signifikanz wird bezogen auf ein 95 %-Vertrauensintervall mittels t-Test-Analyse überprüft. In den Abbildungen und Tabellen sind statistisch signifikante Unterschiede mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die IC₅₀-Werte werden in Dreifachbestimmung durch nichtlineare Regression nach der Gleichung

$\frac{v}{v_0} = \frac{IC_{50}^B}{IC_{50}^B + X^B}$ (Variante der Hill-Gleichung) berechnet. [Fleischer 2000] Zur Kurvenan-

passung wird der Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwendet. Jede IC₅₀ wird aus vier bis fünf Hemmwerten berechnet, wobei hierfür das Blut von mindestens drei verschiedenen Probanden genutzt werden sollte. Angegeben sind der Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD).

Zur rechnerischen und statistischen Auswertung dient das Programm MicrocalTM Origin[®], Version 6.0.

3.3 Entwicklung des Testsystems

Bei der Entwicklung eines neuen Testsystems – auch wenn dieses in seinen Grundlagen auf den literaturbekannten Vorgehensweisen beruht – ist ein wesentlicher Arbeitsschritt die Optimierung der Testbedingungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden systematisch alle das Testergebnis beeinflussenden Versuchsbedingungen und Arbeitsschritte genauer untersucht und auf eine mögliche Optimierung analysiert. Dabei stand immer als Ziel im Vordergrund, das Testsystem so zu gestalten, daß es eine routinemäßige Anwendung zur Evaluierung neu synthetisierter Substanzen erlaubt.

Die Arbeitsschritte und Ergebnisse der Optimierung des Testsystems werden in den einzelnen Abschnitten dieses Kapitels beschrieben. Dabei wird auf folgende Punkte eingegangen:

- Beeinflussung der Eicosanoidbildung: Lösungsmittel für die Reagenzien und Testsubstanzen, Konzentration der Stimulationsreagenzien, Stimulationsdauer, Abstoppen der Stimulationsreaktion, Interindividuelle Schwankungen der Hemmbarkeit der Metaboliten
- Extraktion der Eicosanoide: Festphasenextraktion, flüssig-flüssig-Extraktion, Abdampfen des Lösungsmittels nach der Extraktion
- HPLC-Analytik: UV-Detektion, Fluoreszenz-Detektion nach Derivatisierung.

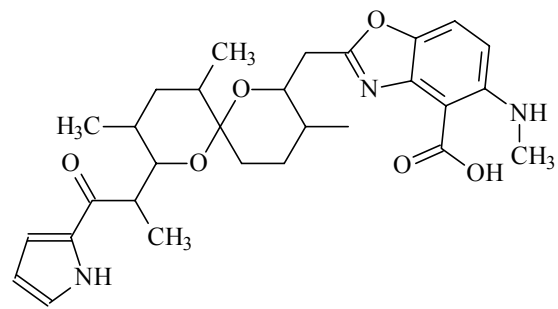
Die folgenden Arachidonsäuremetaboliten sollten UV-spektrometrisch erfaßt werden: LTB₄ und 5-HETE (5-LOX), 12-HETE (12-LOX), 15-HETE (15-LOX) und 12-HHT (COX-1). Bei Anwendung der Fluoreszenzderivatisierung konnten zusätzlich auch TxB₂, PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α} (COX-1) quantifiziert werden.

3.3.1 Beeinflussung der Eicosanoidbildung

Die Synthese von Arachidonsäuremetaboliten in menschlichem Blut kann *in-vitro* durch verschiedene Stimuli induziert werden. Hierzu gehören Calcium-Ionophor A23187 [Borgeat 1979], Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) [Chilton 1982], Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin [Salari 1985], Interleukin-8 [Schröder 1989] oder unlösliche Stimuli, wie z.B. Zymosan. [Claesson, 1981] Alle diese Stimulantien bewirken die Mobilisierung von intrazellulären Calcium-Ionen. [Naccache 1981] Den Calcium-Ionen wiederum kommt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Säugetier-Lipoxygenasen zu. [Rouzer 1985] Durch Erhöhung der Konzentration der intrazellulären Calcium-Ionen wird die LOX an Membranen lokalisiert, wodurch sie in der Lage ist, mit Arachidonsäure zu reagieren. Im Falle der 5-LOX wird dies durch das Protein FLAP vermittelt. [Rouzer 1988 (2), Skorey 1998] Auch auf die COX hat das Calcium-Ionophor A23187 einen stimulierenden Effekt. [Wentzell 1978] Außerdem wird in den Thrombozyten die Synthese von Thromboxanen und Prostaglandinen durch Thrombin stimuliert. [Sweeney 1987 (1)] Bei der Betrachtung der Stimulierbarkeit der LOX/ COX gibt es Unterschiede zwischen isolierten Enzymen und Enzymen in intakten Zellen, die im Vollblut vorliegen. [Rouzer 1988 (1)] Dies muß

bei der Gestaltung der Testbedingungen berücksichtigt werden.

Die Bildung der Arachidonsäure-Metaboliten wird in den zur Erfassung von Eicosanoiden beschriebenen Systemen üblicherweise durch das Stimulans Calcimycin (Calcium-Ionophor A23187) initiiert. [Borgeat 1979, Sweeney 1987 (2)] Calcimycin (Strukturformel s. Schema 21) ist ein Antibiotikum, welches aus *Streptomyces chartreusis* isoliert wurde. [Zmijewski 1983] Die Wirkung dieser Substanz beruht darauf, daß sie den Calcium-Ionen-Einstrom in die Zelle verstärkt [Malaisse 1981], indem entsprechende Kanäle in der Zellmembran geöffnet werden. Die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration aktiviert die calciumabhängigen Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade. [Rouzer 1987] Möglicherweise werden auch intrazelluläre Calcium-Speicher mobilisiert. Weiterhin wurde gezeigt, daß das cytosolische Enzym 5-LOX in Leukozyten und Macrophagen unter dem Einfluß von A23187 im Sinne einer calciumabhängigen Membranassoziation an intrazelluläre Membranen bindet. [Rouzer 1988 (2)] Wird dem Vollblut kein Calcium-Ionophor A23187 zugesetzt, lassen sich trotzdem die Eicosanoide detektieren, die in den Blutplättchen gebildet werden (12-HETE und 12-HHT, s. Abbildung 2, Kap. 3.3.1.2). [Sweeney 1987 (1)]



Schema 21: Strukturformel des Calcium-Ionophors A23187 (Calcimycin)

Studien ergaben, daß die Verfügbarkeit von Arachidonsäure häufig den limitierenden Faktor für die Eicosanoidbiosynthese darstellt. [Clancy 1983] Um das Substrat der Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, werden die Blutproben mit Arachidonsäure versetzt. [Borgeat 1979] Damit soll ausgeschlossen werden, daß die Enzymreaktion aufgrund einer Substratverarmung zum Stillstand kommt. Die Arachidonsäure hat zugleich einen stimulierenden Effekt auf ihre eigene Verstoffwechslung. [Vila 1997] Die für die Aktivierung der Enzyme notwendigen Calcium-Ionen sind bei der Durchführung von Zellassays meist im Puffer enthalten. Zum Vollblutassay werden Calcium- oder auch Magnesium-Ionen separat zugegeben. [Rouzer 1987] Damit wird verhindert, daß die Metabolisierung aufgrund eines Mangels an Kationen zum Erliegen kommt. Dies ist erforderlich, da die durch die Stimulation mit A23187 in die Zellen einströmenden Calcium-Ionen in der Blutprobe nicht aus Calcium-Speichern des Organismus ersetzt werden können.

Ein weiterer Faktor, der selbstverständlich die Menge der gebildeten Arachidonsäure-Metaboliten beeinflusst, ist die Zeitdauer der Inkubation und damit die Reaktionszeit, die den Enzymen zur Verfügung steht. Während in Zellassays meist Stimulationszeiten von fünf bis zehn Minuten ausreichend sind [Laufer 1995], muß bei der Arbeit mit Vollblut diese Zeit deutlich länger gewählt werden. In den Literaturvorschriften sind Stimulationszeiten von 15 bis 80 Minuten üblich. [Kikawa 1989, Saareks 1998]

Die genannten Abhängigkeiten, die einen Einfluß auf die Metabolisierung der Arachidonsäure haben, sollten im Zuge der Entwicklung des Vollblut-Testsystems nacheinander untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln wiedergegeben.

Schließlich ist der Wirkstoff zu betrachten, mit dem das Blut ungerinnbar gemacht wird. Hierfür kommt für diese Art der Testung lediglich Heparin in Frage. Die Komplexbildner Citrat und EDTA

scheiden aus, da hierdurch die Calcium-Ionen komplexiert werden. Das hat zum einen den gewünschten Effekt, daß die Blutgerinnung unterbunden wird. Zum anderen wird durch das Fehlen der Calcium-Ionen aber auch eine Stimulation der Enzyme verhindert. Deshalb sind im Citrat- oder EDTA-Blut keine Untersuchungen zum Arachidonsäurestoffwechsel möglich. [Surette 1994] Sämtliche Untersuchungen wurden mit Blut durchgeführt, welches entsprechend den üblichen Vorschriften mit Heparin (10 I.E./ ml Blut) versetzt wurde. [Berg 1999, Kürschner 1998]

3.3.1.1 Einfluß des Lösungsmittels für Testsubstanzen und Reagenzien auf die Metabolitenbildung

Für die Herstellung der Lösungen, die im Verlauf der Testung zum Blut zugegeben werden, wären Wasser, isotonische Kochsalzlösung bzw. ein Puffer des Blut-pH-Wertes die idealen Lösungsmittel. Diese sind jedoch in der Praxis nicht oder nur in Ausnahmefällen einsetzbar, da sich die meisten der zu untersuchenden Inhibitoren, aber auch die Reagenzien A23187 und AA nur sehr schlecht in Wasser lösen. Aus diesem Grund muß auf organische Solventien zurückgegriffen werden. Ein geeignetes Lösungsmittel sollte selbst keine übermäßige Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels im Blut bewirken.

DMSO, DMF, Ethanol, Methanol oder isotonische Kochsalzlösung sind in den Literaturvorschriften am gebräuchlichsten, um die Lösungen der Inhibitoren und Reagenzien zur Durchführung von Vollbluttestungen herzustellen. [Alanko 1991, Patrignani 1987, Young 1996] Anhand von Blindproben ohne Zusatz eines Inhibitors wurden die drei Lösungsmittel Wasser, DMSO und Methanol gegenübergestellt. Die Stimulation der Enzymreaktionen erfolgte mit einer DMSO-Lösung von A23187 und einer methanolischen AA-Lösung. Durch den Zusatz von 6 µl Lösungsmittel wurde die Zugabe des Inhibitors simuliert.

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß es zwischen den in den Blutproben nachgewiesenen Eicosanoidmengen teils erhebliche Differenzen innerhalb der drei Versuchsgruppen gibt. Die 5-LOX wird durch DMSO-Zusatz offenbar stimuliert, so daß der Gehalt an LTB₄ und 5-HETE um 50 bis 80 % ansteigt. Während die 12-HETE durch Methanol-Zusatz um etwa 50 % gehemmt wird, hat DMSO keinen Einfluß auf dieses Enzym. Die 15-LOX bleibt durch die Wahl des Lösungsmittels unbeeinflusst. Der COX-Metabolit 12-HHT wird sowohl in den mit DMSO als auch Methanol behandelten Blutproben um etwa 60 % mehr nachgewiesen als in den mit Wasser versetzten Proben.

Nicht endgültig geklärt werden kann die Frage, ob das Lösungsmittel tatsächlich eine stimulierende bzw. inhibierende Wirkung auf die Enzyme besitzt oder ob die erhöhten bzw. erniedrigten Metabolitenmengen durch andere Ursachen, z.B. eine veränderte Extraktionsfähigkeit der Eicosanoide, bedingt sind. Da jedoch die Wiederfindungsraten des PGB₁ keinen Unterschied zwischen den einzelnen Proben aufweisen, ist es naheliegend, die veränderten Metabolitenmengen auf eine Enzymstimulation bzw. -inhibition zurückzuführen. Für die Sojabohnen-LOX ist von Kermasha et al. [2001] eine Beeinflussung der Lipoxygenaseaktivität durch organische Lösungsmittel beschrieben worden, die auch auf die Enzyme im humanen Vollblut zutreffen könnte.

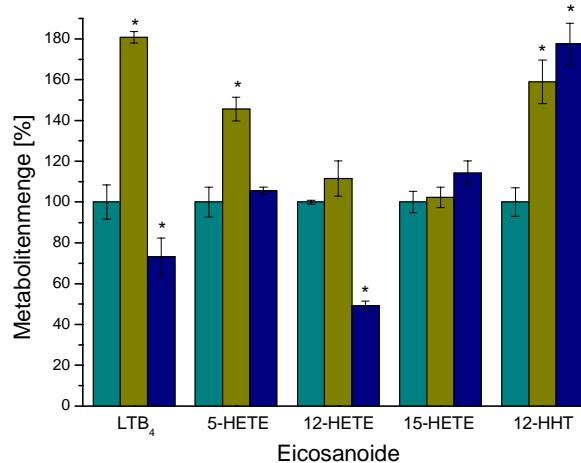


Abbildung 1: Einfluß des zugesetzten Lösungsmittels auf die Eicosanoidbildung bezogen auf die Proben mit Zusatz von 6 µl Wasser (= 100 %), kein Inhibitor; sonstige Bearbeitung nach Standardvorschrift (n = 3, für DMSO: n = 6)
Blutproben mit Zusatz von 6 µl Wasser (cyan), DMSO (gelb) bzw. MeOH (blau)

Für die Durchführung der Testung wurde der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für die Testsubstanzen der Vorzug gegeben, da die Mehrzahl der untersuchten Verbindungen in DMSO besser löslich ist als in Methanol. Der stimulierende Effekt des DMSO sollte keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Testung haben, da alle Blindproben mit der gleichen Menge Lösungsmittel versetzt werden und sich somit der Effekt des DMSO rechnerisch ausgleicht.

Um eventuell auftretende Instabilitäten der Inhibitoren nicht als verfälschenden Einflußfaktor in die Analytik eingehen zu lassen, wurden die Lösungen der Testverbindungen immer erst unmittelbar vor Beginn der Testung hergestellt.

3.3.1.2 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Calcium-Ionophor A23187-Konzentration

Um die Abhängigkeit der Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten von der Calcium-Ionophor-Konzentration zu untersuchen, wurden Blutproben mit unterschiedlichen Mengen Calcium-Ionophor A23187 versetzt, so daß in den Proben die Endkonzentrationen 0, 15, 30, 40 und 50 µM eingestellt wurden. Üblicherweise werden für Vollblutassays A23187-Konzentrationen von 30 bis 100 µM eingesetzt. [Alanko 1998, Cai 1998, Carlson 1999] In Zellassays kann diese Konzentration wesentlich geringer gehalten werden. Hier sind für solche Testungen Konzentrationen von nur 1 bis 10 µM gebräuchlich. [Matsuo 1997, McDonald 1991] Die übrige Behandlung der Blutproben erfolgte nach den im experimentellen Teil angegebenen Standardbedingungen, jedoch ohne Ionenzusatz.

Die graphische Darstellung in Abbildung 2 zeigt in den schwarzen Linien die Abhängigkeit der Menge der erfaßten Metaboliten von der eingesetzten Konzentration an Calcium-Ionophor.

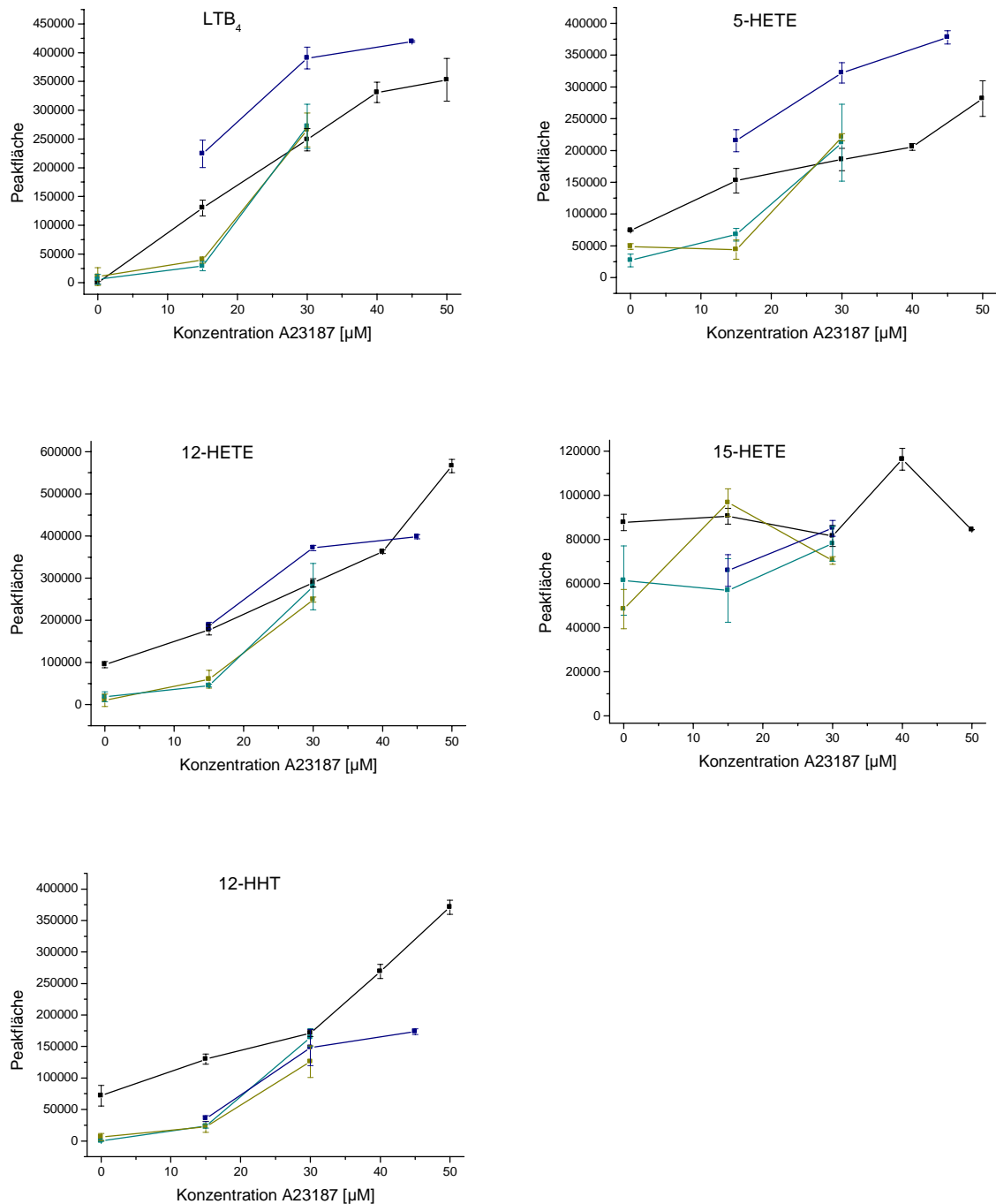


Abbildung 2: Abhängigkeit der Eicosanoidbildung von der A23187-Konzentration und vom Kationenzusatz. Blutproben ohne Inhibitor, Stimulationsdauer: 30 min (n = 4)
 schwarze Linie: ohne Ionenzusatz
 grüne Linie: Zusatz von 1 mM Mg²⁺
 gelbe Linie: Zusatz von 1 mM Ca²⁺
 blaue Linie: Zusatz von 0,5 mM Ca²⁺ + 0,5 mM Mg²⁺

Während in den Proben ohne A23187-Zusatz keine Bildung von LTB₄ nachweisbar ist, steigt diese bei Erhöhung der Ionophor-Konzentration bis auf 30 μM stark an. Bei noch größeren A23187-Konzentrationen ist eine weitere Steigerung der Eicosanoidbildung zu verzeichnen, die jedoch

nicht mehr so extrem ausfällt, wie in niedrigeren Konzentrationsbereichen. Für die 5-HETE, die 12-HETE und die 12-HHT scheint durch größere Ionophor-Konzentrationen eine noch deutlich höhere Ausbeute erreichbar zu sein, was jedoch nicht weiter untersucht wurde. Die hohen Mengen an 12-HETE und 12-HHT, die schon ohne Zugabe des Stimulationsreagenzes nachweisbar sind, lassen sich damit erklären, daß diese Metaboliten zusätzlich von den Enzymen der Blutplättchen gebildet werden, deren Stimulation nicht A23187-abhängig ist. [Sweeney 1987 (1)] Die 15-HETE bleibt durch die zugegebene Menge an A23187 nahezu unbeeinflusst.

Da die Erhöhung der Calcium-Ionophor-Konzentration von 30 μM auf 50 μM eine Steigerung der Kosten für die Untersuchungen auf das mehr als 1,5-fache bedeutet, wurde für die Routinetestung der Kompromiß eingegangen, die etwas geringeren Metabolitenausbeuten bei der Konzentration 30 μM zugunsten der niedrigeren Materialkosten in Kauf zu nehmen.

Zu beachten ist bei der Durchführung der Testung, daß die von einigen Autoren [Carlson 1999] vorgeschlagene Vorinkubation des Blutes bzw. der Zellen vor der Zugabe der Inhibitorlösung sehr schnell die Fähigkeit der Enzyme herabsetzt, unter A23187-Stimulation AA-Metaboliten zu generieren. [Surette 1994] Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen ohne Vorinkubation unmittelbar nach Abnahme des Blutes durchgeführt.

3.3.1.3 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Calcium- und Magnesium-Ionen-Konzentration

Calcium- und Magnesium-Ionen sind die beiden am häufigsten vorkommenden intrazellulären Kationen. Magnesium-Ionen können mit Calcium-Ionen um Bindungsstellen konkurrieren und den Calcium-Ionen-Einstrom in die Zellen beeinflussen. [Reddy 2000] Für beide Ionen und für zahlreiche andere zweiwertige Kationen, wie z.B. Mn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , ist eine stimulierende Wirkung auf die 5-Lipoxygenaseaktivität bekannt. [Kuo 1997, Restrepo 1973, Tatulian 1998] Andere Ionen, wie z.B. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , oder auch Wasserstoffperoxid inhibieren die 5-LOX. [Hammarberg 1999, Percival 1992] Die 12-LOX und die 15-LOX sind weitgehend calciumunabhängig. [Yamamoto 1992] Zur Stimulation des Arachidonsäurestoffwechsels in Zell- und Vollblutassays werden sowohl Calcium- als auch Magnesium-Ionen oder eine Mischung aus beiden Ionen eingesetzt. [Kiyomiya 1986, Laufer 1995, Pasqualini 2000] Reddy et al. fanden, daß das Stimulationspotential der Magnesium-Ionen nur etwa halb so groß ist wie das der Calcium-Ionen. [Reddy 2000] Andere Autoren beschrieben einen inhibierenden Effekt der Magnesium-Ionen auf die 5-LOX. [McDonald 1991] In höheren Konzentrationen haben die Calcium-Ionen einen destabilisierenden Effekt auf die 5-LOX. [Rouzer 1987] Die Auswirkung einer gleichzeitigen Zugabe beider Kationen zu den Blut- oder Zellzubereitungen im Vergleich zum Einsatz nur eines Kations auf die Eicosanoidausbeute wurde bisher noch nicht näher untersucht. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde der Einfluß der Zugabe von Calcium- oder Magnesium-Ionen und einer Mischung beider Kationen jeweils in der Ionen-Endkonzentration von 1 mM auf die Stimulation der Eicosanoidbildung analysiert.

In Abbildung 2 (Kap. 3.3.1.2) ist die Abhängigkeit der Bildung der fünf AA-Metaboliten von der Art der zugesetzten Ionen und der A23187-Konzentration bei 30-minütiger Inkubation dargestellt.

Die übrigen Versuchsbedingungen entsprechen den im Methoden-Teil (Kap. 3.2) angegebenen Standardbedingungen.

Durch den Ionenzusatz verändert sich im Vergleich zu den Proben ohne Ionenzusatz (schwarze Linien in Abbildung 2, Kap. 3.3.1.2) der Kurvenverlauf teilweise erheblich.

Die Graphen für die Bildung der Metaboliten LTB_4 und 5-HETE haben einen ähnlichen Verlauf. Wird den Proben nur eines der beiden Kationen in der Konzentration 1 mM zugesetzt, so ist die Bildung der Arachidonsäuremetaboliten mit Calcium-Ionen bzw. mit Magnesium-Ionen gleich groß. Überraschend ist das Ergebnis, das beobachtet wurde, wenn die Kationenkonzentration bei 1 mM belassen wurde, diese sich jedoch aus 0,5 mM Calcium-Ionen und 0,5 mM Magnesium-Ionen zusammensetzt. Mit dieser Mischung der Ionen läßt sich die Metabolitenausbeute deutlich steigern. Schon bei einer Konzentration von 15 μM A23187 wurden mit Calcium- und Magnesium-Ionen die gleichen Metabolitenmengen gemessen, wie nach Stimulation mit 30 μM A23187 und Zusatz nur eines der beiden Kationen in der gleichen Endkonzentration. Vergleicht man die Werte der Stimulation mit 30 μM A23187 miteinander, so ist durch den Zusatz der Mischung aus den zwei Salzen eine Steigerung der Synthese von AA-Metaboliten durch die 5-LOX um über 50 % zu verzeichnen. Ohne Ionenzugabe verläuft die Kurve parallelverschoben zu der Kurve der Stimulation mit der Kationenmischung. Im Fall der 12-LOX ist dieser Effekt nicht ganz so stark ausgeprägt. Hier scheint das Stimulationsmaximum bei 50 μM A23187 noch nicht erreicht zu sein. Das Abknicken der Kurve für die Ionenmischung könnte auf den obengenannten inhibierenden Effekt der Mg^{2+} -Ionen zurückzuführen sein. Für die 12-HHT gilt offensichtlich das schon für die 12-HETE Festgestellte. Auch hier ist möglicherweise eine Steigerung der Metabolitenproduktion über das untersuchte Maß hinaus möglich. Die 15-HETE ist durch die Ionenzugabe nicht beeinflusst.

Im menschlichen Organismus wird die 15-HETE nicht allein von der 15-Lipoxygenase gebildet. Auch für Cytochrom P-450-Enzyme ist beschrieben, daß sie eine 15-LOX-Aktivität besitzen und Metaboliten der Arachidonsäure, also auch die 15-HETE bilden können. Auch diese 15-LOX-Aktivität der Cytochrome ist durch Calcium-Ionen stimulierbar. [Iwase 1998] Daher ist nicht auszuschließen, daß die im Assay gemessene 15-HETE nicht von der 15-LOX, sondern auch von den Cytochromen gebildet wurde.

3.3.1.4 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Arachidonsäurekonzentration

Wie eingangs erwähnt, ist damit zu rechnen, daß durch eine Zugabe von Arachidonsäure zu den Blutproben die Ausbeute an Eicosanoiden gesteigert werden kann. Extrazellulär applizierte AA induziert einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration durch eine Aktivierung des Ca^{2+} -Influx bzw. Freisetzung der Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, was den stimulierenden Effekt der AA auf die Enzyme der Arachidonsäurekaskade erklärt. [Enomoto 1995] Die in der Literatur beschriebenen Testsysteme verwenden üblicherweise AA-Konzentrationen im Bereich von 10 bis 20 μM . Für die Standardversuchsdurchführung wurde die Arachidonsäurekonzentration auf 10 μM festgelegt. Höhere AA-Mengen haben in den Blutproben einen negativen

Einfluß auf die HPLC-Analytik, denn die AA eluiert nur schwer von der RP-18-Säule, was mit der Zeit eine starke Verschmutzung der Säule nach sich zieht und häufiges Spülen erforderlich macht. In Abbildung 3 ist der Einfluß der zu den Blutproben gegebenen AA-Menge auf die Eicosanoidbiosynthese dargestellt. Ohne AA-Zusatz sind die gemessenen Metabolitenmengen um bis zu 50 % geringer als mit 10 μ M AA. Ob nun diese Steigerung vorwiegend durch die Eigenstimulation oder durch das erhöhte Substratangebot verursacht wird, ist mittels der vorliegenden Daten nicht eindeutig zu entscheiden.

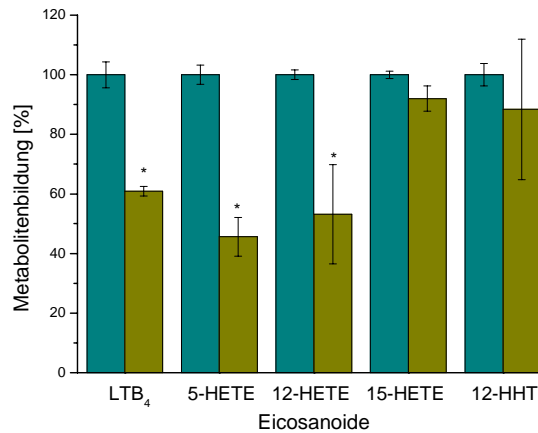


Abbildung 3: Abhängigkeit der Eicosanoidbildung vom AA-Zusatz
Blutproben ohne Inhibitorzusatz, sonstige Blutbearbeitung nach Standardvorschrift (n = 4)
cyan: 10 μ M AA (= 100 %), gelb: ohne AA-Zusatz

3.3.1.5 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von den Inkubationszeiten

Die Zeit, die den Enzymen nach ihrer Stimulation zur Metabolisierung der Arachidonsäure zur Verfügung steht, hat einen erheblichen Einfluß auf die in den Blutproben nachzuweisende Menge an Eicosanoiden. Die Inkubationsdauer muß für Vollblut entsprechend den Angaben in der Literatur wesentlich länger gewählt werden als in Zellassays, wo teilweise mit nur fünf Minuten Reaktionszeit gearbeitet wird. [Laufer 1995, Sweeney 1987 (1)] Bei den Betrachtungen über die Inkubationszeiten müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden: einerseits steigt die Metabolitenmenge an, je länger die Proben inkubiert werden; andererseits setzen Abbaureaktionen – insbesondere durch Enzyme der Cytochrom P450-Familie – ein, sobald Eicosanoide im Blut vorliegen. Die AA-Metaboliten sind im Blut recht kurzlebig. Da in einem Vollblutassay die komplette Enzymausstattung des menschlichen Blutes vorhanden ist, ist es als sicher anzunehmen, daß diese Abbauprozesse auftreten. [Lewis 1990, Shak 1985] Daher ist zu erwarten, daß mit Verlängerung der Reaktionszeit zunächst die Menge an nachweisbaren AA-Metaboliten zunimmt. Ab einem gewissen Zeitpunkt werden die Abbaureaktionen allerdings die Synthese der AA-Metaboliten überwiegen; einmal durch zunehmende Aktivierung der abbauenden Enzyme, zum anderen durch ein allmähliches Abflauen der Synthesereaktionen, wenn beispielsweise das Substrat verbraucht ist, so daß nunmehr geringere Eicosanoidmengen gemessen werden.

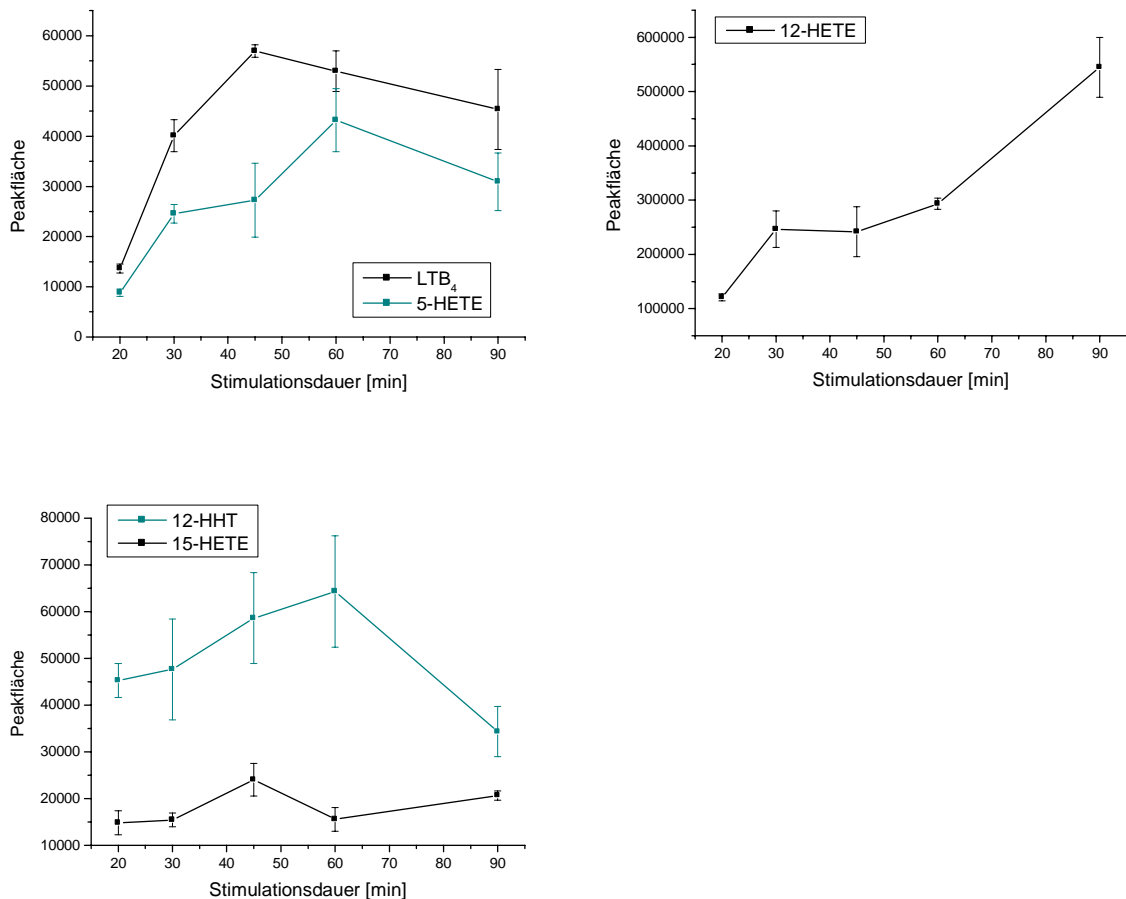


Abbildung 4: Abhängigkeit der Eicosanoidbildung von der Stimulationsdauer
Blutproben ohne Inhibitorzusatz, Stimulationszeiten: 20, 30, 45, 60, 90 min
sonstige Bedingungen nach Standardvorschrift (n = 3)

Abbildung 4 zeigt die zeitabhängigen Kurven für die Bildung der fünf im UV-Bereich detektierbaren Metaboliten. Es wurden Inkubationszeiten zwischen 20 und 90 Minuten gewählt. Die eingangs aufgestellte theoretische Betrachtung über den Kurvenverlauf wurde bestätigt. Der Zeitpunkt der maximalen Eicosanoidausbeute (der Knickpunkt in den Kurven) war nicht für alle fünf Metaboliten identisch. Er lag im Zeitraum zwischen 40 und 60 Minuten. Lediglich bei der 12-HETE ist kein Knickpunkt aufgetreten. Dagegen fand hier in der Zeit zwischen 60 und 90 Minuten die größte Steigerung der 12-HETE-Synthese statt. Da aber die 12-HETE der Metabolit ist, der in den Blutproben Peaks mit einer sehr großen Fläche ergibt, ist die Ausnutzung dieses Steigerungspotentials nicht notwendig. Für die Standarddurchführung der Versuche wurde eine Inkubationszeit von 40 Minuten gewählt.

3.3.1.6 Interindividuelle Unterschiede in der Hemmbarkeit der Metabolitenbildung

Bei der Arbeit mit biologischem Material sind eine Streuung und zufällige Schwankungen der erhaltenen Ergebnisse immer gegeben und nicht vermeidbar. Dies trifft auch auf die beschriebenen Untersuchungen zur Beeinflussung der Eicosanoidbiosynthese zu. Daher kann nicht erwartet werden, daß bei Testung einer Substanz in einer Konzentration mit dem Blut verschiedener Probanden exakt die gleichen Meßergebnisse erhalten werden. Selbst bei der Verwendung des Blutes eines einzigen Probanden an verschiedenen Tagen, ist mit dem Erhalt unterschiedlicher Ergebnisse zu rechnen. Patrignani beschreibt, daß selbst bei mehreren Blutabnahmen an einem Tag bei demselben Probanden Schwankungen in der gemessenen LTB_4 -Menge von 8 bis 15 % auftreten. [Patrignani 1987] Zur Ermittlung der Größe und Bedeutsamkeit dieser interindividuellen Unterschiede in der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten wurden die Standardsubstanzen Zileuton und Indometacin jeweils über vier Testdurchläufe hinweg mit dem Blut von vier Probanden in der Konzentration $2 \mu\text{M}$ mitgeführt. Die Lösungen der Testverbindungen wurden dabei vor der Testung immer frisch hergestellt.

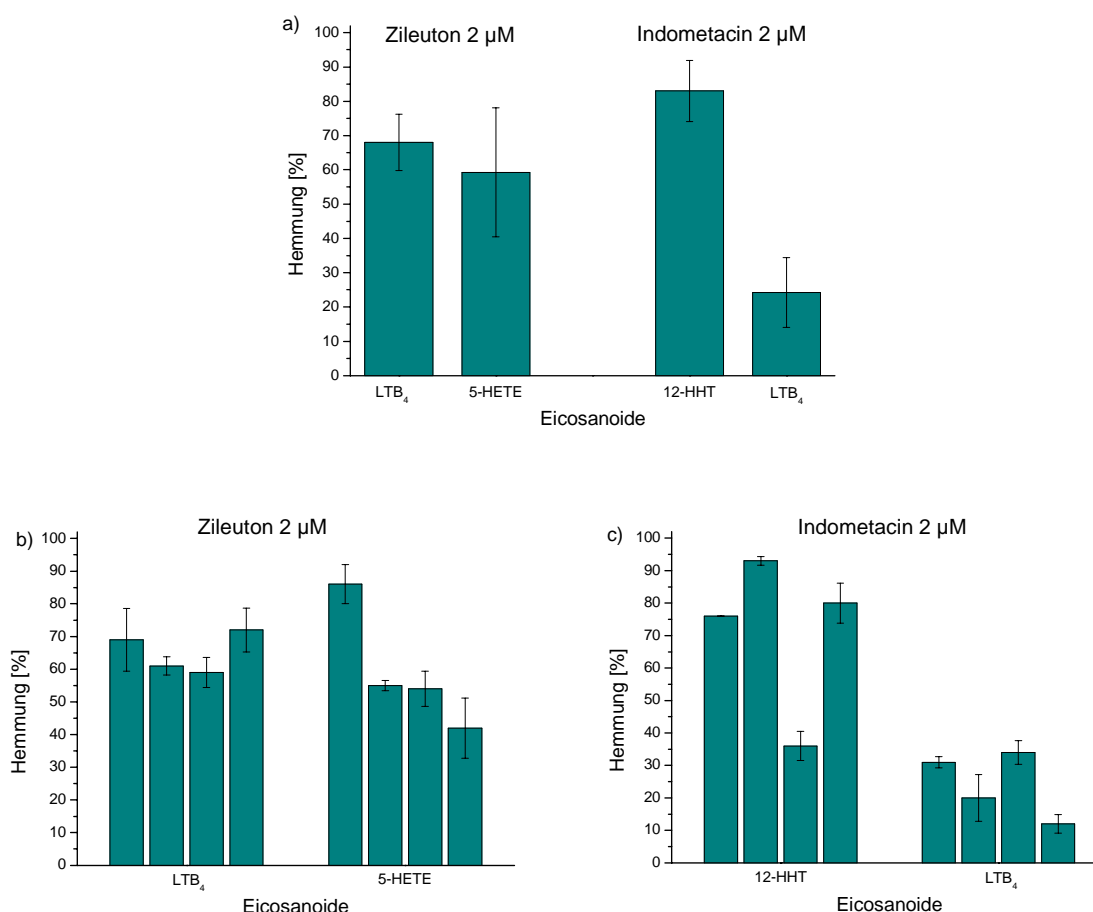


Abbildung 5: Interindividuell unterschiedliche Hemmbarkeit der Eicosanoidbiosynthese
 a) MW \pm SD mit Zileuton ($2 \mu\text{M}$) bzw. Indometacin ($2 \mu\text{M}$) versetzter Blutproben von vier Probanden für jeweils zwei Metaboliten ($n = 4$)
 b) Darstellung der vier Einzelwerte für Zileuton (MW \pm SD, $n = 3$)
 c) Darstellung der vier Einzelwerte für Indometacin (MW \pm SD, $n = 3$)

In Abbildung 5a sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse aus den vier getrennten Testläufen für jeweils zwei Metaboliten dargestellt. Die Standardabweichungen haben Werte von weniger als $\pm 10\%$ bzw. ein Wert mit $\pm 19\%$. Damit liegen sie im für biologisches Material akzeptablen Bereich. Zusätzlich sind die einzelnen Meßwerte der vier Testreihen in der Abbildung 5b,c graphisch dargestellt.

3.3.2 Abstoppen der Enzymreaktionen

Üblicherweise werden Enzymreaktionen abgestoppt, indem eiskalte organische Lösungsmittel zur Proteinfällung zu den Proben gegeben werden. Meist kommen Acetonitril oder Methanol zum Einsatz. Da organische Lösungsmittel einen ungünstigen Einfluß auf die anschließende Festphasenextraktion haben (s. unten), sollte die zugegebene Menge Acetonitril bzw. Methanol möglichst gering gehalten werden. Dazu wurde in einem Experiment am Beispiel des Methanol untersucht, welche Menge Lösungsmittel zum Abstoppen der Enzymreaktionen ausreichend ist. In den Literaturvorschriften sind Lösungsmittelmengen von 1 bis 5 ml [Kürschner 1998, Müller 1995] angegeben. Auch der vollständige Verzicht auf die Zugabe von Methanol und das Abstoppen allein durch schnelles Einfrieren der Proben bzw. das rasche Abkühlen in Eiswasser ist beschrieben worden. [Kikawa 1989, Sirois 1991]

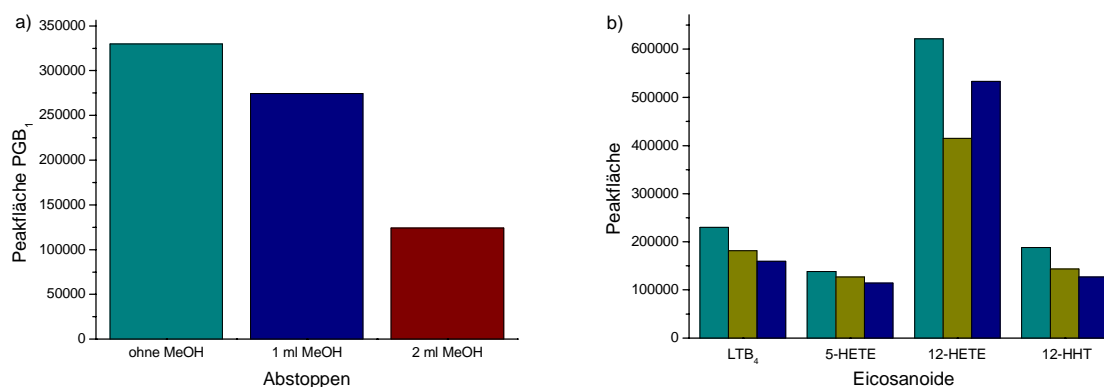


Abbildung 6: Einfluß der zum Abstoppen der Reaktion benutzten Methanolvolumenmenge auf die wiedergefundenen Eicosanoidmengen. Blutproben ohne Inhibitorzusatz, sonstige Bearbeitung der Blutproben nach Standardvorschrift (n = 2)

- a) Wiederfindung des internen Standards PGB₁
 b) Wiederfindung der im Blut gebildeten Eicosanoide
 Abstoppen: cyan: ohne MeOH, gelb: mit 0,5 ml MeOH,
 blau: mit 1 ml MeOH, rot: mit 2 ml MeOH

Zunächst wurde nur die Wiederfindung des internen Standards PGB₁ nach Abstoppen der Reaktionen mit 1 und 2 ml Methanol und ohne Methanol betrachtet (Abbildung 6a). Ausgehend von den in diesem Experiment erhaltenen Ergebnissen wurden weitere vergleichende Untersuchungen mit geringeren Methanoldmengen vorgenommen. Dabei wurden die Wiederfindungsraten der vom Blut gebildeten Eicosanoide nach Abstoppen der Reaktionen mit 0,5 und 1 ml Methanol und ohne Methanol gemessen (Abbildung 6b).

Die höchsten Wiederfindungsraten wurden jeweils in den Proben gefunden, denen kein Methanol zugesetzt wurde. Bei der Routinetestung wurde das Abstoppen der Enzymreaktionen mit 0,5 ml eiskaltem Methanol durchgeführt. Mit dem Methanol wurde der interne Standard PGB₁ zugegeben, weswegen nicht komplett auf die Zugabe des Lösungsmittels verzichtet werden konnte.

3.3.3 Extraktion der Eicosanoide

Ein die Qualität der Meßergebnisse entscheidend beeinflussender Faktor in der Durchführung der Vollbluttestung ist die Vorbereitung der Blutproben für die HPLC-Analytik. Da eine direkte Aufnahme des Blutes auf die HPLC-Säule nicht möglich ist, müssen die Eicosanoide, die während der Stimulationsphase gebildet wurden, auf geeignete Art und Weise aus der Matrix extrahiert werden, um anschließend der HPLC-Analytik zugeführt werden zu können. Diese Extraktion der Arachidonsäure-Metaboliten aus dem Blut hat einen erheblichen Einfluß auf die Wiederfindungsraten, die mit dem Testsystem erreicht werden. Zwei Methoden sind für die Extraktion der Eicosanoide aus dem menschlichen Blut gebräuchlich: Festphasenextraktion (SPE) an RP-18-Säulen [Kikawa 1989, Metz 1982] und flüssig-flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, z.B. Ethylacetat. [Huwyler 1990] In den folgenden Untersuchungen wurden die Festphasenextraktion und die flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat hinsichtlich der Wiederfindungsraten miteinander verglichen. Mit dem Ziel der Steigerung der Metabolitenausbeute wurden für die Festphasenextraktion gleichzeitig die Durchführungsbedingungen optimiert.

3.3.3.1 Festphasenextraktion

Umfangreiche Untersuchungen zur Festphasenextraktion von Eicosanoiden wurden von Eskra und Luderer [Eskra 1986, Luderer 1983] durchgeführt. Die Arbeitsschritte bei einer Festphasenextraktion sind:

- Konditionierung der RP-18-Säulen,
- Aufbringen der vorbereiteten Blutproben,
- Entfernen der polaren Bestandteile durch Spülen der Säulen mit hydrophilen Lösungsmitteln (meist mit Wasser bzw. Methanol-Wasser-Gemischen),
- Elution der Eicosanoide mit organischem Lösungsmittel.

3.3.3.1.1 Konditionierung der RP-18-Säulen

Die Konditionierung neuer RP-18-Säulen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers der Säulen. Jeweils 10 ml Methanol und 10 ml Wasser wurden nacheinander mit mittlerem Unterdruck durch die Säulen gesaugt. Der teilweise praktizierte zusätzliche Waschschrift mit 25 %-igem Methanol [Steinhilber 1989] beeinflusste die Ergebnisse nicht und wurde deshalb nicht vorgenommen.

3.3.3.1.2 Vorbereiten der Blutproben durch Ansäuern

Mit dem Ansäuern der Blutproben soll sichergestellt werden, daß die Arachidonsäuremetaboliten in undissoziierter Form vorliegen, was Voraussetzung für deren Extrahierbarkeit ist. In der Literatur sind sowohl die Extraktion ohne vorheriges Ansäuern der Blutproben [Fruchtman 1993] als auch das Ansäuern mit verdünnten organischen bzw. anorganischen Säuren beschrieben. Es wird mit Essigsäure [Kupfer 1996], Ameisensäure [Luderer 1983], Salzsäure [Herrmann 1987] u.a. gearbeitet.

Problematisch ist jedoch die ungenügende Stabilität der Eicosanoide im sauren Milieu, die von Osborne in Zusammenhang mit der Festphasenextraktion untersucht wurde. [Osborne 1983] pH-Werte unter 5 lassen stabilitätsbedingt eine nur noch sehr geringe Wiederfindungsrate für die Eicosanoide zu.

Welche der genannten Säuren für das Testsystem den günstigsten Einfluß auf die Wiederfindungsraten hat, sollte mit den nachfolgend beschriebenen Versuchen geklärt werden.

Das Prostaglandin PGB₁ wurde in PBS-Puffer in der gleichen Weise behandelt wie in der Testvorschrift für das Blut angegeben. Im Vergleich zu einer Probe PGB₁, die nicht der Festphasenextraktion unterzogen wurde, wurden die Wiederfindungsraten errechnet.

Zum Ansäuern der Lösungen vor der Festphasenextraktion erwies sich 0,1 %-ige Salzsäure als am besten geeignet. Hiermit wurde eine Wiederfindungsrate von nahezu 100 % erreicht, (Abbildung 7). Höher konzentrierte Salzsäure verringerte die wiedergefundene PGB₁-Menge um 20 %. Mit Essigsäure und Ameisensäure konnten nur vergleichsweise geringe Wiederfindungsraten erzielt werden. Trifluoressigsäure brachte ebenso wie der vollständige Verzicht auf das Ansäuern der Proben eine ähnliche Wiederfindungsrate wie die mit stärker konzentrierter Salzsäure versetzten Proben.

Durch höhere Essigsäurekonzentrationen verringerte sich die wiedergefundene Menge PGB₁ drastisch. Mit 1 %-iger Essigsäure gingen die gemessenen Wiederfindungsraten gegen Null. Dies läßt sich damit begründen, daß durch das Ansäuern mit Essigsäure der pH-Wert der Blutproben stärker absinkt als beim Ansäuern mit Salzsäure gleicher prozentualer Konzentration. Da die Stabilität der Eicosanoide im sauren Milieu gering ist, liegt die Vermutung nahe, daß beim Ansäuern mit 1 %-iger Essigsäure der saure pH-Wert zum Zerfall der Metaboliten führt. Das PGB₁ weist von den zu erfassenden Eicosanoiden die größte Stabilität auf. [Wobst 2003]

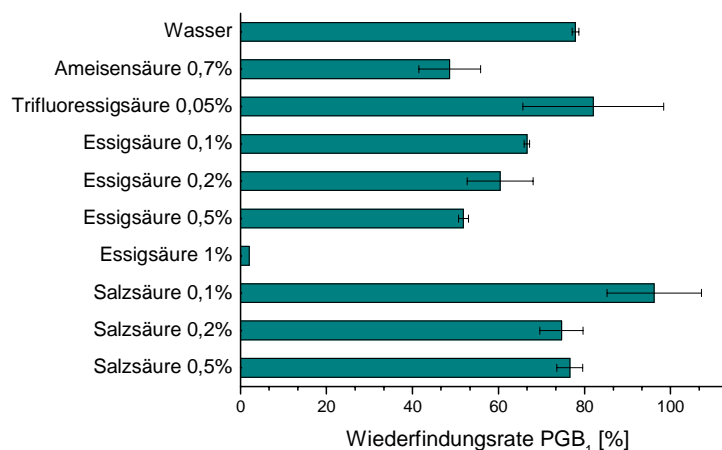


Abbildung 7: Einfluß des Ansäuerns auf die Wiederfindungsrate des PGB₁ nach Festphasenextraktion (n = 4)
PGB₁ in PBS-Puffer, Festphasenextraktion und HPLC nach Standardvorschrift

3.3.3.1.3 Spülen der RP-18-Säulen zum Entfernen polarer Blutbestandteile

Das Spülen der Festphasensäulen zum Entfernen hydrophiler Blutbestandteile, die die HPLC-Analytik stören würden, wird gewöhnlich mit Wasser vorgenommen. In zahlreichen Literaturvorschriften wird vor der Elution der AA-Metaboliten ein zusätzlicher Spülschritt mit wäßriger Methanollösung durchgeführt. [Fruchtmann 1993] In vergleichenden Untersuchungen wurden die Festphasensäulen mit 5 %, 10 % und 25 % Methanol gespült. Dabei zeigte sich jedoch, daß dieser zusätzliche Spülschritt keinen Einfluß auf die Wiederfindung der AA-Metaboliten hat. (s. Abbildung 8, Kap. 3.3.3.1.4) In der Routinetestung wurde dieser Spülschritt daher nicht durchgeführt.

3.3.3.1.4 Elution der Eicosanoide

Die AA-Metaboliten wurden mit 1000 µl absolutem Methanol, das in drei Portionen (400 µl + 400 µl + 200 µl) auf die Säulen gegeben wird, von den Festphasensäulen eluiert. Versuche mit einer geringeren Menge Methanol ergaben, daß mindestens 600 µl Methanol zur Elution verwendet werden sollten, um sicherzustellen, daß die Eicosanoide vollständig von den Festphasensäulen gewaschen werden. Größere Volumina Methanol haben keinen signifikanten Einfluß auf die Wiederfindungsraten (Abbildung 8).

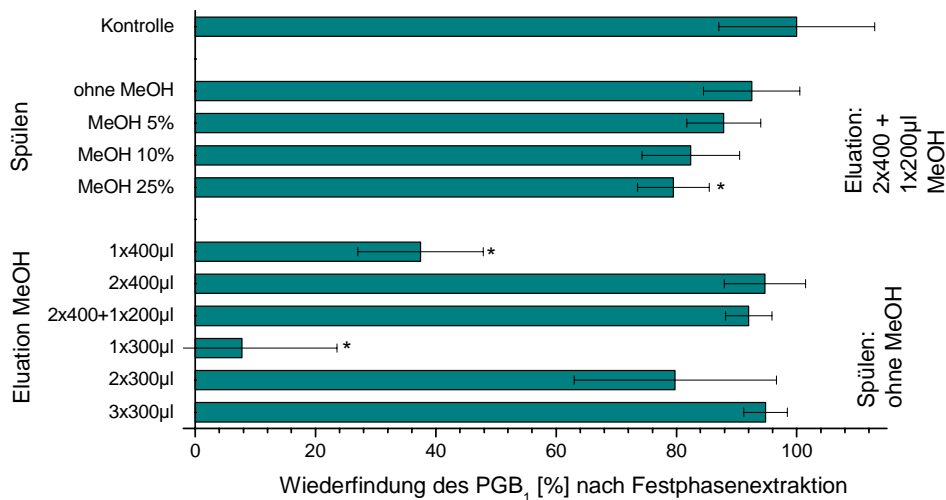


Abbildung 8: Einfluß des Spülens und der Elution auf die Wiederfindungsraten des PGB₁ nach Festphasenextraktion (n = 3), Kontrolle: Proben ohne SPE PGB₁ in PBS-Puffer, HPLC nach Standardvorschrift

Die über den gesamten Versuchsablauf erreichten Wiederfindungsraten bezogen auf PGB₁ lagen bei Durchführung der Standardmethode zwischen 70 und 90 %, was den Literaturangaben entspricht. [Celardo 1994] Kritischster Punkt für die Höhe der Wiederfindungsraten war dabei die Festphasenextraktion. Von daher sind die Testsysteme, die die AA-Metaboliten mit einem Immuno-Assays detektieren, bevorteilt, da hier die Extraktion der Eicosanoide entfallen kann. Ein wesentlicher Kostenfaktor für die Durchführung der routinemäßigen Vollbluttestung mit dem vorgestellten Testsystem ist die Wiederverwendbarkeit der RP-18 Festphasensäulen. Prinzipiell können die Säulen vier- bis fünfmal verwendet werden, wenn nicht vorher eine Verstopfung durch Blutbestandteile, z.B. Zellreste, die nicht vollständig abzentrifugiert wurden, auftritt. Für das als interner Standard verwendete PGB₁ wurden neue mit schon mehrfach (zwei- bis viermal) verwendeten Festphasensäulen hinsichtlich der Wiederfindung verglichen. In Abbildung 9a sind die Mittelwerte der in der Routinetestung erzielten Wiederfindungsraten des PGB₁ mit neuen und mehrfach verwendeten Säulen gegenübergestellt. Abbildung 9b zeigt die Wiederfindungsraten von in PBS-Puffer aufgenommenem PGB₁ nach Extraktion mit unbenutzten und benutzten Säulen. Zwischen den beiden Probengruppen sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Im Trend ist eine geringfügig bessere Wiederfindung für die unbenutzten Säulen zu beobachten.

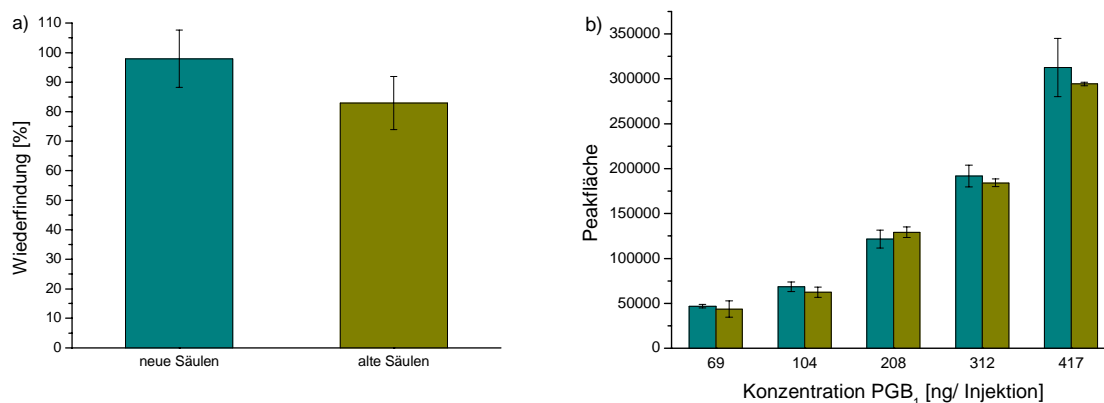


Abbildung 9: Vergleich der Wiederfindungsraten des zugesetzten PGB₁ bei der Festphasenextraktion mit neuen (cyan) und mehrfach verwendeten (gelb) Säulen
 a) Wiederfindung des PGB₁ in Blutproben aus der Routinetestung (208 ng/ Injektion) (n = 10)
 b) PGB₁ in Puffer, behandelt nach Standardvorschrift (n = 6)

Durch eine Modifikation der Festphasenextraktion ist es prinzipiell möglich, zusätzlich die Peptido-Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ zu erfassen. Dazu muß bei der Konditionierung der RP-18-Säulen EDTA aufgebracht werden. [Kikawa 1989, Verhagen 1986] Bei der HPLC-Analytik eluieren diese drei Metaboliten sehr stark pH-abhängig. Somit ist im Chromatogramm mit der Überlagerung mit anderen Peaks zu rechnen. Da die Bildung der Peptido-Leukotriene zudem eine längere Stimulationszeit beansprucht, wurde darauf verzichtet, diese Eicosanoide zu quantifizieren.

3.3.3.2 Flüssig-flüssig-Extraktion

Gegenüber der Festphasenextraktion ist die flüssig-flüssig-Extraktion mit weniger Arbeitsaufwand verbunden. Es werden 2 ml Lösungsmittel zu dem Blut gegeben, gut geschüttelt, zentrifugiert und das Lösungsmittel abgenommen. Dies wird noch zweimal mit 1,5 ml Lösungsmittel wiederholt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und die Festphasenextraktion gleichwertig sind. Dazu wurden aus den Blutproben ohne Inhibitor die Eicosanoide mittels Festphasenextraktion und mittels Extraktion mit Ethylacetat separiert. Die beiden Extraktionsmethoden wurden zum einen anhand der Peakflächen des internen Standards PGB₁ und zum anderen mittels der Ausbeuten der übrigen AA-Metaboliten miteinander verglichen. Abbildung 10 zeigt die Gegenüberstellung der erhaltenen Ergebnisse. Die mit flüssig-flüssig-Extraktion erreichten Wiederfindungsraten des PGB₁ lagen erheblich unter denen der Festphasenextraktion. Das gleiche wurde auch für die beiden im Blut gebildeten AA-Metaboliten LTB₄ und 15-HETE festgestellt. Die anderen Eicosanoide 5-HETE, 12-HETE und 12-HHT ließen sich mit der Methode der flüssig-flüssig-Extraktion teilweise erheblich besser abtrennen. Die Schwankungsbreite der Peakflächen nach flüssig-flüssig-Extraktion war in allen Fällen deutlich größer als nach Festphasenextraktion.

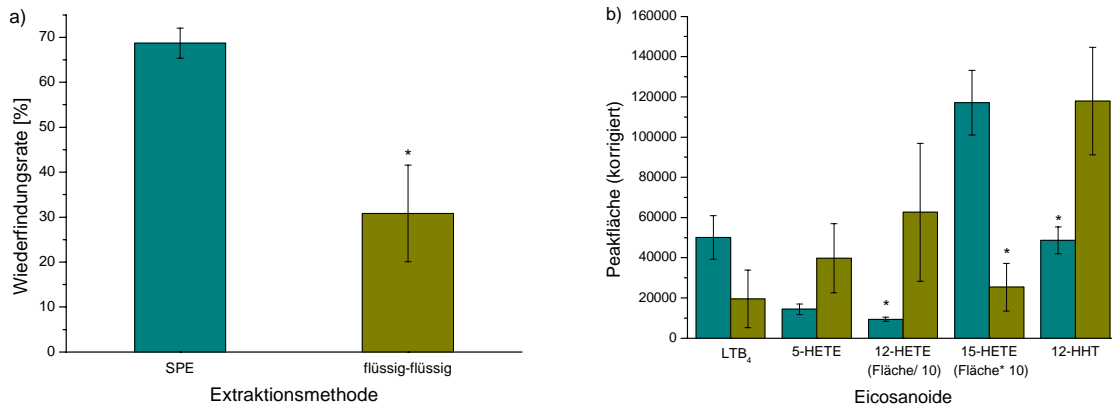


Abbildung 10: Vergleich der Festphasenextraktion (cyan) mit der flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat (gelb) (n = 4)
 a) Wiederfindung des internen Standards PGB₁
 b) Peakflächen der im Blut gebildeten Eicosanoide

Entscheidender Faktor zur erfolgreichen Durchführung einer flüssig-flüssig-Extraktion ist die Einstellung des optimalen pH-Wertes. Möglicherweise wäre ein stärker saurer pH-Wert für die Extraktion des LTB₄ und der 15-HETE günstiger. Das würde aber wiederum die Stabilität der Metaboliten negativ beeinflussen (vgl. Kapitel 3.3.3.1.2).

Ein Nachteil der Lösungsmittelextraktion ist, daß die Chromatogramme durch die Extraktion vieler extrem lipophiler Bestandteile aus dem Blut wesentlich unsauberer sind als nach Festphasenextraktion. Dadurch ist die Auswertung erheblich erschwert und ein Spülen der HPLC-Säule wird häufiger erforderlich.

3.3.3.3 Vergleich der beiden Extraktionsmethoden

Vergleichende Untersuchungen zur Festphasenextraktion und flüssig-flüssig-Extraktion wurden bereits von Verhagen et al. durchgeführt. [1986] Diese Gegenüberstellung zwischen Festphasenextraktion mit RP-18-Säulen zweier unterschiedlicher Hersteller, Amberlite XAD-8-Extraktion und Extraktion mit Diethylether zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Wiederfindungsraten, die mit den einzelnen Methoden erzielt wurden. Die Festphasenextraktion und die Amberlite XAD-8-Extraktion ermöglichten eine Wiederfindung von über 90 % für alle gemessenen Metaboliten. Die flüssig-flüssig-Extraktion mit Ether dagegen ergab für einige der untersuchten Eicosanoide nur eine Wiederfindung von weniger als 20 %.

Der Unterschied zwischen den beiden Methoden wird auch bei der vergleichenden Auswertung der in den Kapiteln 3.3.3.1 und 3.3.3.2 vorgenommenen Untersuchungen deutlich. Die flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat ließ bei zwei Eicosanoiden und dem internen Standard Wiederfindungsraten erreichen, die verglichen mit der Festphasenextraktion nur etwa die Hälfte betragen. Die anderen AA-Metaboliten wurden bei Anwendung der Festphasenextraktion in

geringerem Maße wiedergefunden als bei der flüssig-flüssig-Extraktion. Bei letzterer waren wiederum größere Schwankungen in den Wiederfindungsraten zu verzeichnen, was in der Abbildung 10 durch die größeren Standardabweichungen sichtbar wird. Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Befunden aus der Literatur.

Der Extraktionsschritt der Eicosanoide nimmt eine Schlüsselrolle für die Qualität der gesamten Testmethode ein. Es wurde daher die Entscheidung getroffen, trotz des größeren Aufwandes und der Mehrkosten die Eicosanoide in der Routinetestung mittels Festphasenextraktion zu isolieren. Damit sollten die besseren und vor allem konstanteren Wiederfindungsraten, besonders die des internen Standards PGB₁ ausgenutzt werden, um genauere Ergebnisse zu erzielen.

3.3.4 Abdampfen des Lösungsmittels vor der HPLC-Analytik

Um die Proben vor der Quantifizierung in einem definierten Volumen Methanol aufnehmen zu können, muß vor der HPLC-Analytik das Extraktions- bzw. Eluationsmittel entfernt werden.

Folgende Methoden zum Abdampfen des Methanols wurden miteinander verglichen:

- Abdampfen im Abdampfblock unter Argonstrom bei 38 °C,
- Abdampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur unter Argonstrom,
- Entfernen des Lösungsmittels im Vakuumkonzentrator.

Bei den drei untersuchten Abdampfvarianten waren Verluste von maximal 10 % zu verzeichnen. Die erzielten Ergebnisse waren mit allen drei untersuchten Methoden nahezu identisch. Daher fiel Entscheidung für die routinemäßige Anwendung des Abdampfens im Abdampfblock unter Argonstrom bei 38 °C allein nach durchführungspraktischen Gesichtspunkten.

3.3.5 HPLC-Analytik

Bei den Betrachtungen zur HPLC-Analytik wurden zwei Detektionsmethoden näher untersucht. Zunächst wird im Kapitel 3.3.5.2 die Detektion der Eicosanoide im UV-Wellenlängenbereich von 230 bis 280 nm vorgestellt. Als zweites wird auf die fluorimetrische Detektion der AA-Metaboliten nach Derivatisierung mit dem Fluoreszenzmarker 4-Brommethyl-7-methoxycumarin (BrMMC) eingegangen (Kapitel 3.3.5.3).

Zur Quantifizierung der Eicosanoide wurde in allen Fällen ein interner Standard verwendet.

3.3.5.1 Interner Standard

Bei der Durchführung quantitativer Analytik ist es unerlässlich, eine Standardsubstanz mitzuführen. Es gibt die Möglichkeit der Verwendung eines internen oder eines externen Standards. Während ein externer Standard für ein Vollbluttestsystem eher ungeeignet erscheint, hat das Mitführen eines internen Standards in jeder einzelnen Analysenprobe durch sämtliche Arbeitsschritte der Testung den Vorteil, daß Schwankungen bei der Durchführung der Testung von Probe zu Probe (z.B. in der Wiederfindung) durch Korrektur der Meßwerte gegen den Standardwert direkt berücksichtigt werden. An eine Substanz, die als interner Standard eingesetzt werden soll, sind folgende Anforderungen zu stellen: [Haefelfinger 1981]

- eine den zu analysierenden Substanzen ähnliche chemische Struktur,
- kein Auftreten der Substanz in der analytischen Matrix, z.B. als Metabolisierungsprodukt der zu untersuchenden Enzyme,
- HPLC-Retentionszeit in der Nähe der zu analysierenden Substanzen, aber nicht gleichzeitig mit diesen,
- ausreichende Stabilität über den gesamten Testzeitraum.

Für die Durchführung analoger Testungen sind in der Literatur verschiedene Substanzen als interner Standard vorgeschlagen. Häufig genutzt werden das PGB₂ bzw. seine hydroxylierten Derivate (19-OH-PGB₂) [Borgeat 1988, Fruchtmann 1993] oder das PGB₁ [Kiss 1998, Werz 1998]. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Testsystem wurde als interner Standard PGB₁ verwendet. Dieses Prostaglandin wird im physiologischen Verlauf des Arachidonsäurestoffwechsels nicht gebildet, ist jedoch als Prostaglandin den zu erfassenden Metaboliten strukturell ähnlich. Die Substanz hat ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei der Wellenlänge 280 nm, was eine einfache Detektion ermöglicht. PGB₁ ist polarer als die anderen zu erfassenden AA-Metaboliten und eluiert daher in der RP-HPLC geringfügig vor den im Blut gebildeten Eicosanoiden. Die Stabilität über den Testzeitraum wurde im Rahmen der Validierung des Testsystems nachgewiesen (s. Kap. 3.3.6.1.1). Weiterhin wurde überprüft und sichergestellt, daß der PGB₁-Peak nicht durch interne und externe Störfaktoren, wie z.B. andere zu diesem Zeitpunkt eluierende Blutbestandteile, beeinträchtigt wird und daß im aufgearbeiteten Vollblut nichts enthalten ist, das eventuell den PGB₁-Peak vortäuschen oder scheinbar vergrößern könnte.

3.3.5.2 UV-Detektion

Die am einfachsten durchführbare Methode der Detektion nach HPLC-Auftrennung ist die UV-photometrische Erfassung der Eicosanoide. Ein gravierender Nachteil dieser Methode ist, daß das Absorptionsmaximum der für eine Testung durchaus interessanten COX-Metaboliten Thromboxan B₂ und die Prostaglandine E₂ und D₂ bei der Wellenlänge 192,5 nm und damit unterhalb der Grenze des mit den verfügbaren Mitteln realisierbaren Meßbereichs von 220 nm liegt. Soll auf eine Derivatisierung der Eicosanoide verzichtet werden, kann mit entsprechenden Detektoren und bei günstiger Auswahl des HPLC-Laufmittels auch die UV-spektroskopische Erfassung von

Metaboliten mit solch einem kurzweiligen Absorptionsmaximum vorgenommen werden, wie von Kim beschrieben wurde. [1998] Ein COX-Metabolit mit einem Absorptionsmaximum im UV-photometrisch erfaßbaren Wellenlängenbereich ist die 12-HHT ($\lambda_{\max} = 230 \text{ nm}$). Die Quantifizierung des COX-Produktes 12-HHT, um die Aktivität der COX zu bestimmen, ist in der Literatur nur vereinzelt beschrieben worden. [Dannhardt 1992] Randall et al. haben jedoch in vergleichenden Untersuchungen bei Inhibition des COX-Stoffwechselweges mit dem NSAR Indometacin identische Hemmkurvenverläufe für das Prostaglandin E_2 und die 12-HHT erhalten, was den Bezug der COX-Testung auf die 12-HHT rechtfertigt. [Randall 1980]

Dagegen besitzen die relevanten LOX-Produkte ein Absorptionsmaximum oberhalb von 220 nm, so daß eine problemlose UV-Detektion möglich ist. Von Vorteil ist hierbei der Einsatz eines Dioden-Array-Detektors (DAD), mit dem über den Bereich von 200 bis 300 nm oder gegebenenfalls darüber hinaus das gesamte Spektrum des Eluates aufgezeichnet werden kann. Damit ist es im Zuge der Auswertung möglich, anhand der typischen UV-Spektren der Eicosanoide deren Identität zu sichern. Dies kann beim Arbeiten mit Vollblut sehr hilfreich sein, um Fehlinterpretationen zu vermeiden, da recht häufige und unregelmäßig auftretende zusätzliche Peaks im Eluationszeitraum der Metaboliten die Auswertung der Chromatogramme erschweren können.

Für die HPLC-Trennung langkettiger Carbonsäuren empfiehlt es sich, ein Methanol-Laufmittel zu verwenden. [Aced 1991, Metz 1982] Beschrieben sind auch Laufmittel auf Acetonitril- oder THF-Basis. [Yamaguchi 1989, Verhagen 1986]

Im einfachsten Fall erfolgt die HPLC-Trennung mit einem isokratischen Laufmittel bestehend aus 78 % Methanol, 22 % Wasser, 0,01 % Essigsäure und einem Laufmittel-Fluß von 1,0 ml/ min. [Kupfer 1996] Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß hierbei die Peaks der zeitig eluierenden Metaboliten (PGB_1 und LTB_4) oftmals durch Störpeaks überlagert sind. Auch einige der getesteten Inhibitoren eluieren in diesem Zeitintervall, was unter Umständen die Auswertung der Chromatogramme erschweren oder gar unmöglich machen kann. Abhilfe kann die Verwendung eines polareren Laufmittelgemisches schaffen. Dies wurde mit der Mischung Methanol / Wasser / Essigsäure 70 / 30 / 0,1 (V/V) praktiziert. [Steinhilber 1989] Dadurch verlängerte sich allerdings die Analysenzeit besonders für die spät eluierenden Metaboliten (HETEs) deutlich (> 70 Minuten).

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, ist die Nutzung eines Laufmittelgradienten. Um die Trennung der zeitig eluierenden Metaboliten und der untersuchten Inhibitoren zu verbessern, wurde zu Beginn eines jeden HPLC-Laufes die Hydrophilie des Laufmittels im Vergleich zu dem oben genannten 78 %-igen Methanol erhöht. Ab dem Mittelteil der Chromatogramme kam wieder ein höherer Methanolanteil im Laufmittelgemisch zum Einsatz. Dadurch konnte die Analysenzeit für alle fünf untersuchten Arachidonsäuremetaboliten unter 30 Minuten gehalten werden. Da die Peaks, besonders der spät eluierenden Metaboliten, die Tendenz zu einer starken Verbreiterung haben, wurde mit Erhöhung des Methanolanteils gleichzeitig der Laufmittelfluß auf 1,5 ml/ min gesteigert, was sich positiv auf die erhaltenen Peakbreiten auswirkte. Das Ergebnis, ein Chromatogramm einer Blutprobe nach ungehemmter Reaktion und im Vergleich ein Chromatogramm nach gehemmter Reaktion (Substanz **T13**, Struktur s. Anhang Tabelle 20), zeigt die Abbildung 11. Die Zuordnung der Peaks zu den Eicosanoiden erfolgte anhand kommerziell erworbener Referenzsubstanzen durch Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren. Mit dem vorgeschlagenen Laufmittelgradienten war die HPLC-Analytik einer Blutprobe innerhalb von

30 Minuten möglich.

Mit einem Test auf Reinheit der Peaks wurde überprüft, ob die detektierten Peaks zur Quantifizierung der AA-Metaboliten genutzt werden können. Dazu wurden mit dem DAD die UV-Spektren am Anfang, in der Mitte und am Ende des eluierenden Peaks aufgezeichnet und übereinandergelegt. Die dabei erhaltenen Spektren waren deckungsgleich. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Peaks nur von einer einzigen Substanz gebildet wurden, also rein waren.

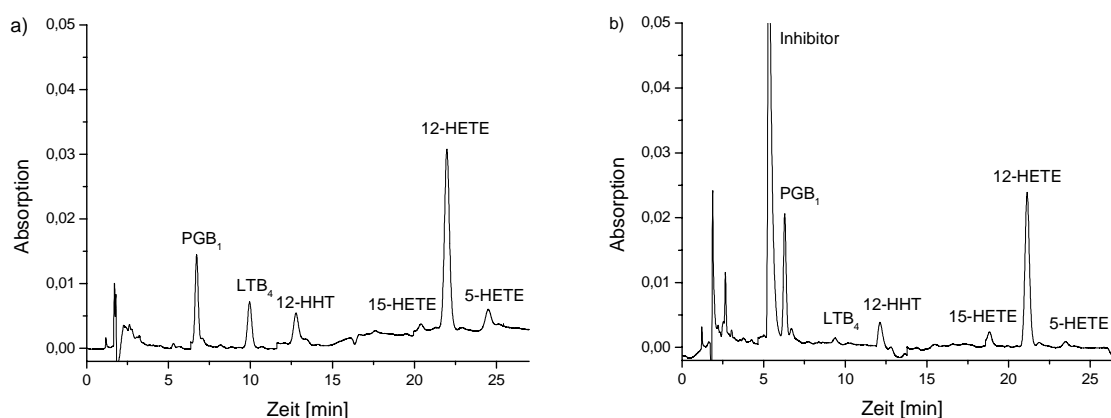


Abbildung 11: Beispielchromatogramme: HPLC-Analytik mit UV-Detektion, Blutproben nach a) ungehemmter und b) mit Verbindung **T13** (10 μ M) gehemmter Reaktion, Bearbeitung der Blutproben nach Standardvorschrift

3.3.5.3 Fluoreszenzdetektion

Der Nachteil der UV-Detektion, daß aufgrund der kurzwelligen Absorptionsmaxima nur einige der Eicosanoide erfaßt werden können, kann umgangen werden, indem vor der HPLC-Analytik eine Derivatisierung der AA-Metaboliten vorgenommen wird. Dafür gibt es folgende Möglichkeiten: die Markierung mit einem Chromophor, um die UV-Detektion zu ermöglichen, oder die Derivatisierung mit einem Fluoreszenzmarker. Die Carboxylgruppe, die in allen im Rahmen der Testung interessierenden Eicosanoiden vorhanden ist, stellt eine für Derivatisierungsreaktionen prädestinierte Struktur dar. So ist es nicht verwunderlich, daß alle in der Literatur beschriebenen Derivatisierungsverfahren darauf ausgerichtet sind, die Carboxylfunktion umzusetzen. (Übersichten in [Mukherjee 1996, Toyo'oka 1995, Yasaka 1994])

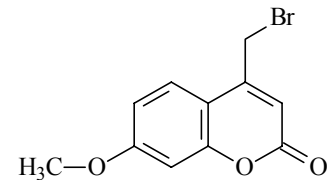
Für die Fluoreszenzmarkierung von Carbonsäuren ist in der Literatur eine Vielzahl von Reagenzien beschrieben. [Engels 1988, Wolf 1992] Die Fluoreszenzmarker gehören zu verschiedenen chemischen Strukturgruppen. Gebräuchlich sind Cumarinanalogue, Alkylhalogenide, Amine, Phenanthrenanalogue, Anthracenanalogue, Diazoalkane und andere. [Mukherjee 1996, Toyo'oka 1995] Für die Untersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung in dieser Arbeit sollte ein Marker gewählt werden, der kommerziell erhältlich, nicht zu kostenintensiv, über einen längeren Zeitraum ausreichend stabil und von der Derivatisierungsreaktion her einfach zu handhaben ist. Die vorgeannten Kriterien werden am besten von dem Cumarinderivat 4-Brommethyl-7-methoxycumarin

(4-Brommethyl-7-methoxy-2-oxo-2H-benzo-pyran, BrMMC; Schema 22) [McGuffin 1985, Turk 1978] erfüllt, so daß dieses Reagenz zur Entwicklung einer HPLC-Methode mit Fluoreszenzmarkierung ausgewählt wurde.

Als Fluoreszenzlabel wurde BrMMC von Dünge im Jahr 1977 erstmals beschrieben. [Dünge 1977 (1)] Es wurde in zahlreichen Arbeiten zur Fluoreszenzmarkierung sowohl aliphatischer als auch aromatischer Carbonsäuren genutzt. [Wolf 1992, Wolf 1990]

Ein Nachteil dieser Verbindung ist allerdings, daß die Erfassungsgrenze nicht so niedrig ist, wie es mit anderen Markern und unter Verwendung einer laserinduzierten Fluoreszenz möglich wird. Nur hätte der Einsatz eines empfindlicheren Markers weit mehr Aufwand für die Versuchsdurchführung bedeutet, da diese größtenteils frisch hergestellt werden müssen oder eine aufwendigere Derivatisierung erfordern. Dies hätte dem Ziel der Arbeit, ein einfach und mit wenig Zeitaufwand nutzbares Testsystem zu entwickeln, widersprochen.

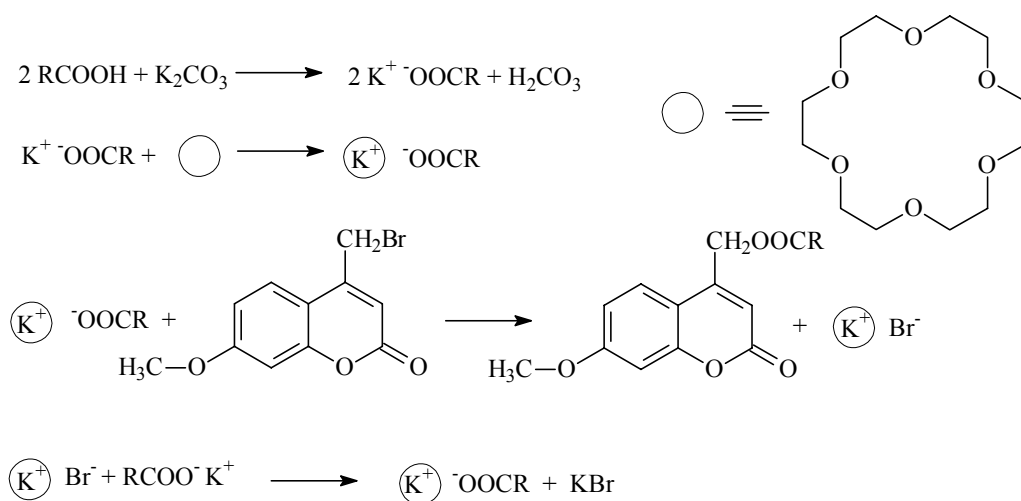
In den folgenden Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob die Fluoreszenzmarkierung der Eicosanoide gegenüber der UV-Detektion ohne Derivatisierung entscheidende Vorteile hinsichtlich Erfassungsgrenze und Empfindlichkeit bringt.



Schema 22: 4-Brommethyl-7-methoxycoumarin (BrMMC)

3.3.5.3.1 Optimierung des Derivatisierungsvorgangs

Der Derivatisierungsvorgang mit dem Fluoreszenzmarker BrMMC wurde zunächst analog den in der Literatur angegebenen Arbeitsvorschriften durchgeführt. [Lam 1978, Wolf 1990] Den Reaktionsmechanismus zeigt das Schema 23. [Wolf 1992]



Schema 23: Reaktionsschema der Fluoreszenzmarkierung von Carbonsäuren mit BrMMC

Als Katalysator für diese Reaktion dient der Kronenether 18-Krone-6, der eine Phasengrenz-katalyse, auch als Mizellare Katalyse bezeichnet, bewirkt. [Durst 1975, van der Horst 1989] Die Umsetzung läuft im basischen Milieu ab, wobei sich die Auswahl der verwendbaren Basen auf Kaliumcarbonat und -hydrogencarbonat bzw. Triethylamin beschränkt. [Dünge 1977 (2)] Die

meist beschriebene notwendige Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 40 °C oder sogar bis auf 80 °C [Grushka 1978, Gueddour 1993] hatte in den vorliegenden Untersuchungen keinen merklichen Einfluß auf die Ausbeuten der Reaktionen. Für die Dauer der Umsetzung finden sich in der Literatur Angaben von zehn Minuten bis zehn Stunden. [McGuffin 1985, Turk 1978]

Bei der Handhabung des Fluoreszenzmarkers BrMMC muß beachtet werden, daß die gelöste Substanz sich in Anwesenheit von Licht und/ oder protischen Lösungsmitteln (wie z.B. Wasser oder Methanol) äußerst schnell zersetzt. Deshalb muß die Derivatisierung unter Lichtausschluß und in aprotischem Lösungsmittel durchgeführt werden. Meist werden Acetonitril oder Aceton benutzt. Die Derivatisierungsprodukte dagegen sind über längere Zeit stabil. [Wolf 1992]

Die variablen Punkte, die einen meßbaren Einfluß auf die Fluoreszenzausbeute haben, sind die Konzentration und Zusammensetzung der zugesetzten Reagenzien und die Derivatisierungsdauer.

Die Konzentration der zuzusetzenden Reagenzien richtet sich zuerst nach der in den Proben erwarteten Menge an zu derivatisierenden Eicosanoiden. Da die Reaktion üblicherweise mit einem 1,5 bis 3-fachen molaren Überschuß an BrMMC durchgeführt wird, läßt sich die benötigte Menge an Reagenz errechnen. Da BrMMC wegen des im Molekül vorhandenen Brom-Atoms selbst ein Fluoreszenz-Quencher ist, kann eine zu hohe BrMMC-Konzentration in der Reaktionsmischung zur Abschwächung der Fluoreszenz führen. [Dünges 1978]

In den Abbildungen 12 und 13 ist die Abhängigkeit der Derivatisierung von den zugegebenen Reagenzien und von der Reaktionsdauer dargestellt.

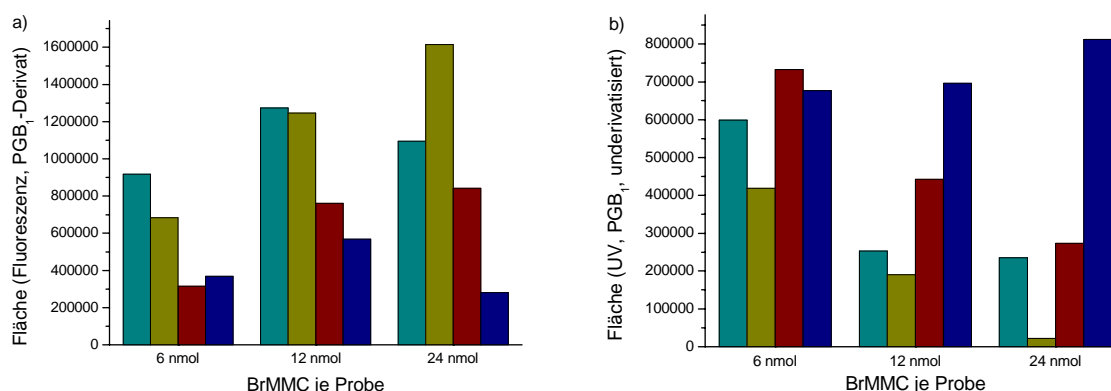


Abbildung 12: Einflüsse auf die Fluoreszenzmarkierung; 7,5 nmol PGB₁ je Probe (n = 2)

HPLC wie in Kap. 3.2.3.3.2 angegeben

a) Beeinflussung der Fluoreszenzmarkierung durch die zugegebenen Reagenzien

b) Vollständigkeit der Derivatisierung in Abhängigkeit von den Reagenzien

BrMMC und Kronenether (UV-Detektion bei 280 nm)

cyan: 5 µl Kronenethersuspension nach [Wolf 1990]

gelb: 10 µl Kronenethersuspension

rot: 5 µl Kronenetherlösung

blau: 10 µl Kronenetherlösung

Eine vorteilhafte Variante, den Kronenether und das Kaliumcarbonat der Reaktionsmischung zuzusetzen, ist die Herstellung einer Kronenethersuspension nach der Vorschrift von Wolf [1990] (Herstellungsvorschrift im Kap. 3.2.3.3.2). Diese Suspension erhöhte die Fluoreszenzausbeuten

gegenüber der Verwendung einer einfachen Lösung des Kronenethers in Acetonitril [Gueddour 1993] um etwa das Dreifache (Abbildung 12a). In Abbildung 12b sind als Kontrolle auf vollständige Umsetzung die Peakflächen des nach dem Derivatisierungsvorgang noch vorhandenen underivatisierten PGB₁ aufgetragen. Es ist erkennbar, daß die Derivatisierung erst bei dreifachem Überschuß des BrMMC und nur unter gleichzeitiger Zugabe von 10 µl Kronenethersuspension vollständig abläuft.

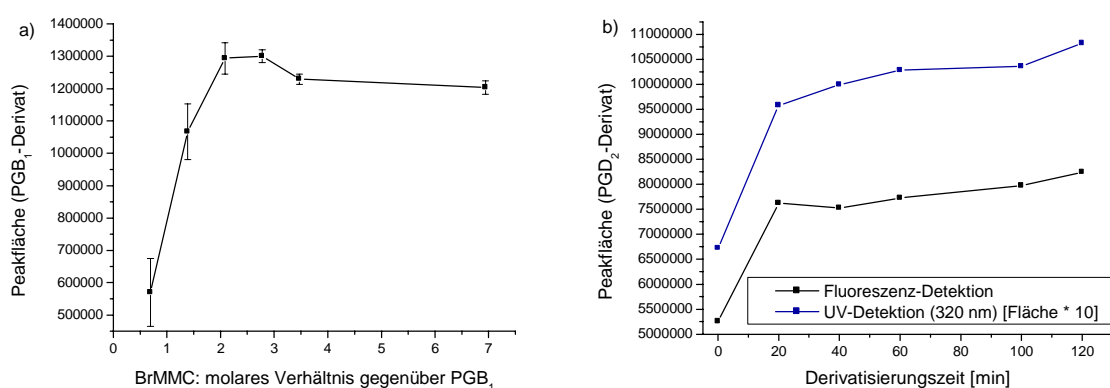


Abbildung 13: Abhängigkeit der Fluoreszenzmarkierung von
 a) dem Reagenz-Reaktant-Verhältnis: 1,5 nmol PGB₁ mit 20 µl Kronenethersuspension und BrMMC (0,7 bis 7-fach molar) bei Raumtemperatur (n = 4)
 b) der Reaktionsdauer: 1,5 nmol PGD₂ mit 20 µl Kronenethersuspension und 3 nmol BrMMC bei Raumtemperatur (n = 2)
 HPLC-Analytik wie in Kap. 3.2.3.3.2 angegeben

Aus Abbildung 13a ist ersichtlich, daß das maximale Fluoreszenzsignal des PGB₁ bei zwei- bis dreifachem Überschuß des BrMMC erreicht wurde. Ein größerer Überschuß an BrMMC hatte ein leichtes Absinken der Fluoreszenz zur Folge, was auf den oben beschriebenen Quenchingeffekt zurückzuführen sein dürfte.

Weitere Versuche dienten dazu, die für eine vollständige Umsetzung benötigte Derivatisierungszeit zu ermitteln. Die Abbildung 13b zeigt, daß sich nach einer Reaktionszeit von 40 min die Ausbeute des PGD₂-Derivates nur noch unwesentlich erhöhte, so daß eine längere Reaktionsdauer nicht erforderlich war.

3.3.5.3.2 Optimierung des Laufmittels

In der Literatur sind für die HPLC-Trennung von BrMMC-Derivaten sowohl Laufmittel auf Acetonitril- [Tsuchiya 1982] als auch Methanol-Basis [Herrmann 1987] beschrieben. Der direkte Vergleich beider Laufmittelgruppen zeigt, daß durch methanolische Laufmittel die Größe der mittels Fluoreszenz aufgenommenen Peaks gegenüber acetonitrilhaltigen Laufmitteln deutlich gesteigert werden kann (s. Abbildung 14).

Weiterhin ist aus der Abbildung zu entnehmen, daß die Fluoreszenzintensität mit zunehmendem

Wasseranteil im Laufmittel ansteigt, während die Größe der im UV gemessenen Peaks in allen Laufmitteln konstant bleibt (gelbe Balken in Abbildung 14a). Wolf [1992] bringt diese Erscheinung mit der höheren Polarität des Methanols bzw. Wassers in Zusammenhang. Analoge Resultate erbrachten Laufmitteluntersuchungen mit drei Prostaglandinen und Thromboxan (s. Abbildung 14b). Aus diesem Grund wurde ein Laufmittelgemisch aus Methanol und Wasser genutzt. Damit die Analysenzeiten in einem vertretbaren Rahmen bleiben, ist für die Analytik von Eicosanoiden die Verwendung eines Laufmittelgradienten nahezu unumgänglich. Allerdings muß hierbei beachtet werden, daß sich die Sensitivität der Fluoreszenzmessung mit der Laufmittelzusammensetzung ändern kann (s. oben). Zu Beginn eines jeden Laufes eluieren zunächst die Reagenzien, so daß mit einer polaren Laufmittelmischung gestartet werden muß, um die ersten Metabolitenpeaks sicher von den Reagenzienpeaks abzutrennen. Anschließend kann die Polarität des Laufmittels herabgesetzt werden, um die Retentionszeiten der unpolaren Metabolitenderivate zu verkürzen.

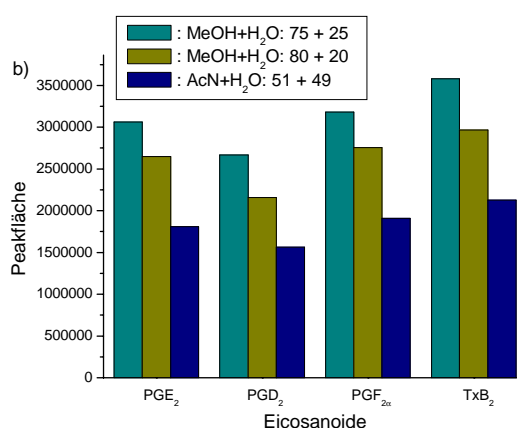
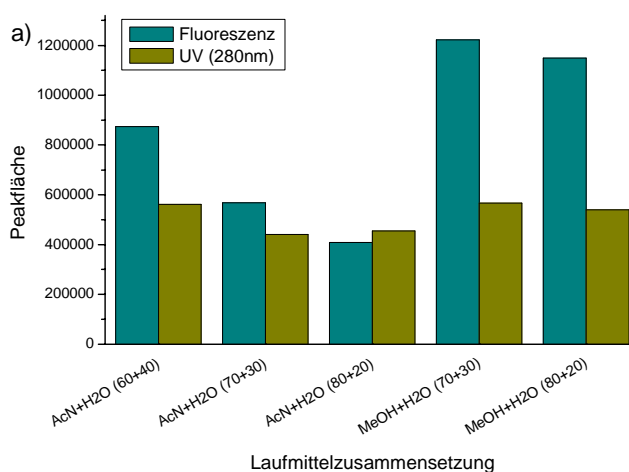


Abbildung 14: Einfluß des HPLC-Laufmittels auf das Fluoreszenzsignal (n = 2), Laufmittelfluß: 1 ml/ min

- a) 1,5 nmol PGB₁ mit 20 µl Kronenethersuspension und 3 nmol BrMMC
 b) 1,5 nmol je Metabolit mit 20 µl Kronenethersuspension und 15 nmol BrMMC

Ein Beispielchromatogramm von sechs kommerziell erworbenen Referenzmetaboliten nach Derivatisierung zeigt Abbildung 15.

Auf eine Besonderheit des COX-Metaboliten TxB_2 soll an dieser Stelle hingewiesen werden. Aufgrund seiner Struktur lassen sich für das TxB_2 zwei anomere und zwei tautomere Formen formulieren. Die beiden cyclischen Hemiacetale $11\text{-}\alpha\text{-OH-TxB}_2$ und $11\text{-}\beta\text{-OH-TxB}_2$ bilden ein Anomerenpaar. Die ringgeschlossenen Anomere bilden mit der offenkettigen Aldehydform ein Tautomerenpaar. Die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen offenkettiger und cyclischer Form des TxB_2 ist pH-abhängig. [John 1997] Die pH-Werte, bei denen sich das Gleichgewicht zu 100 % auf einer der beiden Seiten befindet, liegen jedoch im so stark Sauren bzw. Basischen, daß dadurch die RP-HPLC-Säulen zerstört würden. [Terragno 1981] Bei den üblichen leicht sauren pH-Werten, die zur Trennung der Eicosanoide genutzt werden, tritt das TxB_2 im Chromatogramm immer als Doppelpeak ohne Basislinientrennung auf. Dies kann durch einen zusätzlichen Derivatisierungsschritt mit Malondialdehyd umgangen werden. [Dannhardt 1998]

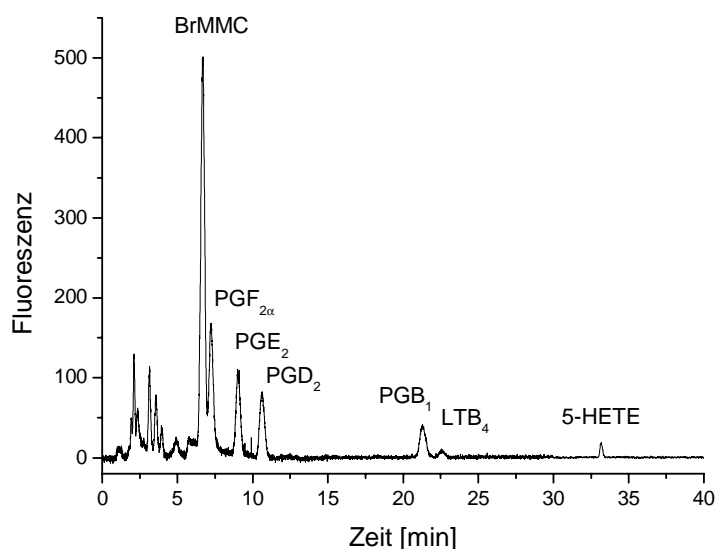


Abbildung 15: Beispielchromatogramm: fluoreszenzmarkierte Referenzmetaboliten (167 ng je Metabolit)
HPLC wie unter Methoden im Kap. 3.2.3.3.2 angegeben

Aus den vorgestellten Ergebnissen wurde die Standardvorschrift für die Fluoreszenzmarkierung erstellt, die im Kapitel 3.2.3.3.2 wiedergegeben ist.

Zur Kalibrierung dieser Methode wurden Verdünnungsreihen von PGB_1 , PGD_2 und PGE_2 erstellt, derivatisiert und vermessen. Die Prostaglandine lagen in den Konzentrationen 7 ng, 13 ng, 26 ng, 52 ng, 104 ng, 208 ng, 416 ng, 833 ng (jeweils je Injektion) vor.

Die Konzentration von 7 ng war in allen Fällen nicht mehr detektierbar. PGB_1 war in der Konzentration 13 ng ebenfalls nicht mehr zu detektieren. Die übrigen verwendeten Prostaglandinkonzentrationen lagen alle im linearen Bereich der Methode (Abbildung 16).

Somit ist diese Fluoreszenzmethode zur Eicosanoidbestimmung grundsätzlich geeignet. Vor einer Routineanwendung müßte allerdings eine umfangreichere Validierung vorgenommen werden. Das

Detektionslimit für die vermessenen Prostaglandine D₂ und E₂ liegt bei 13 ng bzw. 37 pmol je Injektion (Lösung 1,8 µM). Für PGB₁ liegt das Detektionslimit bei ca. 20 ng bzw. 59 pmol je Injektion (Lösung 3,0 µM). Diese Werte liegen im Bereich der mit der UV-Messung möglichen Nachweisgrenze von 9 ng je Injektion. (s. Kap. 3.3.6.1.3) Das Quantifizierungslimit liegt in beiden Fällen entsprechend etwa um den Faktor 3 höher. Da die Fluoreszenzdetektion im Vergleich zur UV-Detektion bezüglich der Nachweisgrenze keinen Vorteil bietet und wegen des zusätzlichen Derivatisierungsaufwandes wurde für die Routinetestung die Standardmethode ohne Derivatisierung mit Detektion der im UV-Bereich photometrisch erfassbaren fünf AA-Metaboliten bevorzugt.

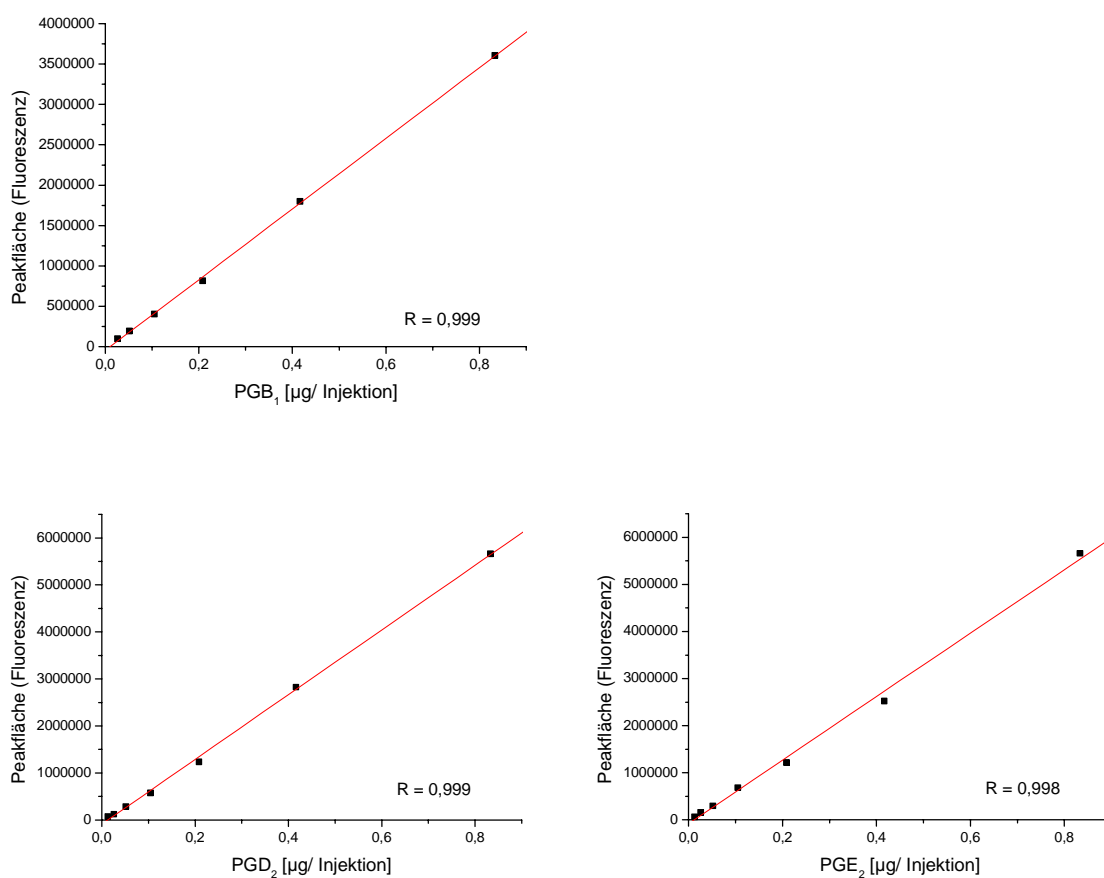


Abbildung 16: Kalibriergeraden für PGB₁, PGD₂ und PGE₂ nach Fluoreszenzmarkierung mit BrMMC und HPLC-Trennung gemäß Standardvorschrift (n = 2)

3.3.6 Validierung des Testsystems für die UV-Detektion

Unter Validierung einer analytischen Methode versteht man den Beleg dafür, daß die Methode geeignet ist, zuverlässig richtige Ergebnisse für die Bestimmung des Analyten in einer bestimmten Matrix zu liefern. (Grundlagen in: [CPMP 1989, DIN 55350 1987, Kromidas 1999, McLean 1990, Riley 1996])

Nach den ICH-Richtlinien [ICH 1995] soll die Validierung einer Meßmethode zur Quantifizierung eines Analyten folgende Punkte umfassen:

- Richtigkeit: drückt die Übereinstimmung zwischen den Werten, die als richtig akzeptiert werden, und den gefundenen Werten aus und macht Aussagen über systematische Fehler der Methode.
- Präzision: drückt die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander aus und ist ein Maß für die Streuung der Analysenergebnisse. Es wird unterschieden zwischen Wiederholpräzision, Vergleichspräzision und Laborpräzision. Die Präzision wird üblicherweise ausgedrückt als Varianz bzw. Standardabweichung einer Meßserie. Sie sollte mit homogenen authentischen Proben bestimmt werden. Wenn das nicht möglich ist, können auch künstlich hergestellte Proben verwendet werden.
- Genauigkeit: ist ein Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision.
- Wiederholpräzision (Wiederholbarkeit): ist die Präzision, die unter den gleichen Arbeitsbedingungen über ein kurzes Zeitintervall gemessen wird.
- Vergleichspräzision (Vergleichbarkeit): ist die Präzision unter Vergleichsbedingungen, gemessen in verschiedenen Labors, von verschiedenen Prüfern, an verschiedenen Tagen, mit verschiedenen Anlagen.
- Spezifität: ist die Möglichkeit, den Analyten ohne Störung in Gegenwart von Komponenten zu erfassen, deren Anwesenheit während der Analytik erwartet werden kann, wie z.B. Verunreinigungen, Abbauprodukte oder Matrixbestandteile.
- Selektivität: ist die Fähigkeit, alle interessierenden Analyten nebeneinander ohne gegenseitige Störung zu bestimmen.
- Linearität: ist die Fähigkeit der analytischen Prozedur, Testergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten sind.
- Meßbereich: ist das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration des Analyten in der Probe, für die gezeigt wurde, daß die analytische Prozedur einen ausreichenden Grad an Präzision, Richtigkeit und Linearität hat.

Weitere Begriffe und Charakteristika im Zusammenhang mit der Validierung einer Analysenmethode sind:

- Detektionslimit: (Nachweisgrenze) ist die niedrigste Menge Analyt in einer Probe, die detektiert werden kann, dabei aber nicht notwendigerweise als exakter Wert quantifiziert werden können muß.
- Quantifizierungslimit: (Erfassungsgrenze) ist die niedrigste Menge Analyt in einer Probe,

die mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann.

- Robustheit: ist die Kapazität einer analytischen Methode, durch kleine Veränderungen der Methodenparameter unbeeinflusst zu bleiben und bietet ein Maß für die Zuverlässigkeit der Methode bei normaler Nutzung.
- Reproduzierbarkeit: ist die Präzision bei Messungen in unterschiedlichen Laboratorien.

Im Rahmen dieser Arbeit und einer nachfolgend angefertigten Diplomarbeit [Wobst 2003] wurde die neu entwickelte Testmethode zur quantitativen Erfassung von Metaboliten der Arachidonsäurekaskade im humanen Vollblut mittels HPLC und anschließender UV-Detektion validiert.

Den ersten Schritt der Validierung stellten die Versuche mit dem internen Standard Prostaglandin B₁ ohne Blut in Wasser bzw. in PBS-Puffer dar. Diese Versuche dienten vor allem dazu, die Durchführung der eigentlichen Validierung mit den physiologischen AA-Metaboliten zu planen. Die Validierungsarbeiten waren zum Zeitpunkt des Niederschreibens dieser Arbeit noch nicht vollständig abgeschlossen. Daher soll an dieser Stelle stellvertretend nur auf die durchgeführten Versuche mit PGB₁ eingegangen werden.

3.3.6.1 Validierung mit dem internen Standard PGB₁

Mit Hilfe dieser Versuche zur Validierung des Testsystems mit dem internen Standard PGB₁ können einerseits erste Aussagen zur Qualität des Assays getroffen werden, andererseits kann die Eignung des PGB₁ als interner Standard nachgewiesen werden.

Die Stabilität der Lösungen des PGB₁ ist für dessen Nutzung als Standardsubstanz von besonderer Wichtigkeit. Nachfolgend wurde die Stabilität des Prostaglandins B₁ in Lösung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen und während der Versuchsdurchführung, speziell während des Prozesses des Abdampfens der Proben, untersucht. Zur Ermittlung des linearen Bereichs der Konzentrationskurve wurde eine Kalibriergerade erstellt.

3.3.6.1.1 Stabilität der Lösungen

Zur Untersuchung der Stabilität der Lösungen der AA-Metaboliten wurden die entsprechenden Mengen PGB₁ in Methanol gelöst und zu jedem Meßzeitpunkt dem Gefäß ein Teil der Lösung entnommen. Die erste Bestimmung wurde direkt nach dem Herstellen der Lösungen durchgeführt. Zwei weitere Messungen wurden nach einer Woche und nach vier Wochen Lagerung bei – 18 °C bzw. bei + 6 °C vorgenommen. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs.

Die Meßwerte der bei – 18 °C gelagerten Proben sind nicht statistisch signifikant verschieden von den Ausgangsmeßwerten. Die Stabilität der Lösung ist über den Zeitraum von mindestens vier Wochen gegeben. Die Meßergebnisse der bei + 6 °C gelagerten Proben weisen eine größere Schwankungsbreite auf als Werte der eingefrorenen Lösungen. Außerdem ist anhand der dargestellten Mittelwerte erkennbar, daß bei + 6 °C der PGB₁-Gehalt bereits nach einer Woche vermindert ist.

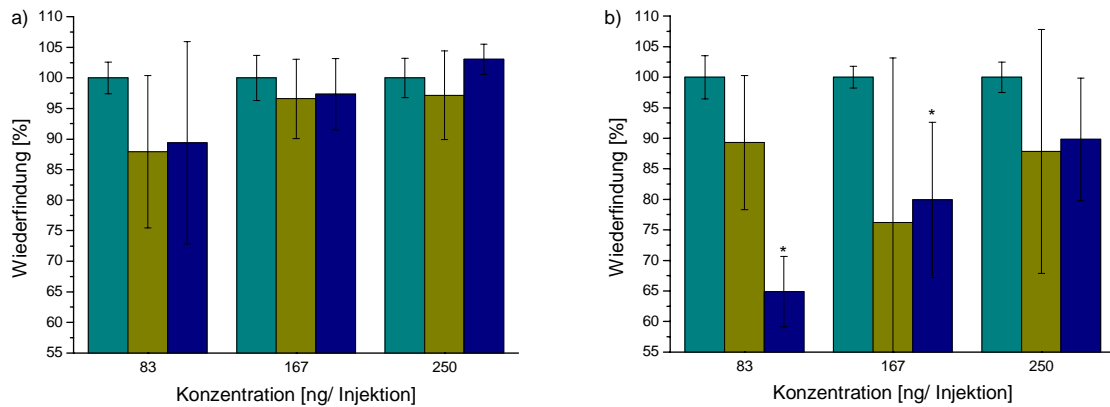


Abbildung 17: Stabilität von PGB₁-Lösungen über einen Zeitraum von vier Wochen bezogen auf die Proben, die sofort nach der Herstellung vermessen wurden bei a) – 18 °C und b) + 6 °C (jeweils Dreifachbestimmung in zwei Experimenten, n = 6)
 cyan: sofort nach Herstellung vermessen (= 100 %)
 gelb: eine Woche nach Herstellung vermessen
 blau: vier Wochen nach Herstellung vermessen

3.3.6.1.2 Stabilität des PGB₁ beim Abdampfen

Um die Blutproben nach der Festphasenextraktion zur quantitativen HPLC-Analytik in einem definierten Volumen Lösungsmittel vorliegen zu haben, müssen die Extrakte zunächst bis zur Trockene abgedampft werden (s. Kapitel 3.3.4). Hier liegt die Vermutung nahe, daß die Stabilität der Eicosanoide während und nach dem Abdampfvorgang beeinträchtigt ist. Daher wurde für den internen Standard PGB₁ die Stabilität im Zusammenhang mit dem Abdampfvorgang untersucht. Dazu wurden drei Lösungen verschiedener Konzentrationen unter Argonbegasung bei 38 °C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 120 µl Methanol entweder sofort nach dem Abdampfen oder nach dem trockenen Stehenlassen für drei Stunden bei Raumtemperatur aufgenommen. Zum Vergleich wurden Proben der gleichen Konzentration ohne den Abdampfvorgang bestimmt.

Nach dem Abdampfen sind die Mittelwerte der Flächen der mit einem Stern gekennzeichneten Probengruppen signifikant verschieden von den ohne Abdampfen bestimmten Werten (s. Abbildung 18). Jedoch ist der Unterschied zwischen den Proben, die sofort nach dem Abdampfen in Methanol aufgenommen wurden, und denen, die stehengelassen wurden, nicht statistisch signifikant. Der Verlust beim Abdampfen beträgt bis zu 20 %.

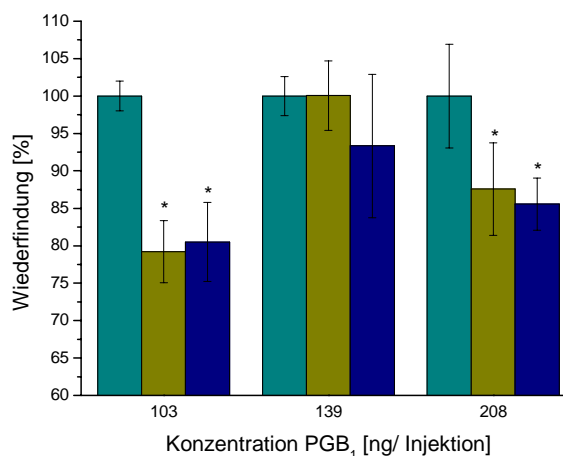


Abbildung 18: Einfluß des Abdampfprozesses auf die Wiederfindungsraten des PGB₁ bezogen auf die Proben ohne Abdampfen des Lösungsmittels (jeweils Dreifachbestimmung in zwei Experimenten, n = 6), HPLC nach Standardmethode
 cyan: Proben ohne Abdampfen des Lösungsmittels vermessen (= 100 %)
 gelb: Proben sofort nach dem Abdampfen des Lösungsmittels vermessen
 blau: Proben drei Stunden nach dem Abdampfen des Lösungsmittels stehengelassen und dann vermessen

3.3.6.1.3 Kalibriergerade für PGB₁ in Methanol

Für PGB₁ wurde eine Kalibriergerade mit gleichmäßiger Verteilung der Konzentrationen über den Bereich von 9 bis 125 ng/ Injektion aufgenommen. Das Prostaglandin wurde in Methanol gelöst und sonst keiner weiteren Bearbeitung unterzogen.

Jeweils in Dreifachbestimmung wurden an drei Tagen folgende Konzentrationen bestimmt, so daß insgesamt ein Datensatz von n = 9 Bestimmungen vorliegt:

7,1 ng (1,1 µM), 9,5 ng (1,5 µM), 12,5 ng (2 µM), 17 ng (2,5 µM), 22 ng (3,5 µM), 30 ng (4,5 µM), 40 ng (6 µM), 53 ng (8 µM), 71 ng (10,5 µM), 94 ng (14 µM) und 125 ng (18,5 µM) (je Injektion).

Die Lösungen wurden in getrocknetem Methanol hergestellt.

In der folgenden Tabelle 12 sind die Kalibrierparameter aller neun Meßserien zusammengestellt.

Tabelle 12: Kalibrierparameter für den internen Standard PGB₁

Serie	Steigung	± SD	RSD [%]	Ordinatenabschnitt	± SD	Korrelationskoeffizient R
1	963,056	14,624	1,518	-8366,831	872,576	0,9991
2	1002,769	11,723	1,169	-4852,8450	667,373	0,9994
3	1093,615	17,776	1,625	-5798,806	795,479	0,9989
4	890,916	8,8194	0,990	-7617,202	554,000	0,9997
5	913,396	11,600	1,270	-6764,356	692,130	0,9994
6	953,329	18,927	1,985	-6123,396	1129,319	0,9984
7	996,808	14,725	1,477	-6031,629	924,975	0,9992
8 [#]	1034,529	29,368	2,839	-954,866	1844,797	0,9972
9 [#]	976,630	48,967	5,014	-5936,248	2921,727	0,9901
G	956,595	11,930	1,247	-5980,783	711,798	0,9994

[#] Serien wurden bei Erstellung der Gesamtkalibriergerade (G) (Abbildung 19a) nicht berücksichtigt

Die in Abbildung 19a dargestellte Kalibriergerade wurde aus den Mittelwerten aller Werte der Neunfachbestimmung erstellt, die bei Einzelregression einen Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,998 ergaben. Zwei Wertereihen (die Serien 8 und 9) wurden entfernt. Die Parameter dieser Regression sind in Tabelle 12 in der Zeile (G) aufgeführt.

Mit dem Datenpool der Kalibrierung wurden einige weitere Berechnungen durchgeführt und graphische Auftragungen vorgenommen:

- **Detektionslimit:** Das Detektionslimit der Methode liegt bei etwa 9 ng (26 pmol)/ Injektion bzw. 1,5 µM. (Lit.: 20 ng [Turk 1978], 300 pmol [McGuffin 1985])
- **Empfindlichkeit:** Auftragung des Quotienten Signal/ Konzentration gegen die Konzentration (Abbildung 19b). Die Empfindlichkeit der Meßmethode läßt unterhalb von 30 ng (89 pmol)/ Injektion deutlich nach. Die grünen Symbole stellen den jeweiligen Mittelwert der Parallelbestimmungen einer Konzentration dar. Die eingezeichneten Linien für Mittelwert und Akzeptanzgrenzen von ± 10 % beziehen sich auf die fünf höchsten Konzentrationen.
- **Quantifizierungslimit:** Aus der Auftragung der Empfindlichkeit kann das Quantifizierungslimit abgelesen werden. Als untere Grenze zur Quantifizierung wird der Punkt angesehen, an dem die Empfindlichkeitskurve die Akzeptanzgrenzen verläßt: hier bei einer Konzentration von 30 ng/ Injektion bzw. 4,5 µmol/ l. Das Quantifizierungslimit liegt etwa um den Faktor 3 über dem Detektionslimit, was sich mit den üblichen Angaben in der Literatur deckt. [Kromidas 1999]

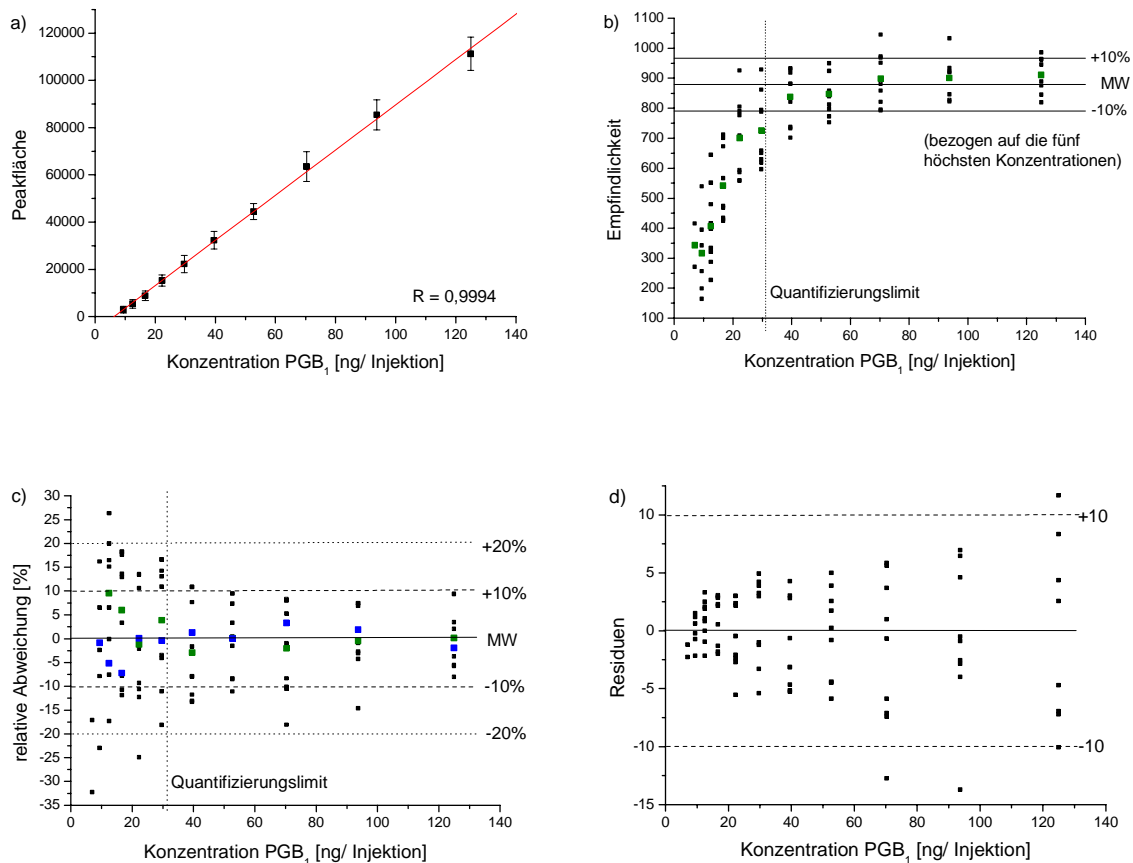


Abbildung 19: Kalibriergerade (a), Empfindlichkeit (b), relative Abweichung (c) und Residuen (d) für die Konzentrationsreihen des PGB₁ (Erläuterungen im Text)

- **Relative Abweichung:** Auftragung der prozentualen Abweichung des mittels Kalibriergerade errechneten Wertes der Konzentration gegen die richtige (eingewogene) Konzentration (Abbildung 19c). Die grünen Symbole geben die jeweiligen Mittelwerte der relativen Abweichung der Signale einer Konzentration wieder ($n = 9$). Die blauen Symbole stellen die relative Abweichung dar, die aus den Mittelwerten der Signale aller neun Proben je Konzentration errechnet wurde. Eingetragen sind außerdem die Abweichungsgrenzen (Akzeptanzgrenzen) von ± 10 bzw. 20% . Die relative Abweichung von $\pm 20\%$ stellt gleichzeitig ein Maß zur Findung des Quantifizierungslimits dar. [DIA 1991] Dieses stimmt mit der über die Empfindlichkeitskurve ermittelten Grenze überein (s. oben).
- **Residuen:** vertikale Abstände der Meßwerte von der Regressionsgeraden; Auftragung der Differenz zwischen richtigem (eingewogenem) Konzentrationswert und mittels Kalibriergerade errechnetem Konzentrationswert (Abbildung 19d). Markiert sind die Akzeptanzgrenzen von ± 10 . Bei richtiger Wahl der Regressionsfunktion sind die Residuen um das Nullniveau normalverteilt.

3.3.6.2 Kalibrierung für LTB₄, 12-HHT und 5-HETE

Für die Eicosanoide LTB₄, 5-HETE und 12-HHT wurden Kalibriergeraden aufgenommen. Für die Meßserien wurden fünf Konzentrationen gewählt und jeweils ohne Bearbeitung in Dreifachbestimmung vermessen. Als Konzentrationen wurden eingesetzt: 7,9 ng, 13,1 ng, 21,9 ng, 36,5 ng, 60,9 ng je Injektion. Die kommerziell erworbenen Referenzsubstanzen wurden zur Herstellung der Verdünnungsreihen in Methanol gelöst.

Abbildung 20 zeigt die drei erstellten Kalibriergeraden und die graphische Darstellung der Empfindlichkeiten der jeweiligen Messungen. In Tabelle 13 sind die Kalibrierparameter der Meßserien zusammengestellt.

Tabelle 13: Kalibrierparameter der Referenzeicosanoide LTB₄, 12-HHT und 5-HETE

Serie	Anstieg	± SD	RSD [%]	Ordinatenabschnitt	± SD	R
LTB ₄ (1)	3162,612	115,225	3,643	-9486,506	3909,065	0,9980
LTB ₄ (2)	3197,375	101,086	3,162	-10052,145	3429,386	0,9985
LTB ₄ (3)	3543,731	202,945	5,727	-10329,316	6885,018	0,9951
12-HHT (1)	2716,416	88,214	3,247	-8636,041	2992,714	0,9984
12-HHT (2)	2778,839	121,394	4,368	-10712,023	4118,356	0,9971
12-HHT (3)	3047,715	124,711	4,092	-10779,301	4230,893	0,9975
5-HETE (1)	4977,156	140,8486	2,830	-3395,014	4778,334	0,9988
5-HETE (2)	5426,274	161,859	2,983	-8760,059	5491,148	0,9987
5-HETE (3)	6351,012	316,144	4,978	-8856,414	10725,333	0,9963

Die kleinste der ausgewählten Konzentrationen konnte vom Detektor gerade noch erfaßt werden. Das Detektionslimit für diese drei Metaboliten liegt demzufolge geringfügig unter 8 ng (23 pmol)/ Injektion (12 µM für LTB₄; 14 µM für 12-HHT; 13 µM für 5-HETE). Die Empfindlichkeitskurven zeigen unterhalb der Konzentrationen von 30 ng/ Injektion ein deutliches Abknicken; im Falle der 5-HETE erst bei der Konzentration 7,9 ng/ Injektion. Das Quantifizierungslimit ist entsprechend beim dreifachen Wert des Detektionslimits anzusetzen: 24 ng/ Injektion (36 µM für LTB₄; 42 µM für 12-HHT; 39 µM für 5-HETE).

Damit lassen sich mit der UV-Meßmethode ohne Derivatisierung geringere Eicosanoidmengen nachweisen als mit UV-Detektion und vorangehender Derivatisierung mit 2-Bromacetophenon bei der als Nachweisgrenze für die Eicosanoide Werte von 0,1 bis 1 µg/ Injektion ermittelt wurde. [Mandel 1999] Die von Doehl beschriebene Derivatisierungstechnik mit Pyridiniumdichromat (PDC) und anschließender UV-Detektion bei 230 nm ließ die Detektion von 0,15 pmol Prostaglandin zu. [Doehl 1985]

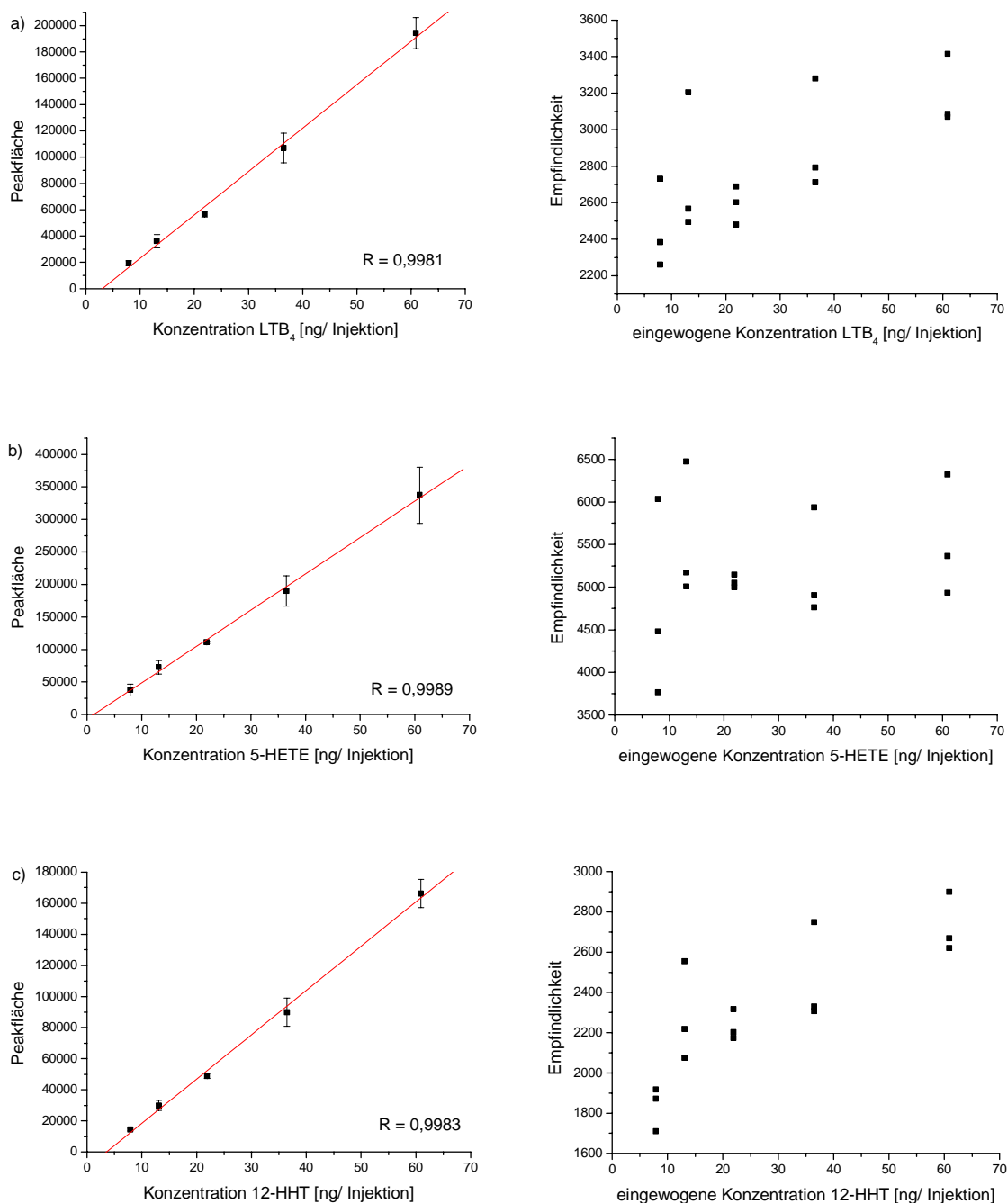


Abbildung 20: Kalibriergeraden und Empfindlichkeiten für die Konzentrationsreihen der Referenz-eicosanoide LTB₄ (a), 5-HETE (b) und 12-HHT (c)

3.3.6.3 Präzision der Meßmethode

Da zur Durchführung der Testung von Testreihe zu Testreihe das Blut verschiedener Probanden verwendet wird, liegt es nahe, Untersuchungen darüber anzustellen, welche Schwankungen dadurch in die Meßwerte einfließen können. Daß die erzielten Ergebnisse hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität der Testsubstanzen auch mit dem Blut mehrerer Probanden konstant sind,

wurde bereits anhand der Standardinhibitoren in Kap. 3.3.1.6 gezeigt. An dieser Stelle sollen die eigentlichen Meßwerte (Peakflächen) näher betrachtet werden, was Rückschlüsse auf die Konstanz bzw. Schwankungen der im Testblut gebildeten Metabolitenmenge zuläßt.

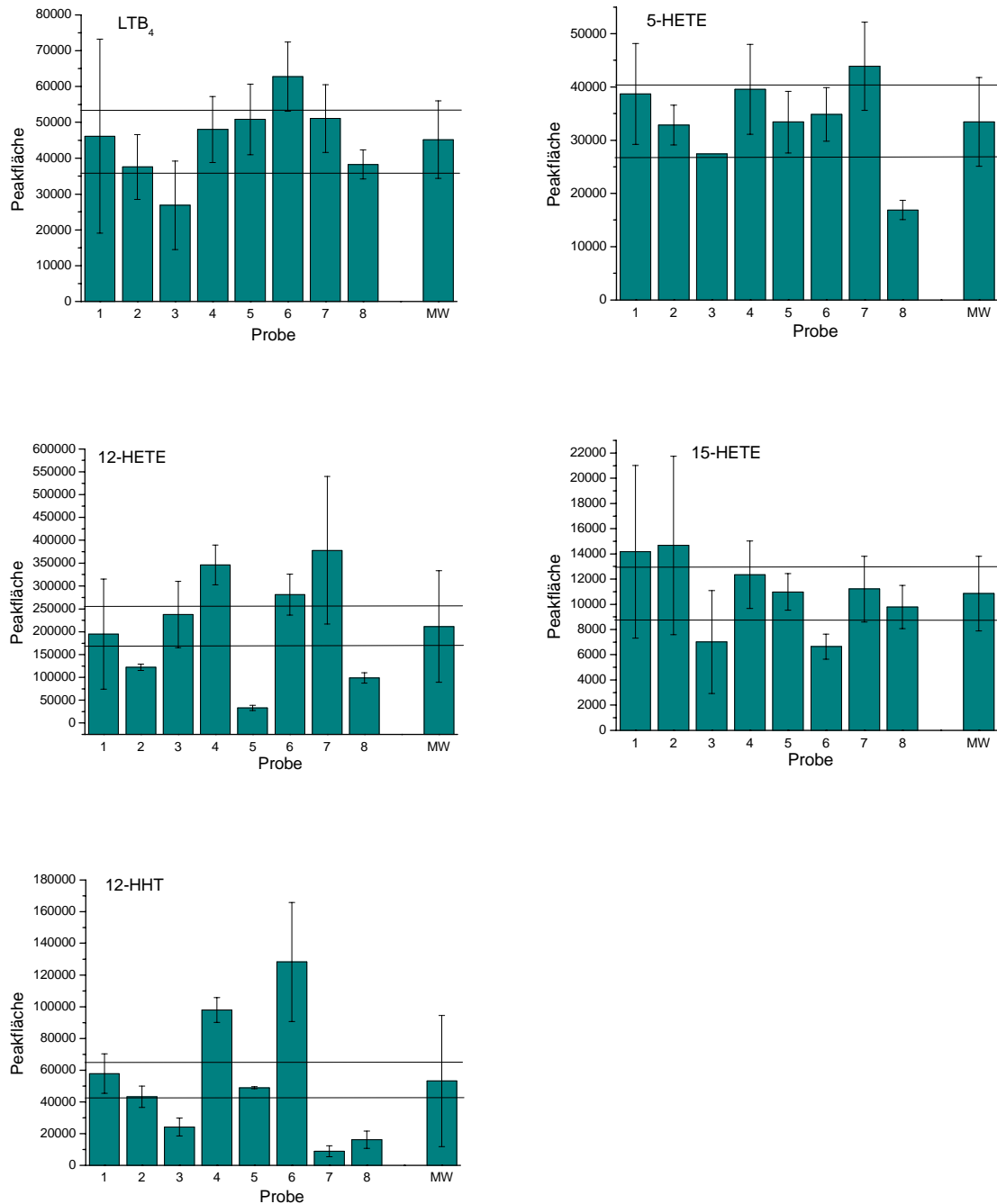


Abbildung 21: Interindividuelle Unterschiede in der detektierbaren Eicosanoidmenge im Blut von acht Probanden. Durchführung der Testung nach Standardvorschrift
 Jede Säule (1 – 8) stellt den Mittelwert der drei Blindproben einer Testreihe dar.
 MW = Mittelwert der Werte 1 bis 8 \pm 20 %-Grenzen

Aus acht Probenserien wurden jeweils die Mittelwerte der Peakflächen der drei mitgeführten ungehemmten Blindwerte miteinander verglichen. Abbildung 21 zeigt die graphische Darstellung der jeweils acht Mittelwerte, den Mittelwert (MW) über alle acht Meßreihen sowie die $\pm 20\%$ -Grenzen der Abweichung von diesem Gesamtmittelwert.

Die jeweils in den stimulierten Blutproben gebildeten absoluten Mengen der Eicosanoide sind von Proband zu Proband teilweise sehr unterschiedlich. Besonders ausgeprägt sind diese Schwankungen bei den Metaboliten 12-HETE und 12-HHT. Hier werden die $\pm 20\%$ -Grenzen von einigen Proben deutlich überschritten. Das könnte damit zusammenhängen, daß diese beiden Metaboliten auch in unstimulierten Blutproben nachweisbar sind (s. Abbildung 2, Kap. 3.3.1.2). Somit kommen hierbei auch interindividuelle Unterschiede im Grundlevel des 12-HETE- und 12-HHT-Gehaltes des Blutes zum Tragen, bevor überhaupt der Eicosanoidstoffwechsel extern stimuliert wurde. Für die Metaboliten LTB₄, 5-HETE und 15-HETE liegen jedoch nahezu alle Werte der einzelnen Meßtage im Bereich der 20 %-Abweichungsgrenzen.

3.4 Ergebnisse der Vollbluttestung

3.4.1 Bekannte Inhibitoren

Um Aussagen zur Spezifität und Genauigkeit des neuen Vollbluttestsystems zu machen, wurden vier literaturbekannte Inhibitoren der Arachidonsäurekaskade getestet und deren IC₅₀-Werte berechnet. Die Testungen mit humanem Vollblut wurden nach der im Methoden-Teil (Kapitel 3.2.3) beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Die erhaltenen Hemmwerte wurden den in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werten gegenübergestellt. Die vier ausgewählten Substanzen sind Nordihydroguajarsäure (NDGA) als Inhibitor der 5-LOX [Gronert 1995], Zileuton als selektiver Inhibitor der 5-LOX, in den USA zugelassen als Antiasthmikum [Sirois 1991], sowie Indometacin und Acetylsalicylsäure (ASS) als Vertreter der Klasse der häufig eingesetzten nichtsteroidalen Antirheumatika, deren Wirkung auf einer Hemmung der COX-1 beruht. [Berg 1999, Cryer 1998]

Die 5-LOX-Werte wurden für die Metaboliten LTB₄ und 5-HETE, die COX-Werte für die 12-HHT bzw. in den Literaturangaben für PGE₂ ermittelt.

Die mit dem Testsystem bestimmten IC₅₀-Werte der Substanzen gegenüber den Enzymen 5-LOX bzw. COX-1 und die Hemmwerte aus den entsprechenden Literaturangaben sind in Tabelle 14 aufgeführt. Abbildung 22 zeigt die IC₅₀-Kurven der vier Standardsubstanzen.

Tabelle 14: IC₅₀ der Standardinhibitoren NDGA, Zileuton, Indometacin, ASS

Inhibitor	Enzym	ermittelte IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ [µM] aus Literatur
NDGA	5-LOX	1,5 [#] (LTB ₄) 2,9 [#] (5-HETE)	1,0 (LTB ₄) [Gronert 1995]
Zileuton	5-LOX	0,60 ± 0,09 (LTB ₄) 1,65 ± 0,11 (5-HETE)	0,76 (LTB ₄) [Kolasa 1997]
Indometacin	COX-1	0,34 [#] (12-HHT)	0,37 (PGE ₂) [Cryer 1998]
ASS	COX-1	2,5 [#] (12-HHT)	4,4 (PGE ₂) [Cryer 1998]

[#] : Einfachbestimmung der IC₅₀ aus vier Hemmwerten

Die Hemmwerte für Zileuton wurden von Kolasa [1997] mit einem Vollblutassay über die Detektion des AA-Metaboliten LTB₄ mittels eines RIA ermittelt. Die berechnete IC₅₀ stimmt für die Inhibition der Synthese von LTB₄ mit der Literaturangabe überein.

NDGA, ein polyhydroxyphenolisches Antioxidans, ist als starker Inhibitor des Lipoxygenase-Stoffwechselweges bekannt und wird in der Literatur häufig als Vergleichssubstanz für die Wirkpotenz anderer Inhibitoren herangezogen. [Lin 1996] Die mit dem neu entwickelten Testsystem bestimmte IC₅₀ entspricht den Literaturwerten.

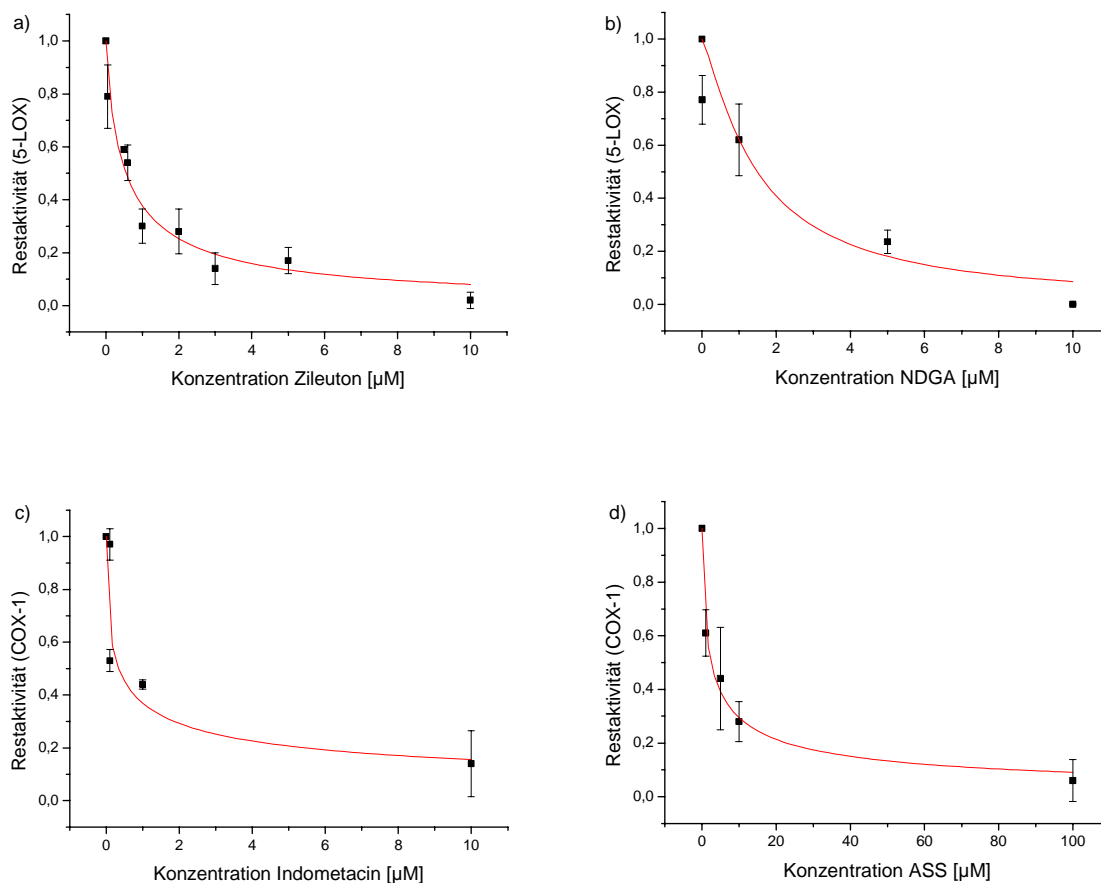


Abbildung 22: IC₅₀-Kurven der Standardinhibitoren Zileuton (a) und NDGA (b) für die 5-LOX (LTB₄) und für Indometacin (c) und ASS (d) für die COX-1 (12-HHT) (n = 3)

Für die NSAR Indometacin und ASS finden sich in der Literatur Hemmwerte, die bezogen auf die PGE₂-Bildung in humanem Vollblut bzw. TxB₂-Bildung in isolierten Blutplättchen menschlichen Ursprungs bestimmt wurden. Die Detektion erfolgte in der angegebenen Referenz über einen RIA. Da mit dem UV-Testsystem die Metaboliten PGE₂ und TxB₂ nicht erfassbar sind, wurde zur Messung der Beeinflussung der COX-1 der Metabolit 12-HHT herangezogen, der im UV-Bereich bei 230 nm detektierbar ist. Die Übereinstimmung der ermittelten Hemmwerte mit den Literaturwerten ist ein Indiz dafür, daß auch die 12-HHT als untypisches, sonst meist nicht bestimmtes COX-1-Produkt zur Evaluierung der Hemmung von Cyclooxygenasen geeignet ist. [Randall 1980] Die Testergebnisse, die durch Erfassung der Eicosanoide mittels HPLC und UV-Detektion erhalten wurden, liegen im Bereich der Literaturwerte, in denen zur Quantifizierung ein RIA genutzt wurde. Das zeigt, daß die Methode der Detektion der AA-Metaboliten keinen Einfluß auf die erhaltenen Ergebnisse besitzt und daß die Literaturwerte auch unter Nutzung der UV-Detektion reproduzierbar sind.

Auf weitere Bemühungen, die typischen COX-Metaboliten PGE₂, PGD₂ und TxB₂ der Erfassung durch das Testsystem zugänglich zu machen, wurde verzichtet. Dies wäre insofern interessant, da aufgrund des Metabolitenmusters der unterschiedlichen COX-Produkte Rückschlüsse auf eine eventuelle zusätzliche Beeinflussung nachgeschalteter Enzyme gezogen werden könnten. Auch die

spezifische Beeinflussung der Enzyme bestimmter Zellen (z.B. der COX der Blutplättchen) wäre dadurch möglicherweise erkennbar.

Betrachtet man die Dosis-Wirkungs-Diagramme der untersuchten Referenzverbindungen (Abbildung 23), so ist sichtbar, daß die hemmende Wirkung dieser Substanzen spezifisch auf nur ein Enzym des AA-Stoffwechselweges zielt. Zileuton beeinflusst die Produkte der 12-LOX, 15-LOX und COX nur geringfügig. NDGA zeigt in höheren Dosen neben der 5-LOX-Hemmung zusätzlich eine Inhibition der 12-LOX. Im Falle der beiden NSAR Indometacin und ASS beschränkt sich die Beeinflussung des AA-Metabolismus erwartungsgemäß auf die COX. Die drei erfaßten Lipoxygenasen bleiben praktisch unbeeinflusst.

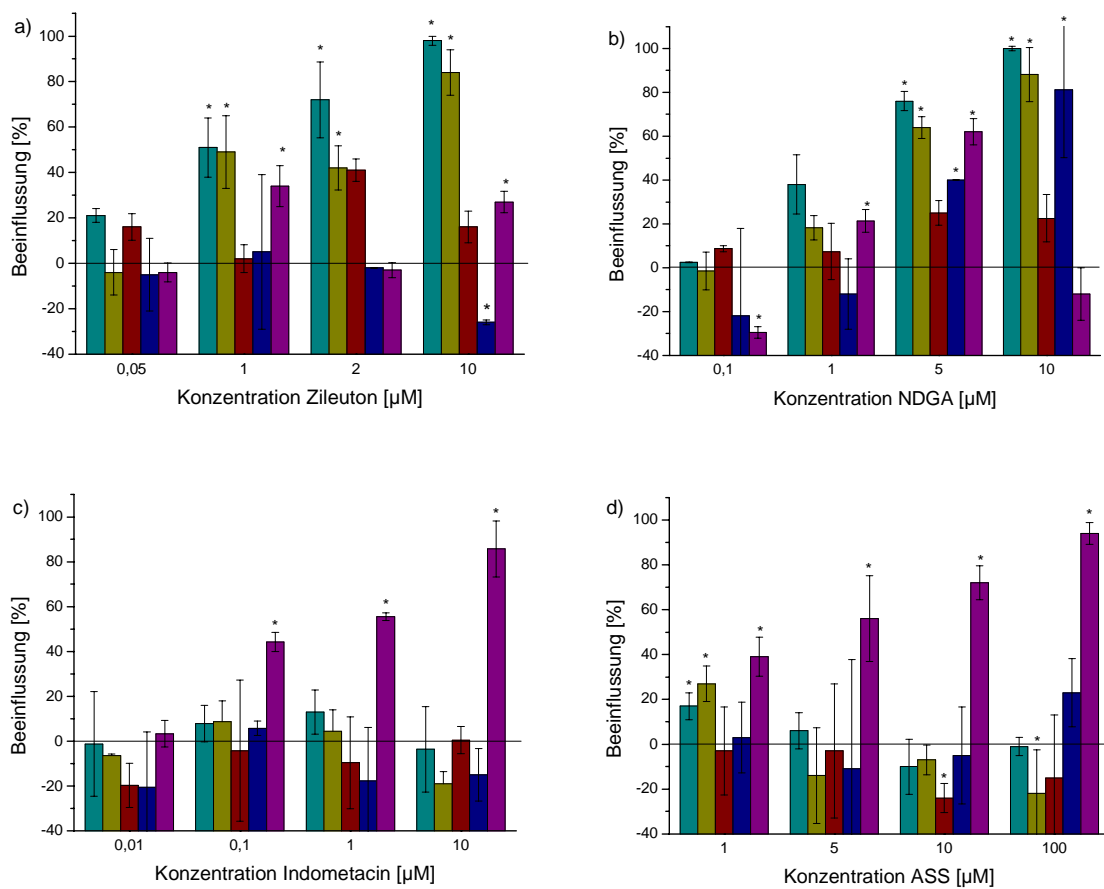


Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Diagramme der Standardinhibitoren Zileuton (a), NDGA (b), Indometacin (c), ASS (d) (n = 3)
cyan: LTB₄, gelb: 5-HETE, rot: 12-HETE, blau: 15-HETE, violett: 12-HHT

Eine Differenzierung zwischen der Inhibition der beiden COX-Isoformen ist mit dem beschriebenen Testsystem nicht möglich. Für Untersuchungen zu dieser Fragestellung sind in der Literatur entsprechende Modelle beschrieben. [Brideau 1996, Dannhardt 2001] Die 12-HHT, die in dem hier beschriebenen Assay erfaßt wird, sollte zum weitaus größten Teil von der COX-1 stammen, da die COX-2 physiologisch im humanen, peripheren Blut nicht exprimiert ist. Es kann jedoch nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden, daß bei einzelnen Probanden, z.B. durch eine entzündliche Erkrankung oder Infektion, die COX-2 ebenfalls exprimiert ist und deren Metaboliten wie die

der COX-1 mit dem Testsystem im Vollblut erfaßt werden. Dies wird umgangen, indem für IC₅₀-Bestimmungen das Blut mehrerer Probanden verwendet wird und so mögliche probanden-spezifische Eigenheiten ausgeglichen werden.

3.4.2 Potentielle neue Inhibitoren

Am Institut wurde eine Vielzahl neuer Substanzen synthetisiert, die hinsichtlich einer möglichen inhibierenden Wirkung auf Enzyme der Arachidonsäurekaskade untersucht werden sollten. Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Substanzen ist die Hydrazon- bzw. Amidrazonstruktur (vgl. auch Syntheseteil Kap. 2 dieser Arbeit). Zu Untersuchungen bezüglich des Wirkmechanismus dieser Substanzen wird auf die Arbeit von Clemens verwiesen. [Clemens 2001 (2)] Eine große Anzahl dieser Verbindungen wurde routinemäßig bereits auf ihre Inhibition der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 getestet. Im Kap. 3.4.2.5 sind einige dieser Testwerte den im Vollblut erhaltenen Werten gegenübergestellt.

3.4.2.1 Standardkonzentration 10 µM

Für die Routinetestung neuer Inhibitoren wurden diese in den meisten Fällen als erstes in der Konzentration 10 µM eingesetzt. Wurde bei dieser Testung ein Enzym stärker als 50 % gehemmt, erschien es sinnvoll, diese Substanz weiter zu untersuchen und eventuell eine Bestimmung der IC₅₀ vorzunehmen.

Die Ergebnisse für die getesteten Verbindungen sind geordnet nach ihren wesentlichen Strukturmerkmalen in den Tabellen 15 und 16 aufgelistet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur die Hemmwerte aufgelistet und die statistische Signifikanz der Hemmung bzw. Stimulation gekennzeichnet (*). Die Strukturformeln und vollständigen Testergebnisse mit den Mittelwerten und Standardabweichungen finden sich im Anhang in den Tabellen 20 bis 22.

Als eine weitere literaturbekannte Referenzsubstanz wurde die Verbindung CGS 8515 getestet. CGS 8515 ist ein selektiver 5-LOX-Inhibitor und war vor der Entwicklung des Zileuton eine zu Vergleichszwecken häufig herangezogene Standardsubstanz. Die in humanem Vollblut bestimmte IC₅₀ wird in der Literatur mit 0,6 µM angegeben. [Ku 1988]

Tabelle 15: Testergebnisse der offenkettigen Verbindungen im Vollblut
 Inhibitorkonzentration 10 μ M; Angaben in [%] Hemmung bezogen auf die
 Blindproben; negative Werte: Stimulation der Enzyme
 Struktur der Verbindungen: Tabelle 20 im Anhang

Verbindung	5-LOX		12-LOX	15-LOX	COX-1
	LTB ₄	5-HETE	12-HETE	15-HETE	12-HHT
CGS 8515	90	65	25	--	20
T1	-21	-38	-44	--	51
T2	32	36	30	--	35
9d	76*	75*	54*	-11	15
9c	27	34	32	--	--
T3	89*	82*	83	68	50*
T4	48*	54*	-96	-4	71
T5	29*	21*	8	--	83*
T6	-5	-28	4	1	-19
T7	-37	-15	-48	2	42
9g	63*	48*	1	23	41*
9k	32	-4	-4	-14	21
T8	9	-5	5	23	17
T9	38	42	-15	-110*	11
T10	99*	86*	87*	56*	73*
T11	66*	61*	65*	-12	46*
T12	14	-2	21	19	7
T13	91*	76*	27	25	2
T14	64*	45*	50*	-8	-44*
T15	28	-9	-32	-9	21
T16	-33	-51*	-3	-53*	-16
T17	93*	83*	25	11	-8
T18	51*	54*	-34*	-23	-13
T19	-6	5	9	1	17
T20	10	19	-17	13	43*
T21	-4	-35	-38*	-55	10

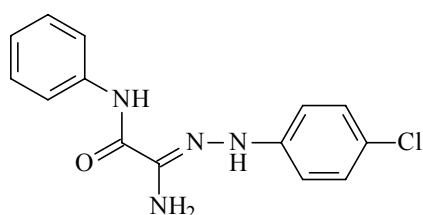
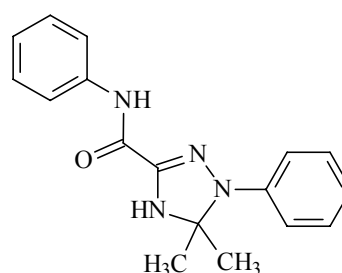
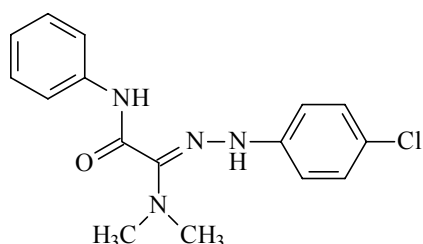
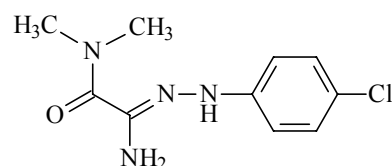
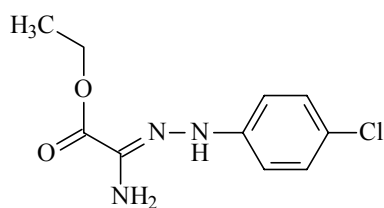
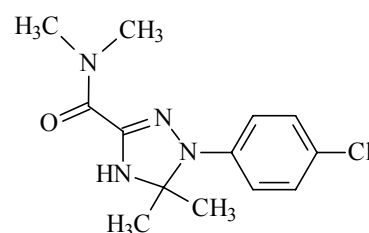
Tabelle 16: Testergebnisse der cyclischen Verbindungen im Vollblut
 InhibitorKonzentration 10 μ M; Angaben in [%] Hemmung bezogen auf die
 Blindproben; negative Werte: Stimulation der Enzyme
 Struktur der Verbindungen: Tabelle 21 im Anhang

Verbindung	5-LOX		12-LOX	15-LOX	COX-1
	LTB ₄	5-HETE	12-HETE	15-HETE	12-HHT
T22	85*	73*	38	26	29
13a	36*	36	45	-6	-3
T23	79*	41	46*	-6	19
T24	26	-1	27	20	57
T25	46*	35	-42	30	-37*
T26	32	27	7	25	39*
T27	49*	30	32	--	57*
T28	-4	5	-26	-15	4
T29	100*	92*	31	16	-55
T30	-9	15	-6	4	60*
T31	77*	67*	50	-3	-25*
T32	14	19*	-24	30	-7
T33	38	36*	64*	15	14
T34	26	21	26	-1	-7
T35	-4	-47*	22	33	-61*
T36	-21	33*	21	13	--
T37	32	3	18	21	16
T38	3	-5*	-42*	23	-
T39	2	-5	-36	-4	33*
T40	-26	-26	-10	36	13
T41	29	--	-43	25	21
T42	21	-17	-13	-3	7

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Görlitzer, Braunschweig wurden weitere Verbindungen auf ihre Wirkpotenz gegenüber den Enzymen der AA-Kaskade getestet. [Görlitzer 2002 (1-3), Görlitzer 2003 (1-3)] Diese Substanzen sind Hydroxamsäurederivate und damit Strukturverwandte des Zileuton. Abkömmlinge der Hydroxamsäure sind als Eisenchelatoren bekannt. Hierauf beruht auch ihre inhibitorische Wirkung gegenüber den Lipoxygenasen. [Brooks 1996] Die Strukturen und Testwerte dieser Substanzen finden sich im Anhang in Tabelle 22.

3.4.2.2 IC₅₀-Bestimmung für ausgewählte Substanzen

Sechs Verbindungen, die in der Konzentration 10 µM eine gute Wirksamkeit zeigten, wurden der Testung in weiteren Konzentrationen unterzogen, um ihre inhibitorische Aktivität durch einen IC₅₀-Wert zu charakterisieren (Strukturformeln der Verbindungen s. Schema 24). Die IC₅₀ wurden aus mindestens vier statistisch signifikant hemmenden Konzentrationen nach einer nichtlinearen Kurvenanpassung errechnet (s. Kap. 3.2.4). Für die Testung der vier Inhibitorkonzentrationen wurde in der Regel Blut von mindestens drei Probanden verwendet, um eventuell auftretende interindividuelle Unterschiede bei der Wirksamkeit im Zuge der Auswertung der Messungen sichtbar werden zu lassen und zu berücksichtigen.

**T3****T17****T4****T22****T10****T31**

Schema 24: Strukturformeln der Verbindungen, von denen IC₅₀-Werte ermittelt wurden

Tabelle 17 zeigt eine Zusammenstellung der ermittelten IC₅₀-Werte. Für die meisten Substanzen konnten nicht für alle fünf Metaboliten IC₅₀-Werte bestimmt werden. Die untersuchten Inhibitoren konnten aufgrund ihrer begrenzten Löslichkeit nicht in Konzentrationen über 10 bzw. 100 µM getestet werden.

Für die Verbindungen **T4** und **T10** liegen bei Kupfer IC₅₀-Werte vor, die für die 5-LOX intakter menschlicher PMNL bestimmt wurden. [Kupfer 1996] Der IC₅₀-Wert der Verbindung **T10** im PMNL-Testsystem ist mit 0,3 µM übereinstimmend mit dem Hemmwert im Vollbluttestsystem. Im

Fälle der Verbindung **T4** stehen sich das PMNL-Ergebnis von 8 μM und der Vollblutwert von 33,3 μM gegenüber. Diese Befunde bestätigen die Aussagen der Literatur, die eine weitgehende Übereinstimmung der gefundenen inhibitorischen Stärke bei Testung mit einem Vollblut- bzw. Zellassay postuliert. [Gresele 1986]

Tabelle 17: IC_{50} ausgewählter Verbindungen
Angaben in MW \pm SD [μM] (n = 3)

Verbindung	5-LOX		12-LOX	15-LOX	COX-1
	LTB_4	5-HETE	12-HETE	15-HETE	12-HHT
T3	1,05 \pm 0,5	1,31 \pm 0,9	2,62 \pm 0,7	k.H.	k.H.
T4	33,3 \pm 20,8	50,00 \pm 45,8	k.H.	k.H.	8,10 \pm 1,8
T10	0,24 \pm 0,1	0,59 \pm 0,5	4,80 \pm 3,1	6,40 \pm 2,2	4,78 \pm 4,3
T17	0,18 [#]	0,80 [#]	k.H.	k.H.	k.H.
T22	1,4 [#]	3,1 [#]	k.H.	k.H.	k.H.
T31	2,8 [#]	1,9 [#]	30 [#]	k.H.	k.H.

[#]: Einfachbestimmung der IC_{50} aus vier Hemmwerten

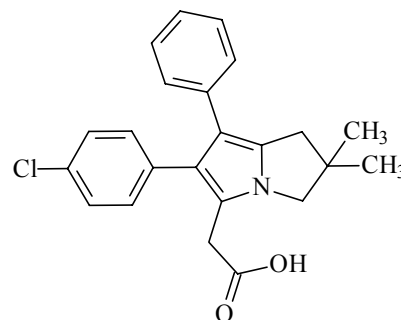
k.H.: keine Hemmung. Hemmung \leq 50 % in der Konzentration 10 μM bzw. 100 μM

3.4.2.3 Beeinflussung der einzelnen Metaboliten durch eine Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (Dosis-Wirkungs-Diagramme)

Mit dem beschriebenen Testsystem lassen sich fünf Eicosanoide, die aus dem Stoffwechsel von vier Enzymen hervorgehen, erfassen. Mit Hilfe der Dosis-Wirkungs-Diagramme kann der Einfluß der getesteten Substanzen auf diese vier Enzyme verglichen werden.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Standardinhibitoren wurden bereits im Kap. 3.4.1 vorgestellt. Sie zeigten deutlich, daß die Inhibitoren spezifisch auf einzelne Enzyme der Arachidonsäurekaskade wirken.

Die Abbildung 24 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindung **T10**, die durch ihre sehr gute Wirksamkeit auffällt. Aufgrund des parallelen Verlaufs der Kurven des LTB_4 und der 12-HHT kann bei dieser Verbindung von einem Dualhemmer mit Wirksamkeit gegenüber der 5-LOX und der COX-1 gesprochen werden. Im Vergleich zu dem Dualhemmer Licofelone (s. Schema 25) mit IC_{50} -Werten für die 5-LOX von 3,6 μM und für die COX von 3,9 μM [Tries 2002] ist die Verbindung **T10** an der COX etwa gleich, an der 5-LOX sogar um etwa eine Zehnerpotenz stärker wirksam. Neben ihrer Wirkung auf die 5-LOX und die COX-1 besitzt die Verbindung **T10** auch eine inhibitorische Aktivität auf 12- und 15-LOX.



Schema 25: Licofelone

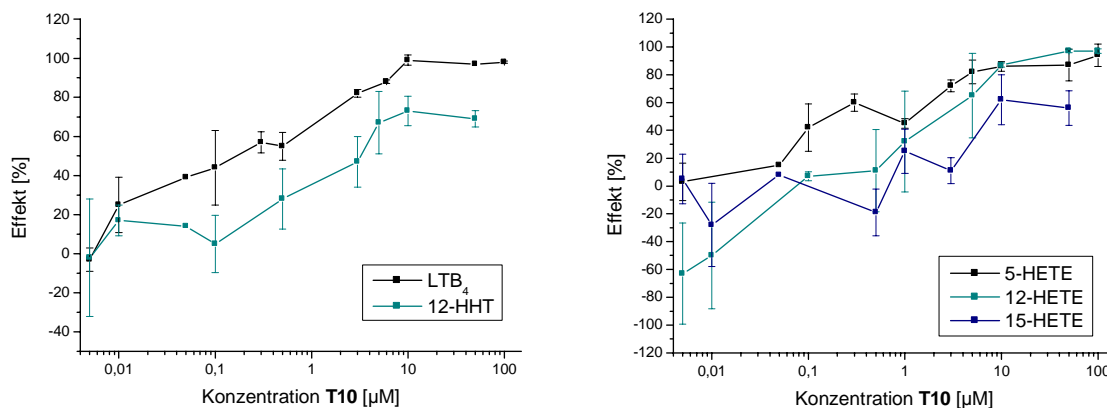


Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindung **T10** (n = 3)

In Abbildung 25 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Inhibitoren dargestellt, die für die IC₅₀-Bestimmungen ausgewählt wurden. In Falle der Verbindung **T4** kann aufgrund der IC₅₀-Werte und des Kurvenlaufs ebenfalls von einem Dualhemmer gesprochen werden, allerdings mit einer um mehr als eine Zehnerpotenz geringeren Wirkstärke als die Verbindung **T10**.

Die übrigen dargestellten Verbindungen zeigen eine mehr oder minder ausgeprägte selektive Hemmung der 5-LOX. Der parallele bzw. identische Verlauf der Kurven für LTB₄ und 5-HETE deutet darauf hin, daß die Hemmung der Eicosanoidbildung tatsächlich durch eine Beeinflussung des Enzyms 5-LOX bewirkt wird und nicht etwa durch die Inhibition von Enzymen, die der 5-LOX nachgeschaltet sind.

In einigen Fällen tritt eine nahezu dosisunabhängige Hemmung eines oder mehrerer Enzyme auf.

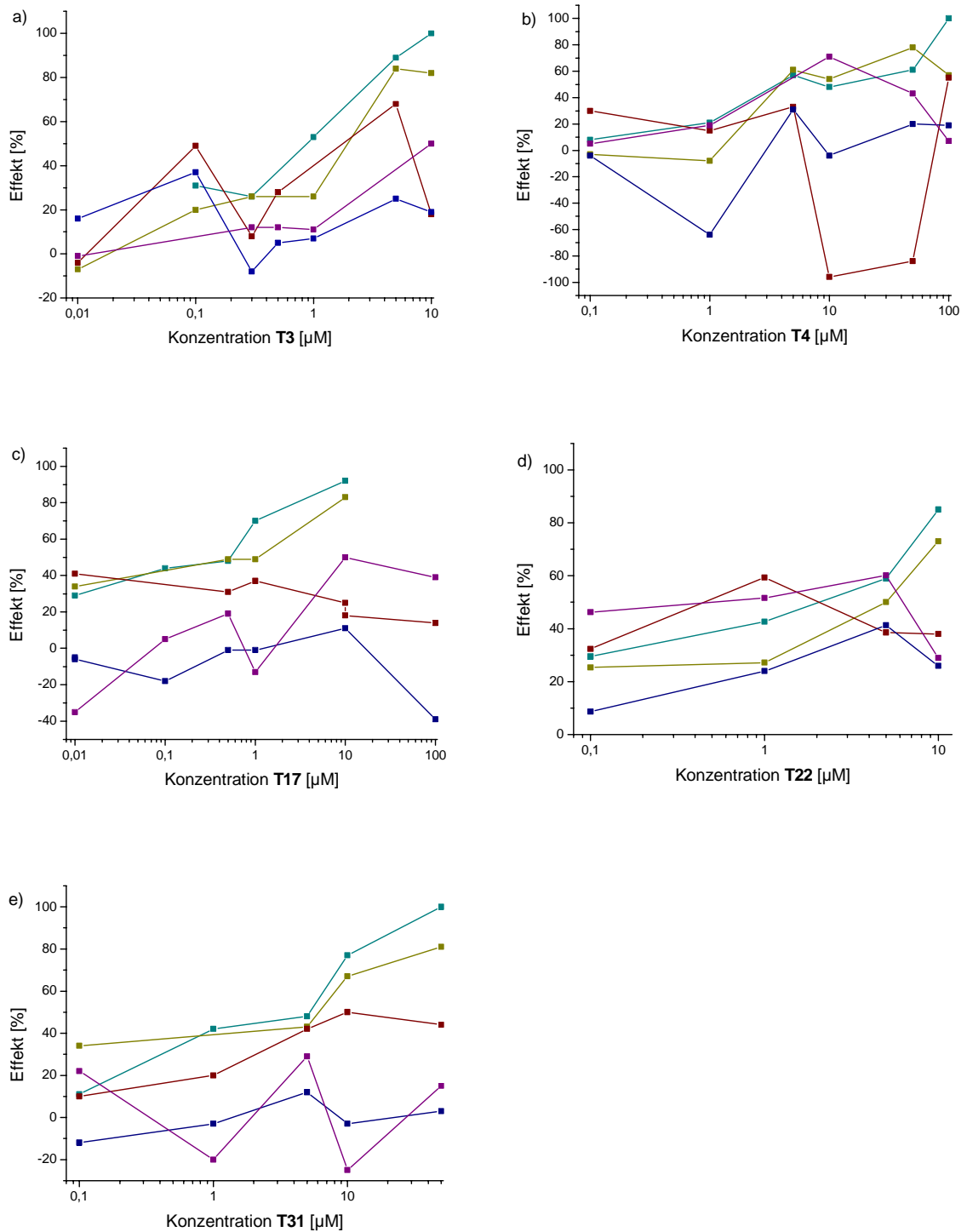
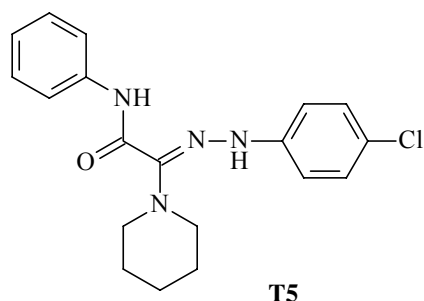


Abbildung 25: Dosis-Wirkungs-Kurven der Verbindungen **T3** (a), **T4** (b), **T17** (c), **T22** (d), **T31** (e) cyan: LTB₄, gelb: 5-HETE, rot: 12-HETE, blau: 15-HETE, violett: 12-HHT

Eine Verbindung, die mehrfachen Testungen unterzogen wurde, ist das Amidrazon **T5**. Abbildung 26 zeigt die ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven für diese Verbindung. Ein Zusammenhang zwischen Dosis und inhibitorischer Aktivität im humanen Vollblut kann nicht erkannt werden. Die sehr gute Wirksamkeit dieses Amidrazons auf die Lipoygenase-1 der

Sojabohne ($IC_{50} = 0,013 \mu\text{M}$) steht im Widerspruch zu den in der Vollbluttestung erzielten Ergebnissen. Gründe dafür könnten die geringe Stabilität der Substanz und ihre unzureichende Löslichkeit im Blut (Wasser) sein. Dieses Beispiel verdeutlicht, daß Aussagen zur Wirkpotenz der Amidrazonderivate nicht für die gesamte Verbindungsgruppe zu verallgemeinern sind.



Schema 26: Strukturformel des Amidrazons **T5**

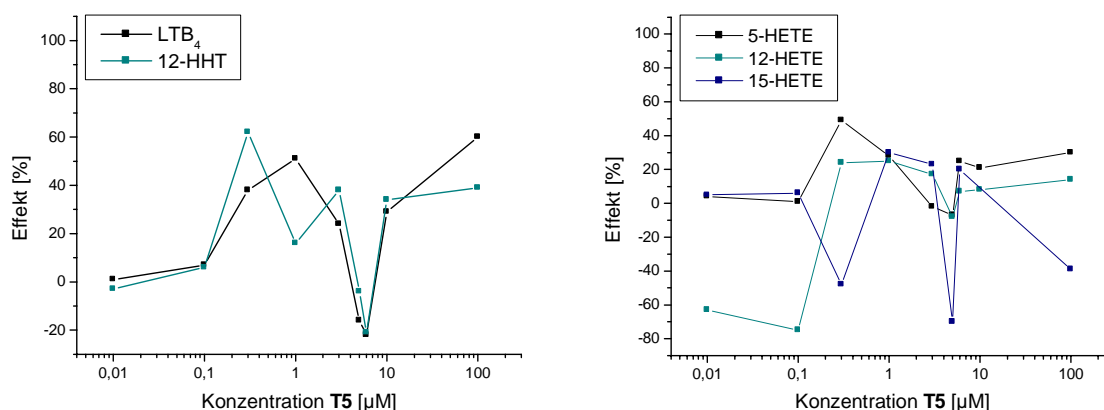


Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Kurven des Amidrazons **T5**

3.4.2.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Das Formulieren von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dient dazu, bei der Neusynthese von potentiellen Enzyminhibitoren Anhaltspunkte zu haben, von welcher strukturellen Veränderung Auswirkungen auf die Wirksamkeit erwartet werden können. Nun sind solche Aussagen, sofern sie nicht mit sehr großen Probenkollektiven unter Verwendung von mathematischen Modellen gemacht werden, für das völlige Neudesign eines wirksamen Inhibitors nicht tauglich. Jedoch lassen sich in begrenztem Umfang Aussagen ableiten, die den engen Kreis der untersuchten Strukturen betreffen. So kann unter Umständen beim Vergleichen der Testergebnisse ein Trend abgelesen werden, ob beispielsweise eine *para*-, *ortho*- oder *meta*-Substitution der Aromaten die Wirksamkeit gegenüber einem der vier untersuchten Enzyme positiv oder negativ beeinflusst. Auch die Art der Substituenten am Grundgerüst der untersuchten Strukturen bietet solch einen Ansatzpunkt für eine

Auswertung.

Bei der vergleichenden Betrachtung der in Tabelle 15 bis 17 aufgelisteten Hemmwerte lassen sich die folgenden Aussagen treffen, die jedoch keine allgemeingültigen Zusammenhänge darstellen können und sollen:

- Bei Betrachtung der Substitution des Stickstoff N^1 der offenkettigen Amidrazone wird deutlich, daß die Verbindungen ohne N^1 -Substituenten eine stärkere Wirksamkeit aufweisen als Amidrazone mit N^1 -Substitution. Lediglich die am Stickstoff N^1 methylsubstituierten Substanzen sind ähnlich stark inhibitorisch wirksam wie die NH_2 -substituierten Verbindungen.
- Die offenkettigen Verbindungen, speziell die N^1 -unsubstituierten Substanzen, zeigen in vielen Fällen eine Beeinflussung aller fünf erfaßten Metaboliten.
- Bei den heterocyclischen Verbindungen vermindert eine Substitution des N -Atoms in 4-Position des Rings die inhibitorische Aktivität stark.
- Oftmals haben die Heterocyclen auf die Lipoxygenasen einen stärker inhibitorischen Effekt als auf die Cyclooxygenase.
- Vergleichsweise gute Wirksamkeiten zeigen Amidrazone und 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole, die in α -Stellung zur Hydrazonstruktur den Substituenten CH_3CO bzw. $(CH_3)_2NCO$ besitzen.
- Die schwefelhaltigen Verbindungen weisen anders als ihre analogen Stickstoffverbindungen nahezu keine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber den Enzymen der AA-Kaskade auf.

3.4.2.5 Vergleich der Testwerte im Vollblut mit den Testwerten an der Sojabohnen-Lipoxygenase-1

Ein am Institut etabliertes Screeningsystem zur Testung neuentwickelter Inhibitoren ist die *in-vitro*-Testung an der Lipoxygenase-1 der Sojabohne (L-1). [Clemens 2001 (2)] Einen Vergleich hinsichtlich Eigenschaften und Hemmbarkeit zwischen der 15-LOX des Menschen in Monozyten und der Sojabohnen L-1 liefert Gleason. [1995]

Es wurde postuliert, daß die Ergebnisse der Testung an der Sojabohnen-LOX einen Anhaltspunkt für die Wirksamkeit der Substanzen gegenüber menschlichen Enzymen, auch gegenüber der humanen 5-LOX, liefern. [Schewe 1986, Wallach 1980] In den letzten Jahren ist man von dieser These jedoch mehr und mehr abgekommen. [Schewe 2002] Ob dieser Zusammenhang für die hier untersuchten Substanzen gilt, sollte anhand einiger Beispiele überprüft werden.

Für alle Substanzen, deren Synthese im Kapitel 2 beschrieben ist, sind die mit dem Sojabohnen-Testsystem erhaltenen Ergebnisse im Anhang in Tabelle 23 aufgeführt.

In Tabelle 18 sind die an der L-1 der Sojabohne erhaltenen IC_{50} -Werte und die mit dem Vollblut-testsystem erhaltenen Hemmwerte an der 5-LOX aufgeführt. Da die Sojabohnen L-1 in bezug auf die Arachidonsäure eine 15-LOX ist, wurden zum Vergleich, wenn die Bestimmung möglich war, in die Tabelle auch die im Vollblut erhaltenen Hemmwerte für die 15-HETE aufgenommen.

Zusätzlich enthält die Tabelle für einige Verbindungen die von Kupfer ermittelten IC_{50} -Werte an der 5-LOX humaner PMNL. [Kupfer 1996] Abbildung 27 stellt diese Ergebnisse graphisch dar.

Für die hier aufgeführten, im humanen Vollblut gut wirksamen Substanzen wird deutlich, daß eine allgemeine Regel für die Übertragung der am Pflanzenenzym erhaltenen Testwerte auf die Wirksamkeit im Blut nicht aufzustellen ist. Bei der direkten Gegenüberstellung der negativen Logarithmen der IC_{50} -Werte (Abbildung 27) wird ersichtlich, daß die Mehrzahl der betrachteten Verbindungen im Vollblut deutlich schlechter wirksam ist als am Pflanzenenzym. Es treten Unterschiede von über zwei Zehnerpotenzen auf. Jedoch gibt es auch Testsubstanzen, die in beiden Testsystemen eine nahezu gleiche Wirksamkeit aufweisen bzw. im humanen Vollblut stärker wirksam sind als am Pflanzenenzym (Verbindung **T17**, ein 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazol).

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die IC_{50} -Werte der Verbindung **T10**, die für die 5-LOX im humanen Vollblut und humanen PMNL sowie für die L-1 der Sojabohne identisch sind.

Tabelle 18: IC_{50} [μ M] ausgewählter Verbindungen gegenüber den Enzymen im humanem Vollblut, der 5-LOX humaner PMNL [Kupfer 1996] und der Sojabohnen L-1

Verbindung	humanes Vollblut (5-LOX, 15-LOX)			PMNL (5-LOX)	Sojabohne (L-1)
	LTB ₄	5-HETE	15-HETE	LTB ₄	
T3	1,05	1,31	k.H.	k.A.	0,061
T4	33,3	50,0	k.H.	8	0,011
T5	k.H.	k.H.	k.H.	1,2	0,013
T10	0,24	0,59	4,80	0,3	0,23
T17	0,18	0,80	k.H.	k.A.	0,31
T22	1,4	3,1	k.H.	k.A.	0,31
T31	2,8	1,9	k.H.	k.A.	0,41

k.H.: keine Hemmung. Hemmung ≤ 50 % in der Konzentration 10 μ M bzw. 100 μ M

k.A.: keine Angabe in [Kupfer 1996]

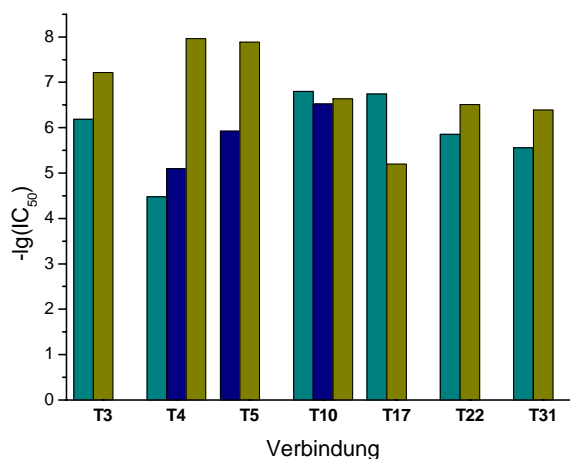


Abbildung 27: $-\lg(\text{IC}_{50})$ ausgewählter Verbindungen an der 5-LOX im humanen Vollblut (cyan), der 5-LOX in humanen PMNL (blau) und der L-1 der Sojabohne (gelb)

Da die gemessene Wirksamkeit der Substanzen im humanen Vollblut nicht allein davon abhängt, wie stark das jeweilige Enzym inhibiert wird, sondern auch andere Faktoren bei der Entstehung des Meßergebnisses eine wesentliche Rolle spielen, ist nicht sicher, ob die Verbindungen tatsächlich in ihrer reinen inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber den pflanzlichen und menschlichen Enzymen solche Unterschiede aufweisen. Vielmehr kann zum Beispiel ein Grund für diese großen Abweichungen sein, daß sich die Hydrazone nur schlecht im Blut lösen, dort während der Testung ausfallen und damit die eigentliche Testkonzentration weit unter der theoretischen, eingewogenen Konzentration liegt.

Beobachtungen beim Umgang mit den Testsubstanzen und Untersuchungen von Klietsch zeigten, daß die hier betrachteten Substanzen eine nur begrenzte Stabilität aufweisen. Besonders im gelösten Zustand stellt die Instabilität der Verbindungen ein Problem dar. Bei der Interpretation der Testergebnisse sollte diese Tatsache berücksichtigt werden. Nähere Ausführungen dazu finden sich in der Arbeit von Klietsch. [2003]

Bei Versuchen mit isoliertem humanen Enzymen bzw. Zellen ist es daher möglich, daß die erhaltenen Ergebnisse deutlich von den Werten der Vollbluttestung abweichen.

3.5 Zusammenfassung: Vollbluttestung

Auf Basis der in der Literatur bereits beschriebenen Methoden zur quantitativen Erfassung von Arachidonsäure-Metaboliten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neues Testsystem auf Basis humanen Vollblutes entwickelt. Mit dem Assay lassen sich fünf Metaboliten der Arachidonsäure erfassen. Diese Metaboliten sind: LTB₄, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 12-HHT. Die Detektion der Eicosanoide erfolgt nach HPLC-Trennung durch Absorptionsmessung im UV-Bereich mit einem Dioden-Array-Detektor. Die Entwicklung einer ebenfalls für die Eicosanoiderfassung verwendbaren Alternativmethode, in der die AA-Metaboliten nach Fluoreszenzmarkierung detektiert werden, bot gegenüber der UV-Methode keine Vorteile. Besonders die Erfassungsgrenze der Fluoreszenzmethode brachte gegenüber der UV-Messung keine Verbesserung. Die Quantifizierung der Eicosanoide erfolgte über die Auswertung der Peakflächen und wurde auf den internen Standard PGB₁ bezogen.

Durch systematische Untersuchungen wurden alle Testbedingungen und Arbeitsschritte, die zur Durchführung der Testung notwendig sind, optimiert. Erstmals wurde der Einfluß der gleichzeitigen Zugabe von Calcium- und Magnesium-Ionen auf den Arachidonsäuremetabolismus untersucht. Durch Verwendung dieser Ionenmischung läßt sich die Menge der Eicosanoide im Vergleich zu Proben, denen nur eine Art Ion zugegeben wurde, deutlich steigern.

Einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die gebildete Menge an Eicosanoiden haben die Lösungsmittel, die während der Testung zum Blut gegeben werden. Durch DMSO stieg die Metabolitenausbeute gegenüber Wasser um bis zu 50 % an.

Das Ergebnis der Optimierung, eine Vorschrift zur Standarddurchführung der Vollbluttestung, ist im Methodenteil (Kap. 3.2.3) aufgeführt. Diese Arbeitsanleitung ist zur Durchführung routinemäßiger Testungen geeignet.

Das Testsystem wurde zunächst für den internen Standard PGB₁ validiert. Die vollständige Validierung der Methode für alle fünf erfaßbaren AA-Metaboliten nach den ICH-Richtlinien ist Gegenstand einer nachfolgenden Diplomarbeit und noch nicht vollständig abgeschlossen.

Im Kapitel 3.4 wurden die Ergebnisse vorgestellt, die mit dem neu entwickelten Testsystem erhalten wurden. Die Untersuchung von literaturbekannten Referenzsubstanzen mit dem beschriebenen Assay ergab IC₅₀-Werte, die den in der Literatur angegebenen entsprechen. Neben der Validierung ist dies ein Nachweis dafür, daß das Testsystem verlässliche Ergebnisse liefert. Es ist für die Untersuchung neu synthetisierter Verbindungen auf ihre Fähigkeit, einzelne Wege der Arachidonsäurekaskade zu hemmen, tauglich.

Eine Reihe der im Syntheseteil dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen und zahlreiche andere Substanzen wurden mit dem Testsystem auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den Enzymen der AA-Kaskade untersucht.

Einige der Verbindungen zeigen in ihren Dosis-Wirkungs-Kurven beim Vergleich der Hemmwerte über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich hinweg eine gleichmäßige inhibitorische Wirkung auf alle fünf erfaßbaren Metaboliten. Andere Verbindungen hemmen nur einzelne Enzyme der AA-Kaskade. Ebenso waren unter den untersuchten Substanzen solche, die den Eicosanoidstoffwechsel gänzlich unbeeinflußt lassen oder gar zu einer Stimulation der Synthese von AA-Metaboliten führen.

Mit dem Amidrazon **T10** wurde eine im humanen Vollblut sehr gut wirksame Verbindung gefun-

den. Aufgrund der gleichzeitigen Beeinflussung von 5-LOX und COX-1 kann bei diesem Amidrazon von einem Dualhemmer gesprochen werden.

Andere Verbindungen mit einer ähnlichen Struktur zeigen dagegen nur eine äußerst geringe oder gar keine Wirksamkeit bei der Vollbluttestung. Hierfür könnten die geringe Löslichkeit und die unzureichende Stabilität der Substanzen verantwortlich sein.

Ein Vergleich der mit dem Vollblut-Testsystem erhaltenen Werte mit Hemmwerten, die an einem Screeningsystem unter Verwendung der Lipoxygenase-1 der Sojabohne ermittelt wurden, zeigte, daß zwischen den Ergebnissen der beiden Testmethoden teilweise erhebliche Abweichungen auftreten. Eine Übertragung der mit dem Sojabohnen-Screening erhaltenen Hemmwerte auf die Situation im menschlichen Vollblut ist daher nicht möglich. In den meisten Fällen weisen die untersuchten Substanzen gegenüber der L-1 der Sojabohne eine größere inhibitorische Aktivität auf als für die Enzyme des humanen Vollblutes gefunden wurde.

4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue potentielle Hemmstoffe der Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade zu synthetisieren. Um diese Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegenüber den die Arachidonsäure verstoffwechselnden Enzymen des Menschen zu untersuchen, sollte ein entsprechendes Testsystem entwickelt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden ausgehend von 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindungen über die Zwischenstufe der Carbonsäurearylhyaazonoylchloride Amidrazone synthetisiert. Diese Verbindungen waren zum einen potentielle Inhibitoren der Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade, zum anderen dienten sie als Ausgangsstoffe für Reaktionen mit Carbonylverbindungen zu heterocyclischen Systemen. Es wurden neue Vertreter der 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazole, 1*H*-1,2,4-Triazole und Naphthotriazepine erhalten und charakterisiert. Ein bisher in dieser Form nicht beschriebenes 1,6-Dihydro-1,2,4-triazin wurde auf einem neuen Syntheseweg aus Amidrazon und Diacetyl erhalten. Die Cyclisierungsreaktionen wurden mit *para*-Toluolsulfonsäure katalysiert.

Zur Darstellung von Amidrazonen mit zweifacher Substitution am Hydrazon-Stickstoff N^2 wurden zwei Reaktionswege gefunden. Auf einem Alternativweg zur Japp-Klingemann-Reaktion wurde ein *N*-methylsubstituiertes Carbonsäurearylhyaazonoylchlorid erhalten, welches anschließend durch Umsetzung mit Piperidin in das entsprechende N^2 -methylsubstituierten Amidrazon überführt wurde. Durch Reaktion eines N^1 -pentamethylensubstituierten Amidrazons mit Formaldehyd war ein N^2 -hydroxymethylsubstituiertes Amidrazon zugänglich.

Die neu synthetisierten Verbindungen wurden spektroskopisch und elementaranalytisch charakterisiert. Zur Strukturaufklärung und -absicherung wurden, wenn erforderlich, zweidimensionale NMR-Techniken herangezogen.

Für den Ablauf der Cyclisierungsreaktionen der Amidrazone mit Carbonylverbindungen wurde ein verallgemeinerndes Reaktionsschema aufgestellt.

Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der Wirksamkeit der Hydrazon-derivate gegenüber den Enzymen der Arachidonsäure-Kaskade.

Ziel der Arbeit war die Optimierung der Testbedingungen und der Schritte der Versuchsdurchführung. Dies wurde durch eine systematische Untersuchung der Faktoren, die einen Einfluß auf die Eicosanoidbiosynthese haben, realisiert. Dabei wurden auch alternative Methoden (Fluoreszenzderivatisierung, Extraktion mit organischem Lösungsmittel) in die Betrachtungen einbezogen.

Als Ergebnis wurde eine auch in der Routinetestung anwendbare Methode erstellt. Die Testung basiert auf der Verwendung humanen Vollblutes als Enzymquelle und Probenmatrix. Die Verstoffwechslung der Arachidonsäure wurde durch Zugabe von Calcium-Ionophor A23187 und Arachidonsäure stimuliert. Zusätzlich wurden die Blutproben mit einer Mischung aus Calcium- und Magnesium-Ionen versetzt. Dadurch ließ sich die Ausbeute der im Blut gebildeten AA-Metaboliten im Vergleich mit dem Zusatz nur einer Ionenart erheblich steigern. Nach Beendigung der Enzymreaktionen wurden die Eicosanoide mittels Festphasenextraktion aus der Testmatrix isoliert und der HPLC-Trennung mit anschließender UV-Detektion unterzogen. Die Quantifizierung der Arachidonsäure-Metaboliten erfolgte durch Auswertung der Peakflächen, die gegen den internen

Standard PGB₁ korrigiert wurden.

Alternative Extraktions- und Detektionsmethoden (flüssig-flüssig-Extraktion, Fluoreszenzdetektion) wurden ebenfalls untersucht, kamen für die Routinetestung jedoch nicht zur Anwendung, da sie keine Vorteile gegenüber der Standardmethode aufwiesen.

Mit dem entwickelten Vollbluttestsystem ist es möglich, fünf Metaboliten der Arachidonsäure zu bestimmen, die aus dem Stoffwechsel von vier Enzymen hervorgehen. Die erfaßbaren Eicosanoide sind: LTB₄ und 5-HETE (5-LOX), 12-HETE (12-LOX), 15-HETE (15-LOX) und 12-HHT (COX-1).

Die beschriebene Testmethode wurde für das PGB₁ nach den ICH-Richtlinien validiert.

Mit Hilfe von vier in der Literatur umfassend untersuchten Standardinhibitoren (Zileuton, NDGA, ASS, Indometacin), die der Testung unterzogen wurden, konnte die Genauigkeit der mit der Methode erhaltenen Testwerte nachgewiesen werden. Die ermittelten IC₅₀-Werte stimmten mit den publizierten Angaben sehr gut überein.

Eine Auswahl der am Institut synthetisierten Hydrazonderivate wurde in der Konzentration 10 µM im humanen Vollblut getestet. Hierbei zeigte sich eine große Heterogenität der untersuchten Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkstärke. Dadurch ist das Formulieren von Struktur-Wirkungs-Beziehungen aus den vorliegenden Daten nur schwer möglich.

Mit dem Amidrazon **T10** wurde eine im humanen Vollblut sehr gut wirksame Substanz gefunden. Aufgrund ihrer inhibitorischen Wirksamkeit sowohl gegenüber der 5-LOX als auch der COX-1 kann diese Substanz als Dualhemmer bezeichnet werden.

Der Vergleich der Hemmwerte der untersuchten Inhibitoren im humanen Vollblut mit denen an der Lipoxygenase-1 der Sojabohne machte deutlich, daß die Ergebnisse der beiden Testmethoden für die Mehrzahl der untersuchten Substanzen deutlich voneinander abweichen. Eine Vorhersage der Wirksamkeit der Verbindungen im Vollblut ist aus den an der L-1 der Sojabohne erhaltenen Werten nicht möglich.

5 Literaturverzeichnis

- Abeyasinghe, R.D., P.J. Roberts, C.E. Cooper, K.H. MacLean, R.C. Hider, J.B. Porter:** The environment of the lipoxygenase iron binding site explored with novel hydroxypyridinone iron chelators. *J. Biol. Chem.* 271, 7965-7972 (1996)
- Aced, G., H.J. Möckel:** *Liquidchromatographie. Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC.* Wiley-VCH, Weinheim (1991)
- Alanko, J., A. Riutta, H. Vapaatalo, I. Mucha:** Catecholamines decrease leukotriene B₄ and increase thromboxane B₂ synthesis in A23187-stimulated human whole blood. *Prostaglandins* 42, 279-287 (1991)
- Alanko, J., E. Sievi, Z. Lähteenmäki, I. Mucha, H. Vapaatalo, J. Parantainen:** Catechol estrogens as inhibitors of leukotriene synthesis. *Biochem. Pharmacol.* 55, 101-104 (1998)
- Ammon, H.P.T., T. Mack, G.B. Singh, H. Safayhi:** Inhibition of leukotriene-B₄ formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of boswellia-serrata. *Planta Med.* 57, 203-207 (1991)
- Audrieth, L.F., J. R. Weisiger, H. E. Carter:** Alkylation of phenylhydrazine in liquid ammonia. *J. Org. Chem.* 6, 417-420 (1941)
- Avis, I., S.H. Hong, A. Martinez, T. Moody, Y.H. Choi, J. Trepel, R. Das, M. Jett, J.L. Mulshine:** 5-Lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J.* 15, 2007-2009 (2001)
- Babu, K.S., S.S. Salvi:** Aspirin and asthma. *Chest* 118, 1470-1476 (2000)
- Barja-Fidalgo, C., I.M. Fierro, L.A.C. Brando, D.S.E. Teixeira, C.C. de Amorim, E.J. Barreiro:** Anti-inflammatory profile of *N*-phenylpyrazole arylhydrazone derivatives in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 703-707 (1999)
- Baumann J., G. Wurm:** Soybean lipoxygenase-1 inhibition by ketone hydrazones. *Agents Actions* 12, 360-364 (1982)
- Benincori, T., F. Sannicolo:** New access to 2-(aryloxy)-, 2-(aryloxyazo)-, and 2-aminoindoles, -benzofurans, and -thianaphthenes. *J. Org. Chem.* 53, 1309-1312 (1988)
- Benrezzouk, R., M.C. Terencio, M.L. Ferrandiz, M. Hernandez-Perez, R. Rabanal, M.J. Alcaraz:** Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone. *Inflamm. Res.* 50, 96-101 (2001)
- Benson, S.C., J.L. Gross, J.K. Snyder:** Indole as a dienophile in inverse electron demand Diels-Alder reactions: reactions with 1,2,4-triazines and 1,2-diazines. *J. Org. Chem.* 55, 3257-3269 (1990)
- Berg, J., H. Fellier, T. Christoph, J. Grarup, D. Stimmeder:** The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflamm. Res.* 48, 369-379 (1999)

- Blanchard, J.S.:** Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 215-39 (1996)
- Bodem, S.H.:** Zileuton, ein 5-Lipoxygenase-Hemmer. *Pharmazeutische Ztg.* 142 (1997)
- Boileau, C., J. Martel-Pelletier, J.Y. Jouzeau, P. Netter, F. Moldovan, S. Laufer, S. Tries, J.P. Pelletier:** Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: inhibition of proapoptotic factors. *J. Rheumatol.* 29, 1446-1453 (2002)
- Borgeat, P., B. Samuelsson:** Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effect of ionophor A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2148-2152 (1979)
- Borgeat, P., S. Picard:** 19-Hydroxyprostaglandin B₂ as an internal standard for on-line extraction-high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase products. *Anal. Biochem.* 171, 283-289 (1988)
- Brash, A.R., M.S. Chang, C.D. Funk, W. Song:** Novel transformations of HPETEs by cytochrome P-450s. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 744, 25-30 (1995)
- Brash, A.R., W.E. Boeglin, M.S. Chang:** Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6148-6152 (1997)
- Bray, M.A.:** Leukotrienes in inflammation. *Agents Actions* 19, 87-99 (1986)
- Brideau, C., S. Kargman, S. Liu, A.L. Dallob, E.W. Ehrich, I.W. Rodger, C.C. Chan:** A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm. Res.* 45, 68-74 (1996)
- Brideau, C., C. van Staden, A. Styhler, I.W. Rodger, C.C. Chan:** The effects of phosphodiesterase type 4 inhibitors on tumor necrosis factor-A and leukotriene B₄ in a novel human whole blood assay. *Br. J. Pharmacol.* 126, 979-988 (1999)
- Brinckmann, R., K. Schnurr, D. Heydeck, T. Rosenbach, G. Kolde, H. Kühn:** Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* 91, 64-74 (1998)
- Brooks, C.D.W., J.B. Summers:** Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J. Med. Chem.* 39, 2629-2654 (1996)
- Buckle, D.R., J. Bumstead, G.D. Clarke, K.A. Foster, H. Parr, J.F. Taylor, V.E. Thody, R.A.B. Webster:** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase by 2-benzylaminophenols. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 33, 29-33 (1988)
- Bülow, C., E. King:** Beiträge zur Kenntnis des Acetessiganilids. *Liebigs Ann. Chem.* 211-220 (1924)
- Bülow, C., W. Spengler:** [Arylamino]acetylacetones, their condensation and cleavage products. *Chem. Ber.* 58, 1375-1386 (1925)

- Cai, X., R.T. Scanell, D. Yaeger, M.S. Hussoin, D.B. Killian, C. Qian, J. Eckman, S.B. Hwang, L. Libertine-Garahan, C.G. Yeh, S.H. Ip, T.Y. Shen:** Trans-2-[3-methoxy-4-(chlorophenylthioepoxy)-5-(*N*-methyl-*N*-hydroxyureidyl)methylphenyl]-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)tetrahydrofuran (CMI-392), a potent dual 5-lipoxygenase inhibitor and platelet-activating factor receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 41, 1970-1979 (1998)
- Capdevila, J., L.J. Marnett, N. Chacos, R.A. Prough, R.W. Estabrook:** Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyeicosatetraenoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 767-770 (1982)
- Carlson, R., A. Kreft, D. Hartman, L. Tomchek, Y. Lock, B. Weichman, K. Glaser:** WY-50295 tromethamine: a 5-lipoxygenase inhibitor without activity in human whole blood. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 60, 31-41 (1999)
- Carter, G.W., P.R. Young, D.H. Albert, J. Bouska, R. Dyer, R.L. Bell, J.B. Summers, D.W. Brooks:** 5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharm. Exp. Ther.* 256, 929-937 (1991)
- Case, F.H.:** The preparation of 1,2,4-triazines and 1,2,4-triazolines from substituted carboxamide hydrazones. *J. Heterocycl. Chem.* 7, 1001-1005 (1970)
- Case, F.H.:** The preparation of substituted 1,2,4-triazolines and substituted picolinic acid methylene hydracides by the action of certain carboxamide hydrazones with ketones. *J. Heterocycl. Chem.* 10, 353-355 (1973)
- Celardo, A., G. Dell'Elba, Z.M. Eltantawy, V. Evangelista, C. Cerletti:** Simultaneous determination of leukotrienes B₄ and E₄ in whole blood and of leukotriene E₄ in urine of rabbit by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 658, 261-269 (1994)
- Chakraborty, I., S.K. Das, J. Wang, S.K. Dey:** Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the periimplantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 107-122 (1996)
- Chandrasekharan, N.V., H. Dai, K.L.T. Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T.S. Elton, D.L. Simmons:** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 13926-13931 (2002)
- Chen, J.K., J. Cardevila, R.C. Harris:** Cytochrome P450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6322-6331 (2001)
- Chilton, F.H., J.T. O'Flaherty, C.E. Walsh, M.J. Thomas, R.L. Wykle, L.R. de Chatelet, B.M. Waite:** Platelet activating factor stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-*O*-alkyl-2-*O*-acetyl-*SN*-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.* 257, 5402-5407 (1982)
- Claesson, H.E., U. Lundberg, C. Mamsten:** Serum-coated zymosan stimulates the synthesis of leukotriene B₄ in human polymorphonuclear leukocytes – inhibition by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 99, 1230-1237 (1981)
- Clancy, R.M., C.A. Dahinden, T.E. Hugli:** Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by *N*-Formyl-Met-Leu-Phe or complement component C5A is independent of phospholipase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7200-7204 (1983)

- Clemens, F.:** Beiträge zur Untersuchung des Hemmechanismus offenkettiger Amidrazonderivate an der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen am Beispiel der Verbindung Fro A6. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- Clemens, F., G. Drutkowski, M. Wiese, P. Froberg:** The inactivation of lipoxygenase-1 from soybeans by amidrazones. *Biochim. Biophys. Acta* 1549, 88-98 (2001) (1)
- Clemens, F.:** Amidrazone als Inhibitoren von Lipoxygenasen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001) (2)
- Connolly, P.J., S.K. Wetter, K.N. Beers, S.C. Hamel, R.H. Chen, M.P. Wachter, J. Ansell, M.M. Singer, M. Steber, D.M. Ritchie, D.C. Argentieri:** *N*-hydroxyurea and hydroxamic acid inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 979-984 (1999)
- CPMP Working Party on Quality of Medical Products,** Note for Guidance, Analytical Validation. Brüssel (1989)
- Crowther, S.D., P.J. Rees:** Current treatment of asthma – focus on leukotrienes. *Expert. Opin. Pharmacother.* 1, 1021-1040 (2001)
- Cryer, B., M. Feldman:** Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 104, 413-421 (1998)
- Cuadro, A.M., J. Valenciano, J.J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, C. Sunkel, M.F. de Casa-Juana, M.P. Ortega:** Synthesis and biological evaluation of 2,6-di-tert-butylphenol hydrazones as 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 173-180 (1998)
- Dadaian, M., P. Westlund:** Albumin modifies the metabolism of hydroxyeicosatetraenoic acids via 12-lipoxygenase in human platelets. *J. Lipid. Res.* 40, 940-947 (1999)
- Dannhardt, G., M. Lehr:** In-vitro evaluation of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors using bovine neutrophils and platelets and HPLC. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 419-424 (1992)
- Dannhardt, G.:** COX- und LOX-Inhibitoren: Entwicklung, Testung, Perspektiven. In *Entzündung und verwandte Reaktionen – Neue Erkenntnisse, neue Wirkstoffe*, R. Hirschelmann (Ed.) Jenapharm GmbH, Jena, 41-45 (1993)
- Dannhardt, G., L. Flemmer, R.W. Hartmann, A. Kleber, E. Schulze:** Spectrofluorimetric quantification of malondialdehyde for evaluation of cyclooxygenase-1/ thromboxane synthase inhibition. *Arch. Pharm.* 331, 359-364 (1998)
- Dannhardt, G., H. Ulbrich:** In-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors based on a single HPLC run with UV detection using bovine aortic coronary endothelial cells (BAECs). *Inflamm. Res.* 50, 262-269 (2001)
- Danz, H.:** Synthese von alkylierten Pyrazolen und 1,2,4-Triazolen durch 1,3-dipolare Cycloaddition. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1995)
- Davis, P.:** Lipoxygenase products in immunity. *Immun. Invest.* 16, 623-647 (1988)
- de Leval, X., J. Delarge, P. Devel, P. Neven, C. Michaux, B. Masereel, B. Pirotte, J.L. David, Y. Henrotin, J.M. Dogne:** Evaluation of classical NSAIDs and COX-2 selective inhibitors on purified bovine enzymes and human whole blood. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 64, 211-216 (2001)

- de Leval, X., F. Julemont, J. Delarge, B. Pirotte, J.M. Dogne:** New trends in dual 5-LOX/ COX inhibition. *Curr. Med. Chem.* 9, 941-962 (2002)
- Demasi, M., G.E. Caughey, M.J. James, L.G. Cleland:** Assay of cyclooxygenase-1 and 2 in human monocytes. *Inflamm. Res.* 49, 737-743 (2000)
- Dempke, W., C. Rie, A. Grothey, H.J. Schmoll:** Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 411-417 (2001)
- Denzlinger, C.:** Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 23, 4275-4279 (1996)
- DIA:** International harmonization and consensus DIA meeting on bioavailability and bioequivalence testing requirements and standards. *Drug Inf. J.* 25, 471 (1991)
- DIN 55350 T13:** *Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik, Begriffe zur Genauigkeit von Ermittlungsverfahren und Ermittlungsergebnissen* Berlin (1987)
- Dinchuk, J.E., B.D. Car, R.J. Focht, J.J. Johnston, B.D. Jaffee, M.B. Covington, N.R. Contel, V.M. Eng, R.J. Collins, P.M. Czerniak, S.A. Corry, J.M. Trzaskos:** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378, 406-409 (1995)
- Doehl, J., T. Greibrokk:** High-performance liquid chromatographic separation and determination of prostaglandins, oxidized by pyridinium dichromate. Optimization and applications. *J. Chromatogr.* 349, 431-438 (1985)
- Donner, C.:** Synthese von Δ^2 -1,3,4-Thiadiazolinen und Δ^2 -1,2,4-Triazolinen als potentielle Lipoxigenaseinhibitoren. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002)
- Drutkowski, G.:** Synthese von 1-Aryl-5,5-dialkyl-1,2,4-triazolinen als Lipoxigenase-Hemmstoffe. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999)
- Drutkowski, G., C. Donner, I. Schulze, P. Frohberg:** Derivatives of arylhydrazonic acids. Part 2: a facile approach to the novel 4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazoles via cyclization of amidrazones. *Tetrahedron* 58, 5317-5326 (2002)
- Dünges, W.:** 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin as a new fluorescence label for fatty acids. *Anal. Chem.* 49, 442-445 (1977) (1)
- Dünges, W., A. Meyer, K.E. Müller, M. Müller, R. Pietschmann, C. Plachetta, R. Sehr, H. Tuss:** Fluorescence labeling of organic acidic compounds with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-MMC). *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 288, 361-368 (1977) (2)
- Dünges, W., N. Seiler:** High-performance liquid chromatographic separation of esters of 4-hydroxymethyl-7-methoxy-coumarin. *J. Chromatogr.* 145, 483-488 (1978)
- Durst, H.D., M. Milano, E.J. Kikta, S.A. Connelly, E. Grushka:** Phenacyl esters of fatty acids via crown ether catalysts for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 47, 1797-1801 (1975)
- Easmon, J., G. Heinisch, J. Hofmann, T. Langer, H.H. Grunicke, J. Fink, G. Purstinger:** Thiazolyl and benzothiazolyl hydrazones derived from α -(*N*)-acetylpyridines and diazines: synthesis, antiproliferative activity and CoMFA studies. *Eur. J. Med. Chem.* 32, 397-408 (1997)

- Engels, F., F.P. Nijkamp:** Pharmacological inhibition of leukotriene actions. *Pharm. World Sci.* 20, 60-65 (1998)
- Engels, W., M.A.F. Kamps, P.J.M.R. Lemmens, G.J. van der Vusse, R.S. Reneman:** Determination of prostaglandins and thromboxane in whole blood by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 427, 209-218 (1988)
- Enomoto, K.I., K. Furuya, S. Yamagishi, T. Oka, T. Maeno:** Release of arachidonic acid via Ca^{2+} increase stimulated by pyrophosphonucleotides and bradykinin in mammary tumor cells. *Cell Biochem. Funct.* 13, 279-286 (1995)
- Eskra, J.D., M.J. Pereira, M.J. Ernest:** Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography analysis of lipoxygenase pathway products. *Anal. Biochem.* 154, 332-337 (1986)
- Fleischer, R., P. Froberg, A. Büge, P. Nuhn, M. Wiese:** QSAR analysis of substituted 2-phenylhydrazonoacetamides acting as inhibitors of 15-lipoxygenase. *QSAR* 19, 162-172 (2000)
- Fliege, W., R. Grashey, R. Huisgen:** 1,3-Dipolar cycloadditions. 91. Chemistry of *N*-methyl-*C*-phenylnitrilimine. *Chem. Ber.* 117, 1194-1214 (1984)
- Fogh, K., T. Herlin, K. Kragballe:** In vitro inhibition of leukotriene B_4 formation by exogenous 5-lipoxygenase inhibitors is associated with enhanced generation of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE) by human neutrophils. *Arch. Dermatol. Res.* 280, 430-436 (1988)
- Ford-Hutchinson, A.W.:** Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed. Proced.* 44, 25-29 (1985)
- Ford-Hutchinson, A.W.:** Arachidonate 12-lipoxygenase: characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids* 4, 65-74 (1991) (1)
- Ford-Hutchinson, A.W.:** FLAP: A novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 68-70 (1991) (2)
- Froberg, P.:** 1-Arylhydrazono-2-oxoadipinsäure-1-chloride als Ausgangsverbindungen für die Synthese potentieller Inhibitoren ausgewählter Enzyme der Arachidonsäurekaskade. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1994)
- Froberg, P., C. Kupfer, P. Stenger, U. Baumeister, P. Nuhn:** Lipoxygenase inhibitors. IV: synthesis and cyclization reactions of open-chain N^1 -aryl-substituted amidrazones. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 328, 505-516 (1995)
- Froberg, P., P. Nuhn:** New synthesis of benzotriazepines by non-convenient cyclization reaction of N^2, N^3 -diarylamidrazones. *Heterocycles* 3, 2549-2552 (1996)
- Froberg, P., U. Baumeister, D. Ströhl, H. Danz:** Study of tautomeric and isomeric behaviour of new 2-arylhydrazono-1,4-benzothiazines. *Heterocycles* 45, 1183-1190 (1997)
- Froberg, P., G. Drutkowski, C. Wagner:** Synthesis and structural assignment of oxanilo-*N*-arylhydrazono-yl chlorides. *Eur. J. Org. Chem.* 1654-1663 (2002) (1)
- Froberg, P., G. Drutkowski, C. Wagner, O. Lichtenberger:** Structure elucidation of *N*-aryl-2-chloro-3-oxobutanamides with respect to intra- and intermolecular hydrogen bonding. *J. Chem. Res. (S)* 13-14 (2002) (2)
- Froberg, P.:** unveröffentlichte Syntheseergebnisse

- Fruchtmann, R., K.H. Mohrs, A. Hatzelmann, S. Raddatz, B. Fugmann, B. Junge, H. Horstmann, R. Müller-Peddinghaus:** In vitro pharmacology of BAY X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis. *Agents Actions* 38, 188-195 (1993)
- Funk, C.D.:** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875 (2001)
- Galey, J.B., S. Bombard, C. Chopard, J.J. Gired, F. Lederer, D.C. Thang, N.H. Nam, D. Mansuy, J.C. Chottard:** Hexanal phenylhydrazone is a mechanism-based inactivator of soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 27, 1058-1066 (1988)
- Ghiglieribertz, C., C. Coquelet, A. Alazet, C. Bonne:** Dual inhibitors of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways – synthesis and activity of hydrazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 22, 147-152 (1987)
- Ghosh, J., C.E. Myers:** Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 235, 418-423 (1997)
- Gleason, M.M., C.J. Rojas, K.S. Learn, M.H. Perrone, G.E. Bilder:** Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase. *J. Am. Phys. Soc.* 1301-1307 (1995)
- Goetzl, E.J., S. An, W.L. Smith:** Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* 9, 1051-1058 (1995)
- Görlitzer, K., J. Fabian, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Furo[2,3-c]chinoline und Furo[3,4-c]chinoline – Synthese und Prüfung auf Lipoxygenase-Hemmung. *Pharmazie* 57, 159-168 (2002) (1)
- Görlitzer, K., J. Fabian, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyrrolo[2,3-c]chinoline and Pyrrolo[3,4-c]chinoline – Synthese und Prüfung auf Lipoxygenase-Hemmung. *Pharmazie* 57, 243-247 (2002) (2)
- Görlitzer, K., J. Fabian, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyridazino[3,4-c]chinoline und Pyridazino[4,5-c]chinoline – Synthese und Prüfung auf Lipoxygenase-Hemmung. *Pharmazie* 57, 362-371 (2002) (3)
- Görlitzer, K., J. Trittmacher, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyrano[3,4-c]chinoline aus 1-Desaza-1-oxa-nifedipin. eingereicht (2003) (1)
- Görlitzer, K., J. Trittmacher, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Isomere Phenanthridine aus 1,2-Dihydro-5-methyl-2'-nitro-[1,1'-biphenyl]-2,6-dicarbonsäureestern. eingereicht (2003) (2)
- Görlitzer, K., M. Bode, P. Froberg, G. Drutkowski:** Benzo[c][2,7]naphthyridine aus 2,6-Dinornifedipin und dessen 2,5-Dicarbon-säuredimethylester-Isomer. in Vorbereitung (2003) (3)
- Gresele, P., J. Arnout, M.C. Coene, H. Deckmyn, J. Vermeylen:** Leukotriene B₄ production by stimulated whole blood: comparative studies with isolated polymorphonuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137, 334-342 (1986)
- Griswold, D.E., J.L. Adams:** Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med. Res. Rev.* 16, 181-206 (1996)

- Gronert, K., S.M. Virk, C.A. Herman:** Endogenous sulfidopeptide leukotriene synthesis and 12-lipoxygenase activity in bullfrog (*Rana catesbeiana*) erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 311-319 (1995)
- Grünhardt, U.M.:** Synthese von 4- und 5-alkylsubstituierten Pyrazolen durch 1,3-dipolare Cycloaddition. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1993)
- Grushka, E., S. Lam, J. Chassin:** Fluorescence labeling of dicarboxylic acids for high performance liquid chromatographic separation. *Anal. Chem.* 50, 1398-1399 (1978)
- Gueddour, R.B., M. Matt, A. Nicolas, M. Donner, J.F. Stoltz:** Determination of thromboxane B₂ by normal-phase high-performance liquid chromatography after pre-column derivatisation with fluorescent reagents. *Anal. Lett.* 26, 429-443 (1993)
- Guido, D.M., R. McKenna, W.R. Mathews:** Quantitation of hydroperoxy-eicosatetraenoic acids and hydroxy-eicosatetraenoic acids as indicators of lipid peroxidation using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 209, 123-129 (1983)
- Haefelfinger, P.:** Limits of the internal standard technique in chromatography. *J. Chromatogr.* 218, 73-81 (1981)
- Hamasaki, Y., H.H. Tai:** Calcium stimulation of a novel 12-lipoxygenase from rat basophilic leukemia (RBL-1) cells. *Biochim. Biophys. Acta* 793, 393-398 (1984)
- Hammarberg, T., O. Radmark:** 5-Lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry* 38, 4441-4447 (1999)
- Harenberg, P.:** Beiträge zur Synthese von Amidrazonen als potentielle Lipoxygenasehemmer. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1987)
- Hatzelmann, A., R. Fruchtmann, K.H. Mohrs, S. Raddatz, M. Matzke, U. Pleiss, J. Keldenich, R. Müller-Peddinghaus:** Mode of action of the leukotriene synthesis (FLAP) inhibitor BAY X1005: implications for biological regulation of 5-lipoxygenase. *Agents Actions* 43, 64-68 (1994)
- Herrmann, T., D. Steinhilber, H.J. Roth:** Determination of leukotriene B₄ by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 416, 170-175 (1987)
- Herschman, H.R.:** Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 125-140 (1996)
- Heubach, G.:** Synthesis of new 2,5-dihydro-1,2,3,5-thiatriazole 1-oxides and 3,4-dihydro-2H-1,2,4,3-triazaphosphole 3-oxides. *Liebigs Ann. Chem.* 1376-1383 (1980)
- Hinz, B., K. Brune:** COX-1 and COX-2. Functions and pharmacological influence. *Pharmazie in unserer Zeit* 28, 21-29 (1999)
- Hinz, B., K. Brune:** Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J. Pharm. Exp. Ther.* 300, 367-375 (2002)
- Honn, K.V., D.G. Tang, X. Gao, I.A. Butovich, B. Liu, J. Timar, W. Haggmann:** 12-Lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 13, 365-396 (1994)
- Hudson, N., M. Baltsidis, S. Eceritt, C.J. Hawkey:** Enhanced gastric mucosal leukotriene B₄ synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 34, 742-747 (1993)

- Huisgen, R., E. Aufderhaar, G. Wallbillich:** 1,3-Dipolar cycloadditions. XVI. Formation of 1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazines from nitrilimines; 1,4-diphenyl-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazine and isomeric compounds. *Chem. Ber.* 98, 1476-1486 (1965)
- Huisgen, R., H. Knupfer, R. Sustmann, G. Wallbillich, V. Weberndörfer:** Zur Anlagerung des Diphenylnitrilimins an nichtkonjugierte Alkene und Alkine: Sterischer Ablauf, Orientierung und Substituenteneinfluß. *Chem. Ber.* 100, 1580-1592 (1967)
- Huwylar, J., J. Gut:** Single-step organic extraction of leukotrienes and related compounds and their simultaneous analysis by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 188, 374-382 (1990)
- I. G. Farben:** Patent, DE 463140; *Chem. Abstr.* 22, 4130a (1929)
- ICH:** Harmonised tripartite guideline, ICH-Sekretariat. *Text on validation of analytical procedures.* Genf (1995)
- Iwase, H., K. Sakurada, T. Takatori, M. Nagao, H. Niijima, Y. Matsuda, M. Kobayashi:** Calcium ions potentiate lipoxygenase activity of cytochrome C at the physiological pH. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 485-491 (1998)
- Jakobsson, P.J., S. Thoren, R. Morgenstern, B. Samuelsson:** Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7220-7225 (1999)
- John, H., W. Schlegel:** Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of the 11-hydroxythromboxane B₂ anomers equilibrium. *J. Chromatogr. B* 698, 9-15 (1997)
- Kadaba, P.K.:** 1,2,4-Triazolines. *Adv. Heterocycl. Chem.* 46, 169-285 (1989)
- Katori, M., M. Majima:** Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm. Res.* 49, 367-692 (2000)
- Keilhau, R.:** Struktur-Wirkungsbeziehungen α,α -capto-dativ substituierter Formylidenphenylhydrazine. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1991)
- Kelly, R.A., D.S. O'Hara, V. Kelley:** High-performance liquid chromatographic separation of femtomolar quantities of endogenous carboxylic acids, including arachidonic acid metabolites, as 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin derivatives. *J. Chromatogr.* 416, 247-254 (1987)
- Kerdesky, F.A.J., J.H. Holms, S.P. Schmidt, R.D. Dyer, G.W. Carter:** Eicosatetraen-hydroxamates: inhibitors of 5-lipoxygenase. *Tetrahedron Lett.* 26, 2143-2146 (1985)
- Kermasha, S., N. Dioum, B. Bisakowski:** Biocatalysis of lipoxygenase in selected organic solvent media. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 909-919 (2001)
- Kettrup, A., J. Abshagen:** Substituted 2-chloroacetoacetanilides and their metal chelates. *Z. Naturforsch. B Anorg. Chem. Org. Chem. Biochem. Biophys. Biol.* 25, 1386-1388 (1970)
- Kikawa, Y., A. Nakai, Y. Shigematsu, M. Sudo, Y. Suehiro, T. Hirao:** Rapid and simple assay method to study the content and the biosynthesis of peptide leukotrienes in whole blood. *J. Chromatogr.* 491, 193-199 (1989)

- Kim, H.G., Y.N. Huh, K.S. Park:** Simultaneous HPLC analysis of arachidonic acid metabolites in biological samples with simple solid phase extraction. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2, 779-786 (1998)
- Kirchner, T., D.C. Argentieri, A.G. Barbone, M. Singer, M. Steber, J. Ansell, S.A. Beers, M.P. Wachter, W. Wu, E. Malloy, A. Stewart, D.M. Ritchie:** Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/ 5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1094-1101 (1997)
- Kiss, L., E. Bieniek, N. Weissmann, H. Schütte, U. Sibelius, A. Günther, J. Bier, K. Mayer, K. Henneking, W. Padberg, H. Grimm, W. Seeger, F. Grimminger:** Simultaneous analysis of 4- and 5-series lipoxygenase and cytochrom P450 products from different biological sources by reversed-phase high-performance liquid chromatographic technique. *Anal. Biochem.* 261, 16-28 (1998)
- Kiyomiya, K., K. Yamaki, N. Nimura, T. Kinoshita, S. Oh-ishi:** Phorbol myristate acetate-stimulated release of cyclooxygenase products in rat pleural cells: derivatization of prostaglandins with 9-anthryldiazomethane for fluorimetric determination by high performance liquid chromatography. *Prostaglandins* 31, 71-82 (1986)
- Klietsch, O.:** Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2003)
- Kohyama, N., T. Nagata, S. Fujimoto, K. Sekiya:** Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 347-350 (1997)
- Kolasa, T., C.D.W. Brooks, K.E. Rodrigues, J.B. Summers, J.F. Dellaria, K.I. Hulkower, J. Bouska, R.L. Bell, G.W. Carter:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as scaffolds for the design of 5-lipoxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.* 40, 819-824 (1997)
- Krieg, P., A. Kinzig, M. Rees-Löschke, S. Vogel, B. Vanlandingham, M. Stephan, W.D. Lehmann, F. Marks, G. Fürstenberger:** 12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development. *Mol. Carcinog.* 14, 118-129 (1995)
- Kroegel, C., V. Herzog, B. Knöchel, P. Julius, W. Luftmann, J.C. Virchow, jr:** 5-Lipoxygenase-Inhibitoren und Leukotrien-Rezeptorantagonisten. *Arzneimitteltherapie* 14, 299-309 (1996)
- Kromidas, S.:** *Validierung in der Analytik.* Wiley-VCH, Weinheim (1999)
- Ku, E.C., A. Raychaudhuri, G. Ghai, E.F. Kimble, W.H. Lee, C. Colombo, R. Dotson, T.D. Oglesby, J.W.F. Wasley:** Characterization of CGS 8515 as a selective 5-lipoxygenase inhibitor using in vitro and in vivo models. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 332-342 (1988)
- Kuhn, D.G., J.A. Furch, D.A. Hunt, M. Asselin, S.P. Baffic, R.E. Diehl, T.P. Miller, Y.L. Palmer, M.F. Treacy, S.H. Trotto:** Cycloalkyl-substituted amidrazones: a novel class of insect control agents. *ACS Symp. Ser.* 686, 185-193 (1998)
- Kühn, H., J. Belkner, R. Wiesner, A.R. Brash:** Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 265, 18351-18361 (1990)
- Kühn, H.:** Inhibitors of 12/ 15-lipoxygenase are potential antiatherosclerotic drugs. *Curr. Opin. Cardiovasc. Pulm. Renal Invest. Drugs* 1, 214-224 (1999)

- Kuo, J.M., A. Hwang, D.B. Yeh:** Purification, substrate specificity, and products of a Ca^{2+} -stimulating lipoxygenase from sea algae (*Ulva lactuca*). *J. Agric. Food Chem.* 45, 2005-2060 (1997)
- Kupfer, C.:** Beiträge zur Untersuchung des Arachidonsäure-Stoffwechsels in menschlichen Blutzellen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1996)
- Kürschner, U., A. Simon:** Testung potentieller COX-Hemmer an ausgewählten in-vitro/ in-vivo Modellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1998)
- Lam, S., E. Grushka:** Labeling of fatty acids with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin via crown ether catalyst for fluorimetric detection in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 158, 207-214 (1978)
- Lau, C.K., P.C. Belanger, J. Scheigetz, C. Dufresne, H.W.R. Williams, A.L. Maycock, Y. Guindon, T. Bach, A.L. Dallob, D. Denis, A.W. Ford-Hutchinson, P.H. Gale, S.L. Hoppole, L.G. Letts, S. Luell, C.S. McFarlane, E. MacIntyre, R. Meurer, D.K. Miller, H. Piechuta, D. Riendeau, J. Rokach, C. Rouzer:** Synthesis and structure-activity relationships of a novel class of 5-lipoxygenase inhibitors. 2-(phenylmethyl)-4-hydroxy-3,5-dialkylbenzofurans: the development of L-656,224. *J. Med. Chem.* 32, 1190-1203 (1989)
- Laufer, S., K. Neher, B. Bayer, J. Homann, E. Reutter, S. Tries:** In-vitro test system for the evaluation of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 5, 166-169 (1995)
- Laufer, S., P. Zechmeister, T. Klein:** Development of an in-vitro test system for the evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflamm. Res.* 48, 133-138 (1999)
- Le G., C. Ellis, D.K. Sorenson, L.E. Buhrley:** Mechanisms and interactions in testicular steroidogenesis and prostaglandin synthesis. *J. Steroid Biochem.* 6, 1081-1090 (1975)
- Legarde, M., N. Gualde, M. Rigaud:** Metabolic interactions between eicosanoids in blood and vascular cells. *Biochem. J.* 257, 313-320 (1989)
- Lewis, G.P., P.J. Piper, C. Vigo:** Mechanism of action of antiinflammatory steroids on membrane fluidity and phospholipase activity. *Br. J. Pharmacol.* 66, 453-463 (1979)
- Lewis, R.A., K.F. Austen, R.J. Soberman:** Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *New Engl. J. Med.* 323, 645-655 (1990)
- Li, Y., P. Mahler, D. Schubert:** A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 19, 453-463 (1997)
- Lin, J., Y. Kim, C. Less, F. Ondrey, S.K. Juhn:** Effect of lipoxygenase inhibition on mucous glycoprotein secretion from chinchilla middle ear epithelial cells in vitro. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105, 916-921 (1996)
- Lindberg, A., S. Tornhamre, S. Mugnai, J.A. Lindgren:** Ionophore A23187-induced leukotriene biosynthesis in equine granulocytes – neutrophils, but not eosinophils require exogenous arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 247-255 (1998)
- Luderer, J.R., D.L. Riley, L.M. Demers:** Rapid extraction of arachidonic acid metabolites utilizing octadecyl reversed-phase columns. *J. Chromatogr.* 273, 402-409 (1983)

- Maccarrone, M., M.V. Catani, A. Finazzi-Agro, G. Melino:** Involvement of 5-lipoxygenase in programmed cell death of cancer cells. *Cell death diff.* 4, 396-402 (1997)
- Malaisse, W.J., G. Somers, I. Valverde, E. Couturier:** Organic calcium-antagonists and calcium-ionophores. *Arzneim. Forsch.* 31, 628-633 (1981)
- Mandel, S.:** Untersuchungen zur simultanen Erfassung von Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-metaboliten mittels HPLC. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999)
- Marnett, L.J., S.W. Rowlinson, D.G. Goodwin, A.S. Kalgutkar, C.A. Lanzo:** Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* 274, 22903-22906 (1999)
- Mathews, W.R., J. Rockach, R.C. Murphy:** Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 118, 96-101 (1981)
- Matsuo, M., Y. Hamasaki, S. Miyazaki:** High-performance liquid chromatographic assay of arachidonic acid metabolites from cultured rat glial cells. *Brain Res. Prot.* 1, 124-136 (1997)
- Mayatepek, E., G.F. Hoffmann:** Leukotrienes: biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Ped. Res.* 37, 1-9 (1995)
- McDonald, P.P., S.R. McColl, P.H. Naccache, P. Borgeat:** Studies on the activation of human neutrophil 5-lipoxygenase induced by natural agonists and Ca²⁺ ionophore A23187. *Biochem. J.* 280, 379-385 (1991)
- McGiff, J.C.:** Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 339-369 (1991)
- McGuffin, V.L., R.N. Zare:** Laser fluorescence detection in microcolumn liquid chromatography: application to derivatized carboxylic acids. *Appl. Spectr.* 39, 847-853 (1985)
- McLean, A.M., D.A. Ruggirello, C. Banfield, M.A. Gonzalez, M. Bialer:** Application of a variance-stabilizing transformation approach to linear-regression of calibration lines. *J. Pharm. Sci.* 79, 1005-1008 (1990)
- Metz, S.A., M.E. Hall, T.W. Harper, R.C. Murphy:** Rapid extraction of leukotrienes from biologic fluids and quantitation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 233, 193-201 (1982)
- Mitchell, J.A., T.D. Warner:** Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1121-1132 (1999)
- Mohamed, E. A., M.M. Ismail, Y. Gabr, H.A. Farrag:** Synthesis and biological activity of some 3-heterocyclyl-4-hydroxy-6-methyl-2 (1*H*)-quinolones. *Indian J. Chem. B* 34B, 21-26 (1995)
- Morgenstern, O.:** Chemistry and biological activity of 1,3,4-benzotriazepines, part 3. *Pharmazie* 55, 871-891 (2000)
- Morteau, O.:** Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 48, 473-480 (2000)
- Mukherjee, P.S., H.T. Karnes:** Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: a review. *Biomed. Chromatogr.* 10, 193-204 (1996)

- Müller, K.:** 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 327, 3-19 (1994)
- Müller, K., I. Gawlik:** Novel 10-substituted antipsoriatic anthrones as inhibitors of epidermal 12-lipoxygenase and lipid peroxidation in membranes. *Biochem. Pharmacol.* 50, 2077-2083 (1995)
- Müller, M.J.:** Der Leukotriensignalweg – ein vielversprechender Ansatzpunkt für Inhibitoren in der Therapie entzündlicher Erkrankungen. *Pharmazie in unserer Zeit* 24, 264-272 (1995)
- Murphy, R.C.:** Free-radical-induced oxidation of arachidonoyl plasmalogen phospholipids: anti-oxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids. *Chem. Res. Tox.* 14, 463-472 (2001)
- Musser, J.H., A.F. Kreft:** 5-Lipoxygenase: properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridged)aryl class of inhibitors. *J. Med. Chem.* 35, 2501-2524 (1992)
- Naccache, P.H., R.I. Sha'afi, P. Borgeat, E.J. Goetzi:** Mono- and dihydroxyeicosatetraenoic acids alter calcium homeostasis in rabbit neutrophils. *J. Clin. Invest.* 67, 1584-1587 (1981)
- Narumiya, S.:** Prostanoid receptors: structure, function, and distribution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 744, 126-138 (1994)
- Neilson, D.C., R. Roger, J.W.M. Heathie, L.R. Newlands:** The chemistry of amidrazones. *Chem. Rev.* 151-170 (1970)
- Neugebauer, F.A., H. Fischer:** 2,5-Dihydro-1H-1,2,4-triazol-2-yl radicals: syntheses and properties. *Tetrahedron* 51, 12883-12898 (1995)
- Nie, D., K. Tang, C. Diglio, K.V. Honn:** Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 95, 2304-2311 (2000)
- Nie, D., M. Che, D. Grignon, K. Tang, K.V. Honn:** Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 20, 195-206 (2001)
- Nie, D., K.V. Honn:** Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 799-807 (2002)
- Nieuwenhuizen, W.F., A. van der Kerk-van Hoof, J.H. van Lenthe, R.C. van Schaik, K. Versluis, G.A. Veldnik, J.F.G. Vliegthart:** Lipoxygenase is irreversibly inactivated by the hydroperoxides from the enynic analogues of linoleic acid. *Biochemistry* 36, 4480-4488 (1997)
- Nithipatikom, K., A.J. Grall, B.B. Holmes, D.R. Harder, J.R. Falck, W.B. Campbell:** Liquid chromatographic-electrospray ionization-mass spectrometric analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Anal. Biochem.* 298, 327-336 (2001)
- Nuhn, P., A. Büge, P. Harenberg, H. Lettau, K. Moschner, M. Rauchmaul, R. Schneider:** Synthesis of lipoxygenase inhibitors. Part 1. Synthesis of open amidrazones. *Pharmazie* 48, 340-342 (1993)
- Osborne, D.J., B.J. Peters, C.J. Meade:** The separation of leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acid metabolites of arachidonic acid by high performance liquid chromatography (HPLC). *Prostaglandins* 26, 817-832 (1983)

- Panossian, A.G., E. Gabrielian, V. Manvelian, K. Jurcic, H. Wagner:** Immunosuppressive effects of hypericin on stimulated human leukocytes: inhibition of the arachidonic acid release, leukotriene B₄ and interleukin-1 alpha production, and activation of nitric oxide formation. *Phytomed.* 3, 19-28 (1996)
- Pasqualini, M.E., C.E. Mohn, J.P. Petiti, P. Manzo, A.R. Eynard:** COX and LOX eicosanoids modulate platelet activation and procoagulation induced by two murine cancer cells. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 63, 377-383 (2000)
- Patrignani, P., R. Canete-Soler:** Biosynthesis, characterization and inhibition of leukotriene B₄ in human whole blood. *Prostaglandins* 33, 539-551 (1987)
- Percival, M.D., D. Denis, D. Riendeau, M.J. Gresser:** Investigation of the mechanism of nonturnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase – inactivation by H₂O₂ and inhibition by metal ions. *Eur. J. Biochem.* 210, 109-117 (1992)
- Phillips, R.R.:** The Japp-Klingemann-Reaction. In *Organic Reactions* 10, 143-178, J. Wiley & Sons, New York (1959)
- Pinson, V.V., V.A. Khustalev, K.N. Zelenin, Z.M. Matvjeva:** Synthesis and structure of 1-methyl-2,3-dihydro-1,2,4-triazolium salts and their free bases. *Khim. Geterosikl. Soed.* 10, 1415-1421 (1984)
- Pöppel, W.:** Beiträge zur Darstellung, Reaktivität und spektroskopischen Charakterisierung potentiell lipoxygenase-inhibierender Amidrazone. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1994)
- Prigge, S.T., J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel:** Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modelling of human lipoxygenases. *Proteins Structure Funct. Genetics* 24, 275-291 (1996)
- Prigge, S.T., J.C. Boyington, M. Faig, K.S. Doctor, B.J. Gaffney, L.M. Amzel:** Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 79, 629-636 (1997)
- Provost, P., Y. Merhi:** BW 755c, a dual lipoxygenase/ cyclooxygenase inhibitor, reduces mural platelet and neutrophil deposition and vasoconstriction after angioplasty injury in pigs. *J. Pharm. Exp. Ther.* 277, 17-21 (1996)
- Radmark, O.P.:** The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, S11-S15 (2000)
- Randall, R.W., K.E. Eakins, G.A. Higgs, J.A. Salmon, J.E. Tateson:** Inhibition of arachidonic acid cyclo-oxygenase and lipoxygenase activities of leukocytes by indomethacin and compound BW 755C. *Agents Actions* 10, 553-555 (1980)
- Ranft, D.:** N¹-Substituierte Hetarylcarbonsäureamidrazone als lipoxygenaseinhibierende und antimycobakterielle Verbindungen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999)
- Ranft, D., G. Lehwark-Yvetot, K.J. Schaper, A. Büge:** N¹-hetarylcarbonyl substituted amidrazone and 3,5-disubstituted 1,2,4-triazole as potential antimycobacterial agents. *Pharmazie* 56, 266 (2001)
- Reddy, K.V., T. Hammarberg, O. Radmark:** Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry* 39, 1840-1848 (2000)

- Reimlinger, H.:** In *Nomenklatur Organisch-Chemischer Verbindungen*. Walter de Gruyter & Co. Berlin 447 (1997)
- Restrepo, F., H.E. Snyder, G.L. Zimmerman:** Calcium activation of soybean lipoxygenase. *J. Food Sci.* 38, 779-782 (1973)
- Riley, C.M.:** *Development and validation of analytical methods*. Oxford, Pergamon (1996)
- Rivett, D.E., J. Rosevear, J.F.K. Wilshire:** The preparation and spectroscopic properties of some di- and tri-substituted 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and related 2-pyrazolines. *Aust. J. Chem.* 36, 1649-1658 (1983)
- Rouzer, C.A., B. Samuelsson:** On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6040-6044 (1985)
- Rouzer, C.A., B. Samuelsson:** Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7393-7397 (1987)
- Rouzer, C.A., E. Rands, S. Kargman, R.E. Jones, R.B. Register, R.A.F. Dixon:** Characterization of cloned human leukocyte 5-lipoxygenase expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 263, 10135-10140 (1988) (1)
- Rouzer, C.A., S. Kargman:** Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 263, 10980-10988 (1988) (2)
- Ruzicka, T., M.P. Printz:** Arachidonic acid metabolism in skin: a review. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 100, 121-160 (1984)
- Saareks, V., I. Mucha, E. Sievi, H. Vapaatalo, A. Riutta:** Nicotine stereoisomers and cotinine stimulate prostaglandin E₂ but inhibit thromboxane B₂ and leukotriene E₄ synthesis in whole blood. *Eur. J. Pharmacol.* 353, 87-92 (1998)
- Safayhi, H., T. Mack, J. Sabieraj, M.I. Anazodo, L.R. Subramanian, H.P.T. Ammon:** Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1143-1146 (1992)
- Safayhi, H., E.R. Sailer, H.P.T. Ammon:** Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid. *Mol. Pharm.* 47, 1212-1216 (1995)
- Sajiki, J., H. Kakimi:** Identification of eicosanoids in the red algae, *Gracilaria asiatica*, using high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 795, 227-237 (1998)
- Salari, H., P. Braquet, P. Naccache, P. Borgeat:** Characterization of effect of *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin on leukotriene synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 9, 127-138 (1985)
- Samuelsson, B.:** Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Zeitschr. Rheumatol.* 50, 3-6 (1991)
- Schaible, H.G., B.D. Grubb:** Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55, 5-54 (1993)
- Schewe, T., H. Kühn, S.M. Rapoport:** Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs. *Prostaglandins, Leukotrienes Med.* 23, 55-160 (1986)

- Schewe, T.:** 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol. Chem.* 383, 365-374 (2002)
- Schröder, M.:** The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP interleukin-8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular. *J. Exp. Med.* 170, 847-863 (1989)
- Schulz, M.:** Montelukast, Leukotrien-Antagonist gegen Asthma. *Pharmazeutische Ztg.* 143 (1998)
- Schulze, I.:** Synthese von Inhibitoren der Lipoxygenase und ESR-spektroskopische Untersuchung eines stabilen Radikals mit Amidrazonstruktur. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
- Seibert, K., Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, P. Isakson:** Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 400A, 167-170 (1997)
- Setty, B.N.Y., J.E. Graeber, M.J. Stuart:** The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cell may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *J. Biol. Chem.* 262, 17613-17622 (1987)
- Shak, S., N.O. Reich, I.M. Goldstein, P.R. Ortiz de Montellano:** Leukotriene B₄ ω-hydroxylase in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 13023-13028 (1985)
- Shawali, A.S., A. Osman:** Synthesis and reactions of phenylcarbamoylarylhydrazidic chlorides. *Tetrahedron* 27, 2517-2528 (1971)
- Shawali, A.S., N.M. Elwan, A.M. Awad:** Kinetics and mechanism of dehydrochlorination of aryl 2-oxo-2-phenylaminoethanehydrazonoyl chlorides and their mass spectra. *J. Chem. Res. (S)* 8, 268-269 (1997)
- Sheran, C.N., J.M. Drazen:** Antiinflammatory potential of lipoxygenase-derived eicosanoids: a molecular switch at 5 and 15 positions? *J. Clin. Invest.* 99, 1147-1148 (1997)
- Silverman, E.S., J.M. Drazen:** The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc. Associat. Am. Phys.* 111, 525-536 (1999)
- Sirois, P., P. Borgeat, M. Lauziere, L. Dube, P. Rubin, J. Kesterson:** Effect of zileuton (A-64077) on the 5-lipoxygenase activity of human whole blood ex vivo. *Agents Actions* 34, 117-120 (1991)
- Skorey, K.I., M.J. Gresser:** Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidyl choline vesicle concentrations. *Biochemistry* 37, 8027-8034 (1998)
- Steinhilber, D., T. Herrmann, H.J. Roth:** Separation of lipoxins and leukotrienes from human granulocytes by high-performance liquid chromatography with a radial-pak cartridge after extraction with an octadecyl reversed-phase column. *J. Chromatogr.* 493, 361-366 (1989)
- Steinhilber, D.:** 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr. Med. Chem.* 6, 71-85 (1999)
- Stetter, H., R. Engel, H. Rauhut:** A new method for the preparation of long-chain carboxylic acids. XVI. The Japp-Klingemann reaction of monoalkylated dihydroresorcinols. *Chem. Ber.* 92, 1184-1188 (1959)
- Strasser, M., P. Cooper, B. Dewald, T. Payne:** Design and synthesis of 5-lipoxygenase inhibitors. *Helv. Chim. Acta.* 71, 1156-1169 (1988)

- Summers, J.B., B.P. Gunn, J.G. Martin, H. Mazdiyasni, A.M. Goetze, P.R. Young, J.B. Bouska, R.D. Dyer, D.W. Brooks, G.W. Carter:** In vivo characterization of hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 30, 2121-2126 (1987) (1)
- Summers, J.B., H. Mazdiyasni, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, R.D. Dyer, G.W. Carter:** Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 30, 574-580 (1987) (2)
- Summers, J.B., K.H. Kim, H. Mazdiyasni, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, A.O. Stewart, R.D. Dyer, G.W. Carter:** Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: quantitative structure activity relationship. *J. Med. Chem.* 33, 992-998 (1990)
- Surette, M.E., A. Odeimat, R. Palmantier, S. Marleau, P.E. Poubelle, P. Borgeat :** Reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of arachidonic acid metabolites in plasma after stimulation of whole blood ex vivo. *Anal. Biochem.* 216, 392-400 (1994)
- Suzuki, H., D. Miyauchi, S. Yamamoto:** A selective inhibitor of arachidonate 5-lipoxygenase scavenging peroxide activator. *Biochem. Pharmacol.* 54, 529-532 (1997)
- Sweeney, F.J., J.D. Eskra, M.J. Ernest, T.J. Carty:** Spectrophotometric monitoring of lipoxygenase and cyclooxygenase pathway activity using ionophore stimulated whole blood. *Agents Actions* 21, 393-396 (1987) (1)
- Sweeney, F.J., J.D. Eskra, T.J. Carty:** Development of a system for evaluating 5-lipoxygenase inhibitors using human whole blood. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 28, 73-93 (1987) (2)
- Tatulian, S.A., J. Steczko, W. Minor:** Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 37, 15481-15490 (1998)
- Terragno, A., R. Rydzik, N.A. Terragno:** High performance liquid chromatography and UV detection for the separation and quantitation of prostaglandins. *Prostaglandins* 21, 101-112 (1981)
- Tibes, U., A. Vondran, E. Rodewald, W.G. Friebe, W. Schäfer, W. Scheuer:** Inhibition of allergic and non-allergic inflammation by phospholipase A₂ inhibitors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107, 432-434 (1995)
- Toyo'oka, T.:** Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *J. Chromatogr. B* 671, 91-112 (1995)
- Tries, S., W. Neupert, S. Laufer:** The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm. Res.* 51, 135-143 (2002)
- Tsuchiya, H., T. Hayashi, H. Naruse, N. Takagi:** High-performance liquid chromatography of carboxylic acids using 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin as fluorescence reagent. *J. Chromatogr.* 234, 121-130 (1982)
- Turk, J., S.J. Weiss, J.E. Davis, P. Needleman:** Fluorescent derivatives of prostaglandins and thromboxanes for liquid chromatography. *Prostaglandins* 16, 291-309 (1978)
- van der Horst, F.A.L.:** Micellar catalysis for the derivatization of carboxylic acids in physiological matrices. *Trends Anal. Chem.* 8, 268-273 (1989)
- van Leyen, K., R.M. Duvoisin, H. Engelhardt, M. Wiedmann:** A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395, 392-395 (1998)

- Vanderhoeck, J.Y.:** Role of the 15-lipoxygenase in the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 524, 240-251 (1988)
- Vanderhoeck, J.Y., R.W. Bryant, J.M. Bailey:** Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 255, 10064-10066 (1980)
- Vane, J.R.:** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 231, 232-235 (1971)
- Vane, J.R., R.M. Botting:** Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm. Res.* 47 (Supplement 2) S78-S87 (1998)
- Verhagen, J., G.A. Wassink, P.L.B. Bruynzeel:** Rapid, simple and efficient extraction of arachidonic acid metabolites, including the sulphidopeptide leukotrienes LTC₄ and LTD₄, using octadecyl reversed-phase extraction columns. *J. Chromatogr.* 378, 208-214 (1986)
- Vila, L., J. Sola:** Activation of 5-lipoxygenase in whole polymorphonuclear leukocytes by arachidonic acid: evidence of cytosolic active enzyme. In *Eicosanoids and other Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury 2*. Ed. K.V. Honn et al. Plenum Press, New York (1997)
- Wagner, H., M. Wierer, B. Fessler:** Effects of garlic constituents on arachidonate metabolism. *Planta Med.* 53, 305-306 (1987)
- Wallach, D.P., V.R. Brown:** A novel preparation of human platelet lipoxygenase: characteristics and inhibition by a variety of phenyl hydrazones and comparisons with other lipoxygenases. *Biochim. Biophys. Acta* 663, 361-372 (1980)
- Walstra, P., J. Verhagen, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart:** Leukotriene formation by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 499-503 (1984)
- Watson, K.M., D.G. Neilson:** in *The Chemistry of Amidines and Imidates* (Ed. S. Patai), J. Wiley, London, 491-545 (1975)
- Watson, K.M., D.G. Neilson:** in *The Chemistry of Amidines and Imidates* Vol. 2 (Ed. S. Patai), J. Wiley, London (1991)
- Wentzell, B., R.M. Epand:** Stimulation of the release of prostaglandins from polymorphonuclear leukocytes by the calcium ionophore A23187. *FEBS Lett.* 86, 255-258 (1978)
- Werz, O., D. Szellas, M. Henseler, D. Steinhilber:** Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol. Pharmacol.* 54, 445-451 (1998)
- Willoughby, D.A., A.R. Moore, P.R. Colville-Nash:** COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355, 646-648 (2000)
- Wobst, I.:** Diplomarbeit (2003)
- Wolf, J.H., J. Korf:** Improved automated precolumn derivatization reaction of fatty acids with bromomethylmethoxycoumarin as label. *J. Chromatogr.* 502, 423-430 (1990)
- Wolf, J.H., J. Korf:** 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin and analogues as derivatization agents for high-performance liquid chromatography determination: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 99-107 (1992)

- Wong, B., Y. Chun, W.P. Wang, C.H. Cho, X.M. Fan, M.C.M. Lin, H.F. Kung, S.K. Lam:** 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 22, 1349-1354 (2002)
- Yamaguchi, M., O. Takehiro, J. Ishida, M. Nakamura:** High-performance liquid chromatography of arachidonic acid metabolites and its application to the determination of leukotriene B₄ in stimulated leukocytes. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2846-2848 (1989)
- Yamamoto, S.:** Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131 (1992)
- Yasaka, Y., M. Tanaka:** Labeling of free carboxyl groups. *J. Chromatogr. B* 659, 139-155 (1994)
- Young, J.M., S. Panah, C. Satchawatcharaphong, P.S. Cheung:** Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B₂ production. *Inflamm. Res.* 45, 246-253 (1996)
- Zelenin, K.N., V.A. Khrustalev, V.P. Sergutina:** Structure of products of the condensation of amidrazones with monocarbonyl compounds. *Zh. Org. Khim.* 16, 942-950 (1980)
- Zelenin, K.N., O.V. Solod, V.A. Khrustalev:** Amidrazones in the synthesis of heterocycles. *Khim. Geterotsikl. Soed.* 7, 867-887 (1989)
- Zmijewski, M. J., Wong, R., Paschal, J. W., Dorman, D. E.:** The biosynthesis of antibiotic A23187. *Tetrahedron* 39, 1255-1264 (1983)

Anhang

I NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen

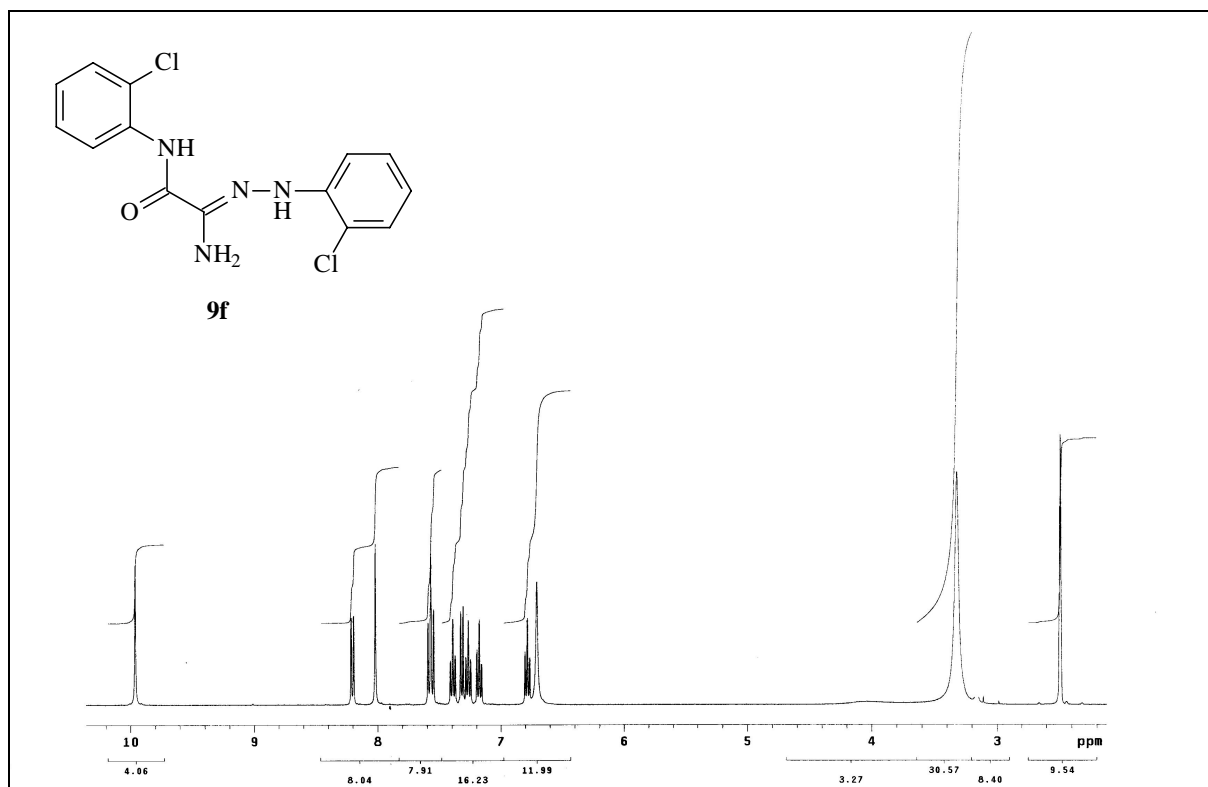


Abbildung 28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **9f** in DMSO-d_6

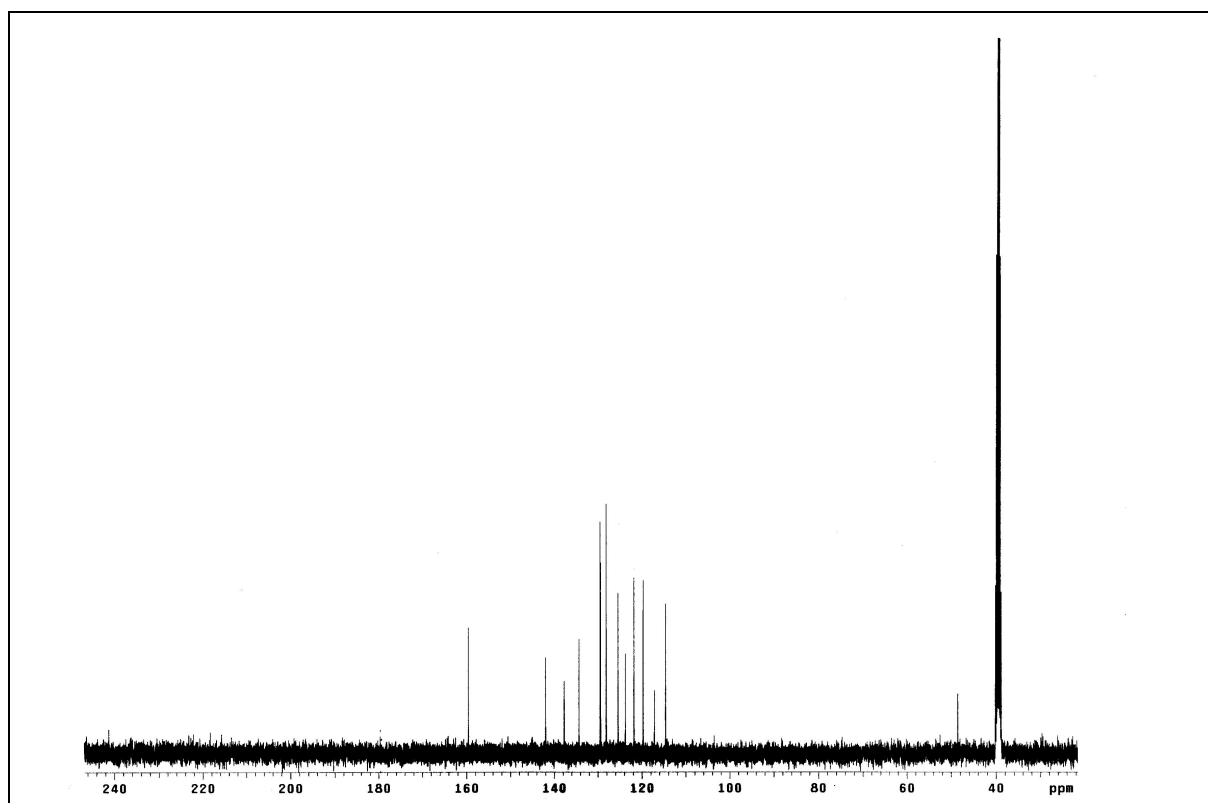
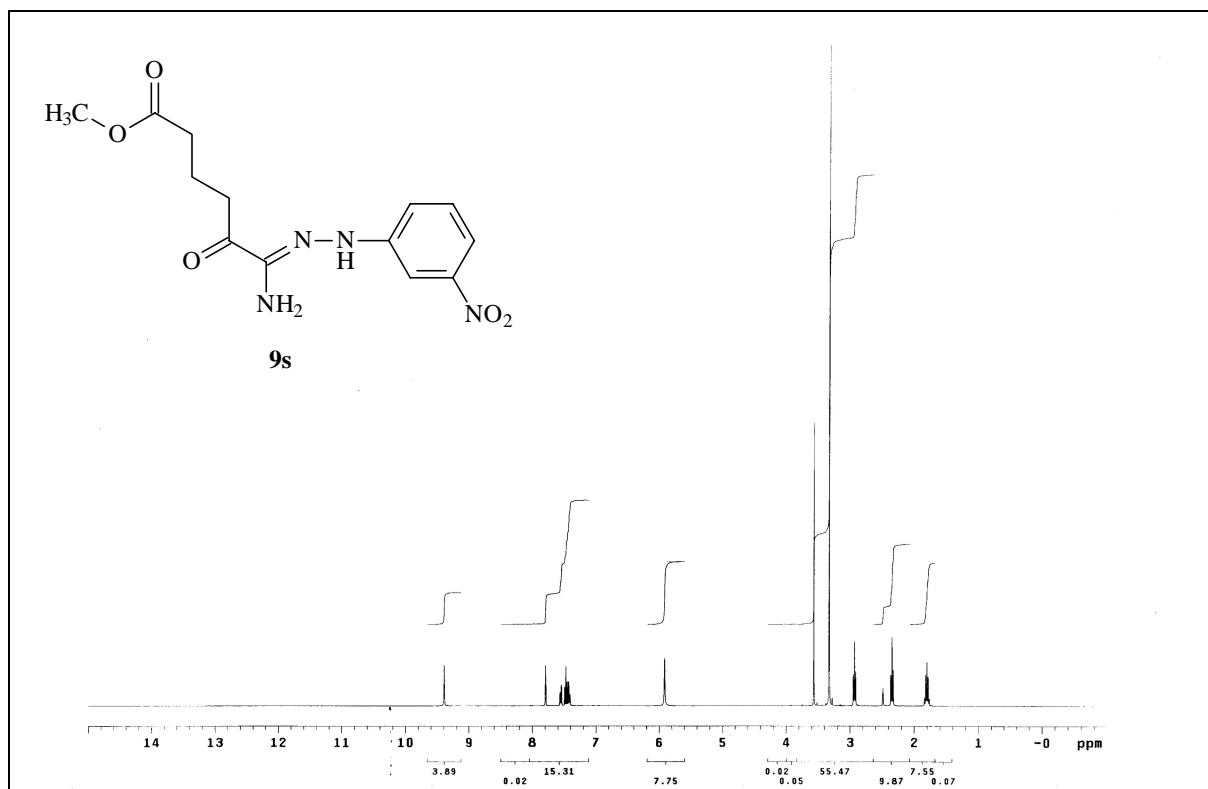
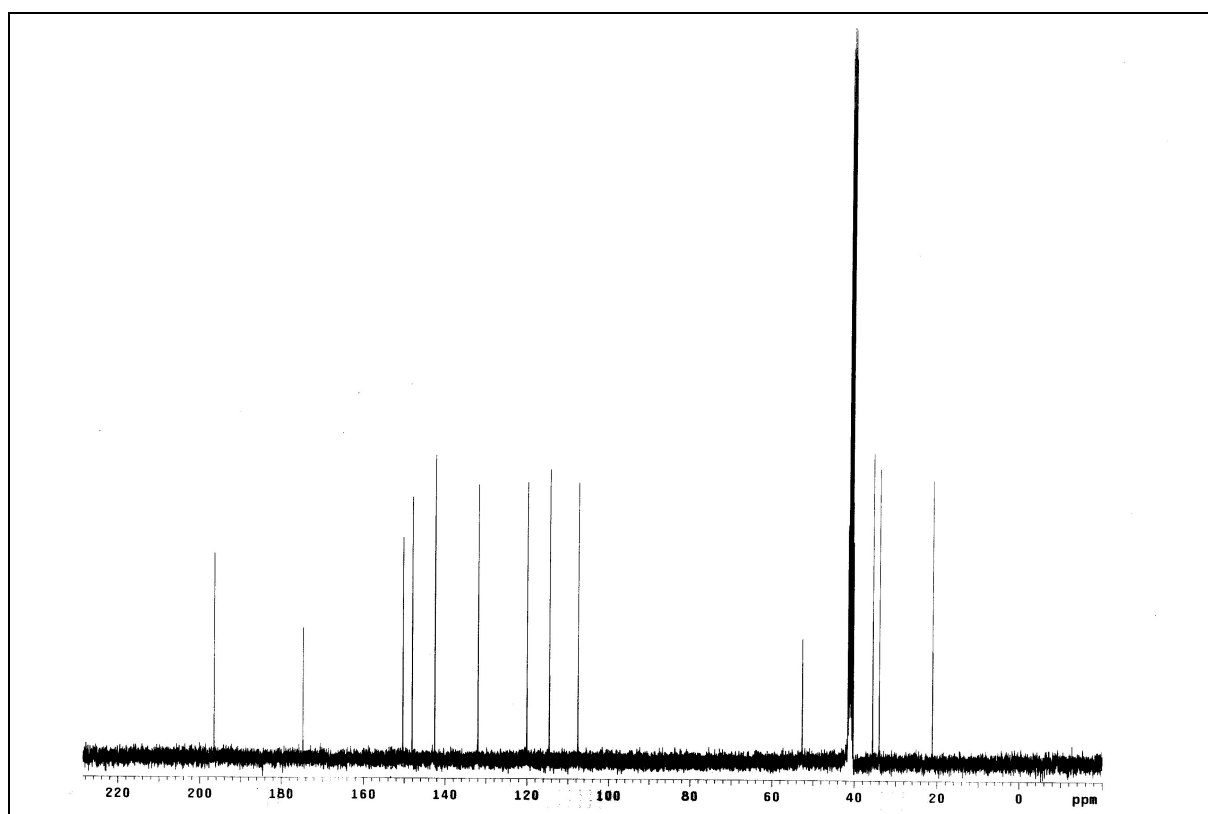
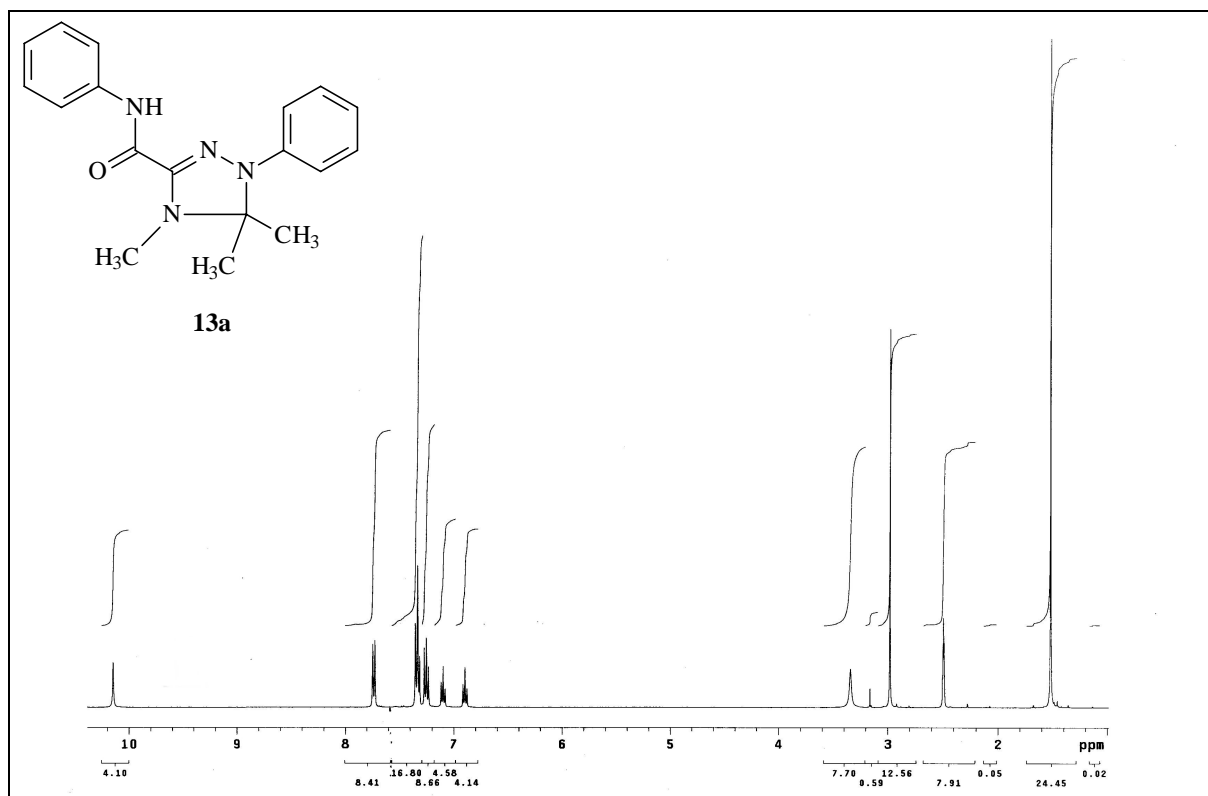
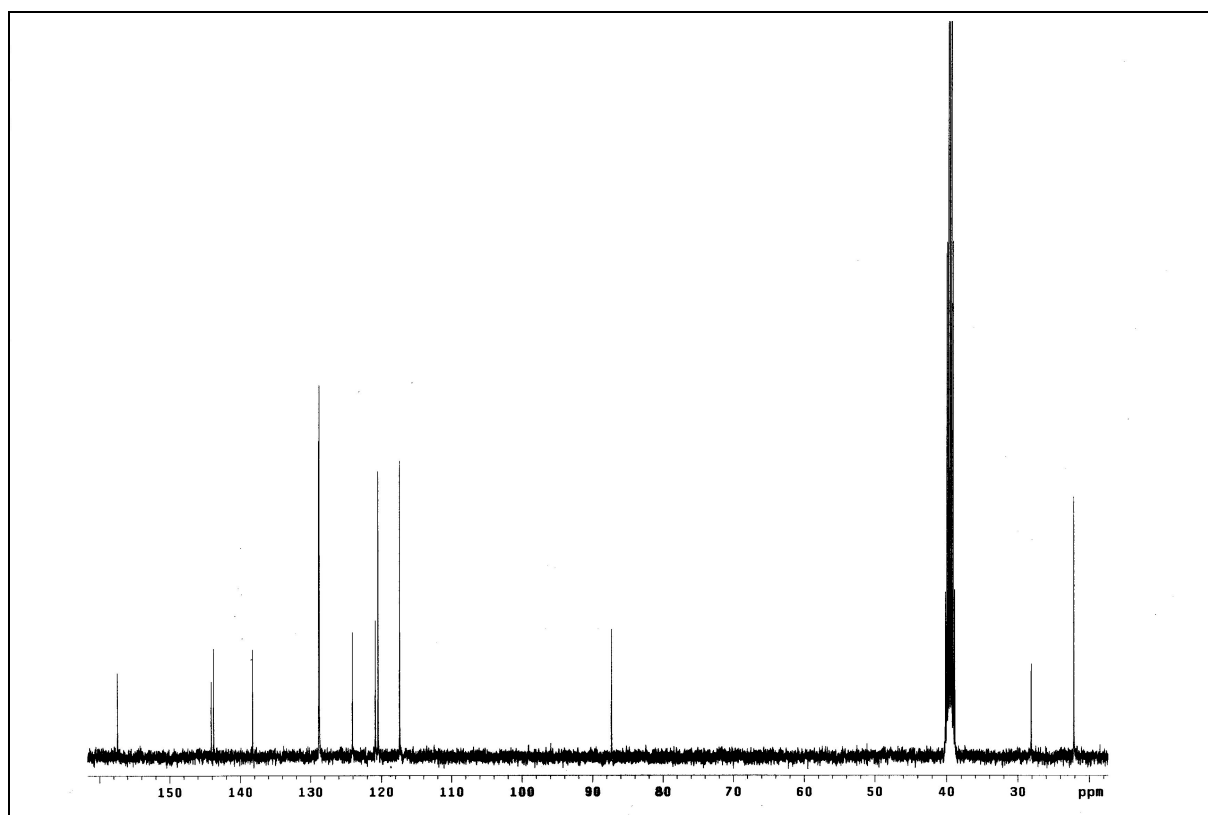
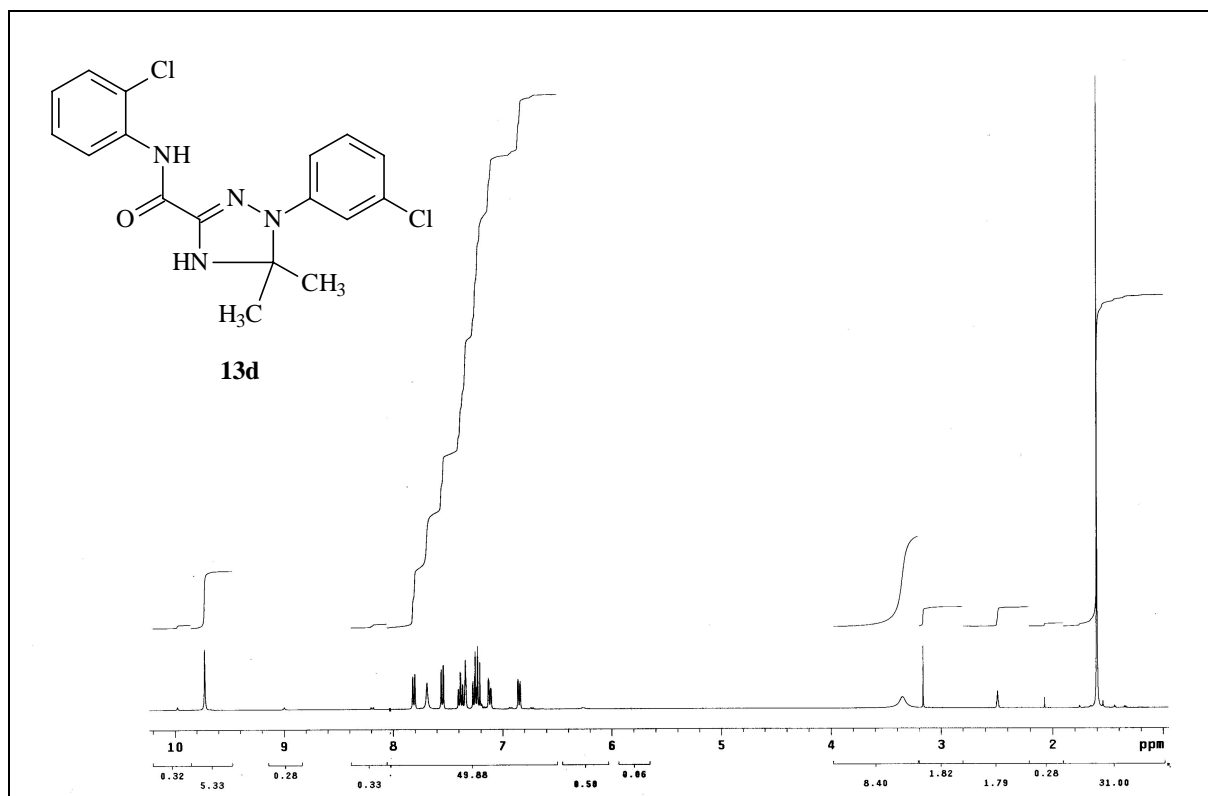
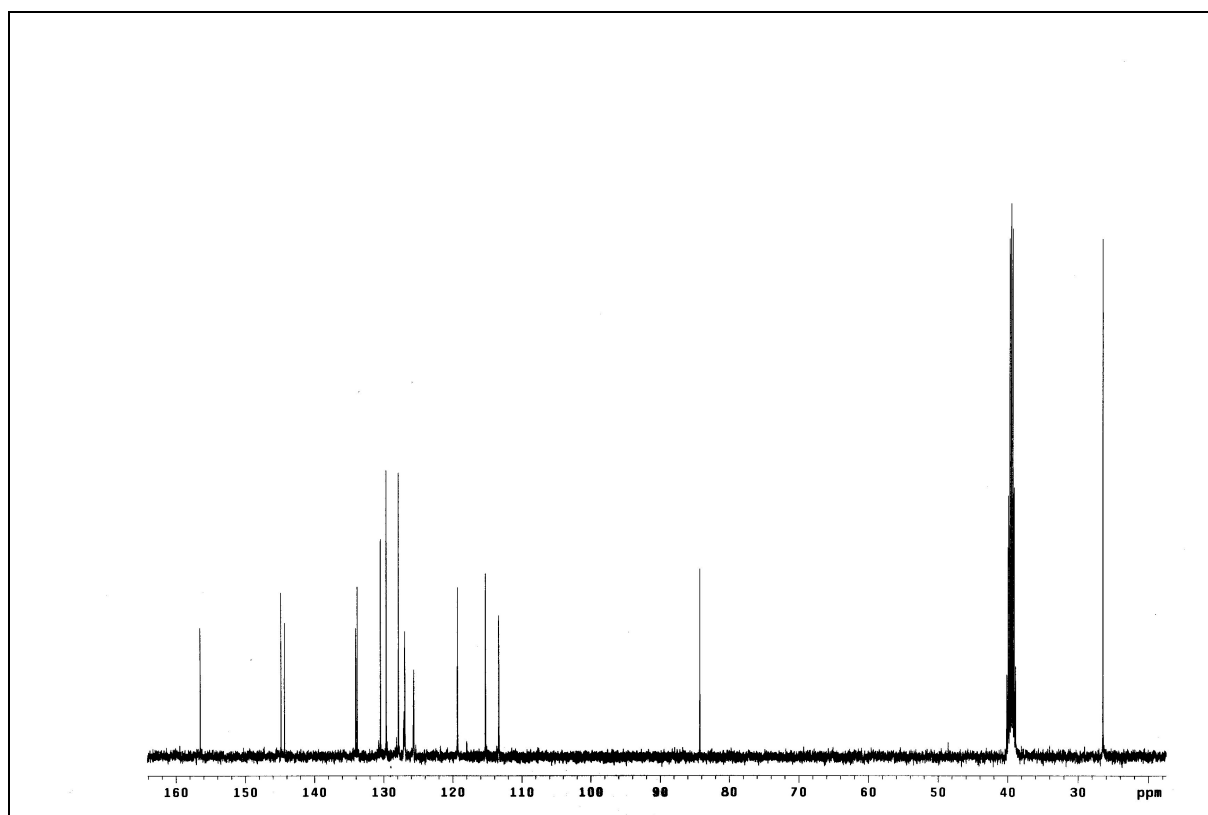
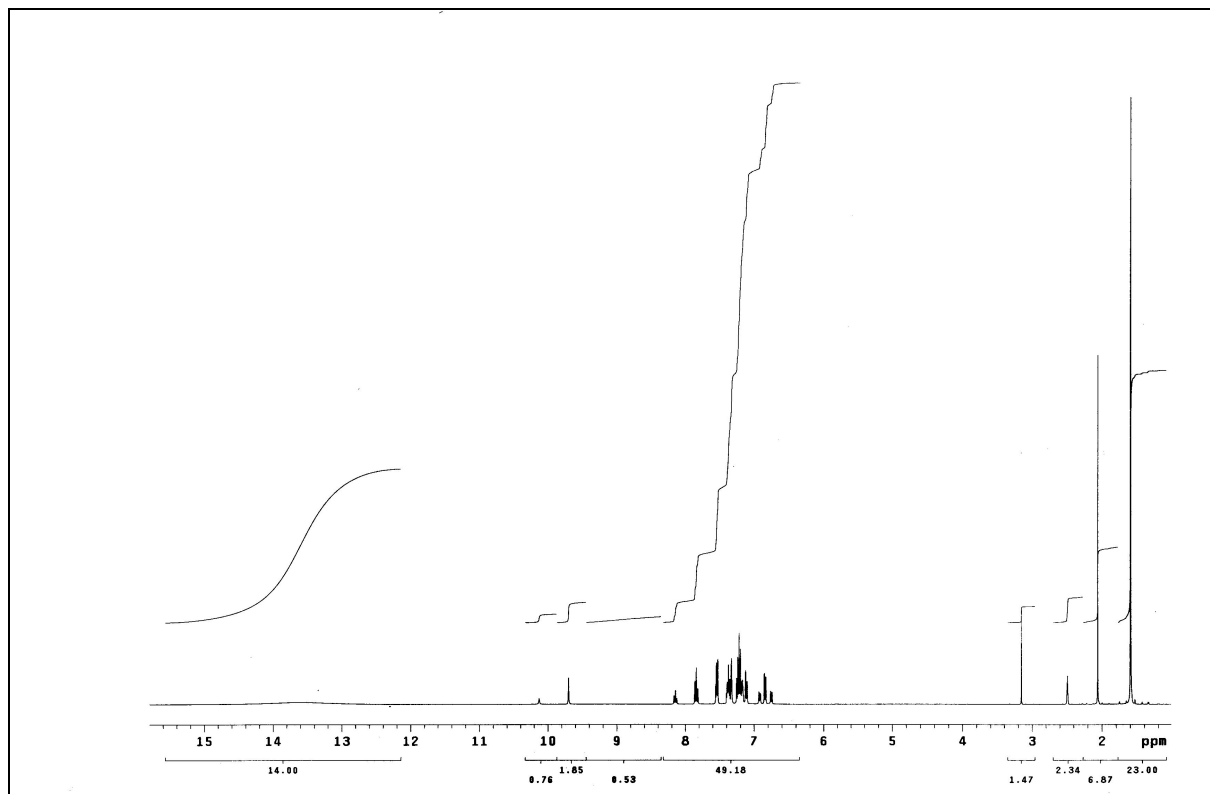
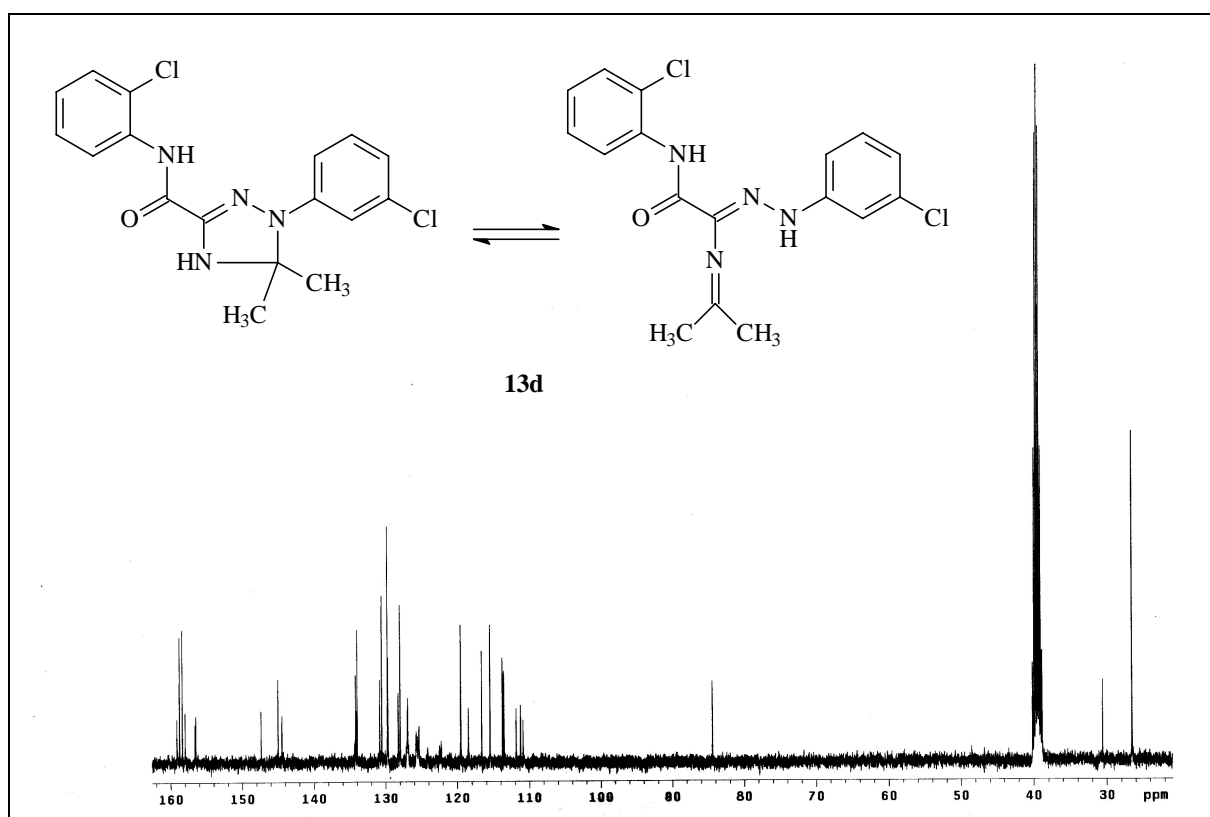


Abbildung 29: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **9f** in DMSO-d_6

Abbildung 30: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **9s** in DMSO-d₆Abbildung 31: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **9s** in DMSO-d₆

Abbildung 32: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **13a** in DMSO-d₆Abbildung 33: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **13a** in DMSO-d₆

Abbildung 34: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d₆Abbildung 35: ¹³C-NMR-Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d₆

Abbildung 36: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d_6 versetzt mit CF_3COOD (1. Tag)Abbildung 37: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD (1.Tag)

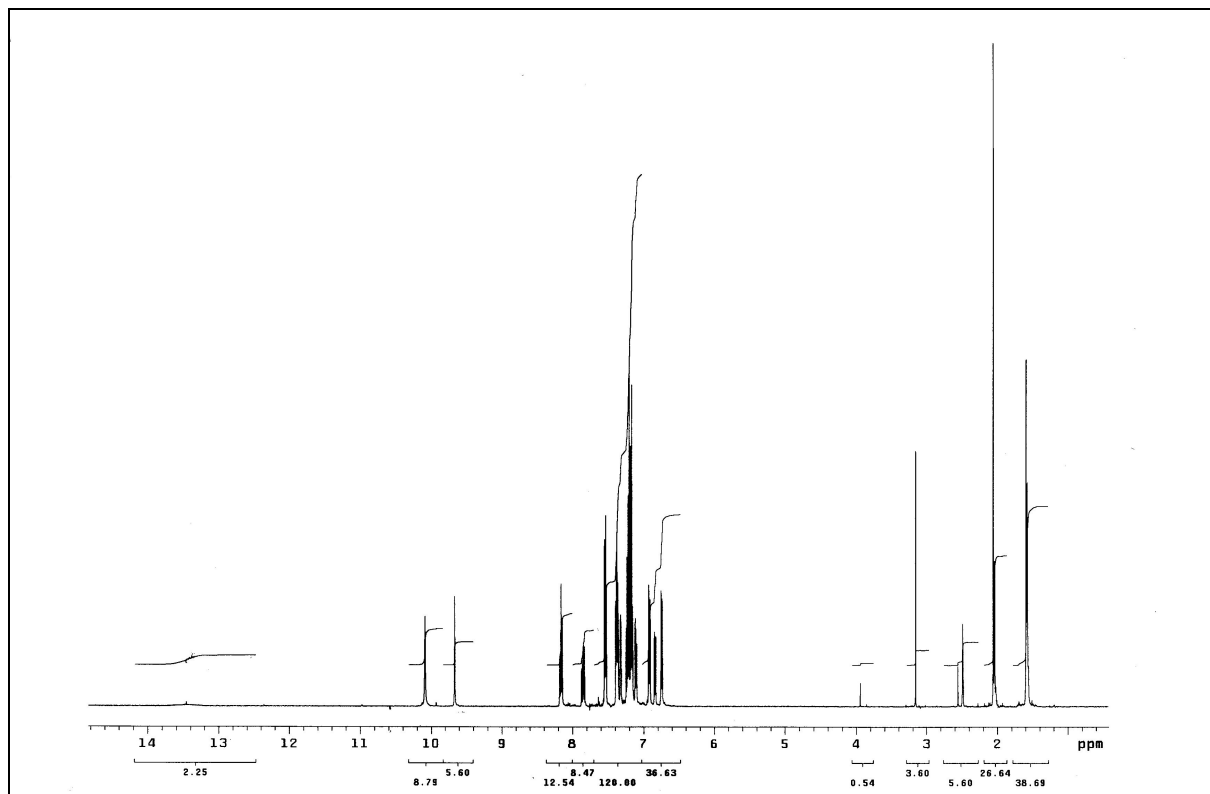


Abbildung 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD nach elf Tagen

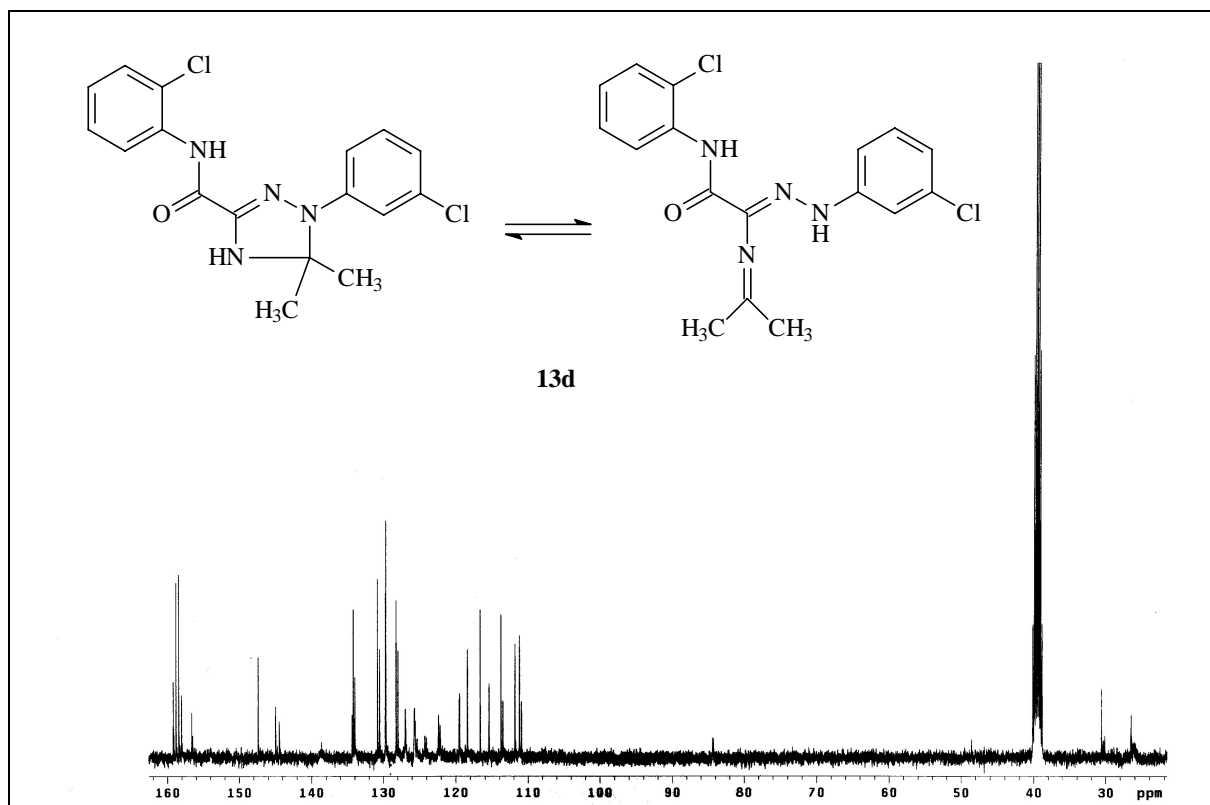
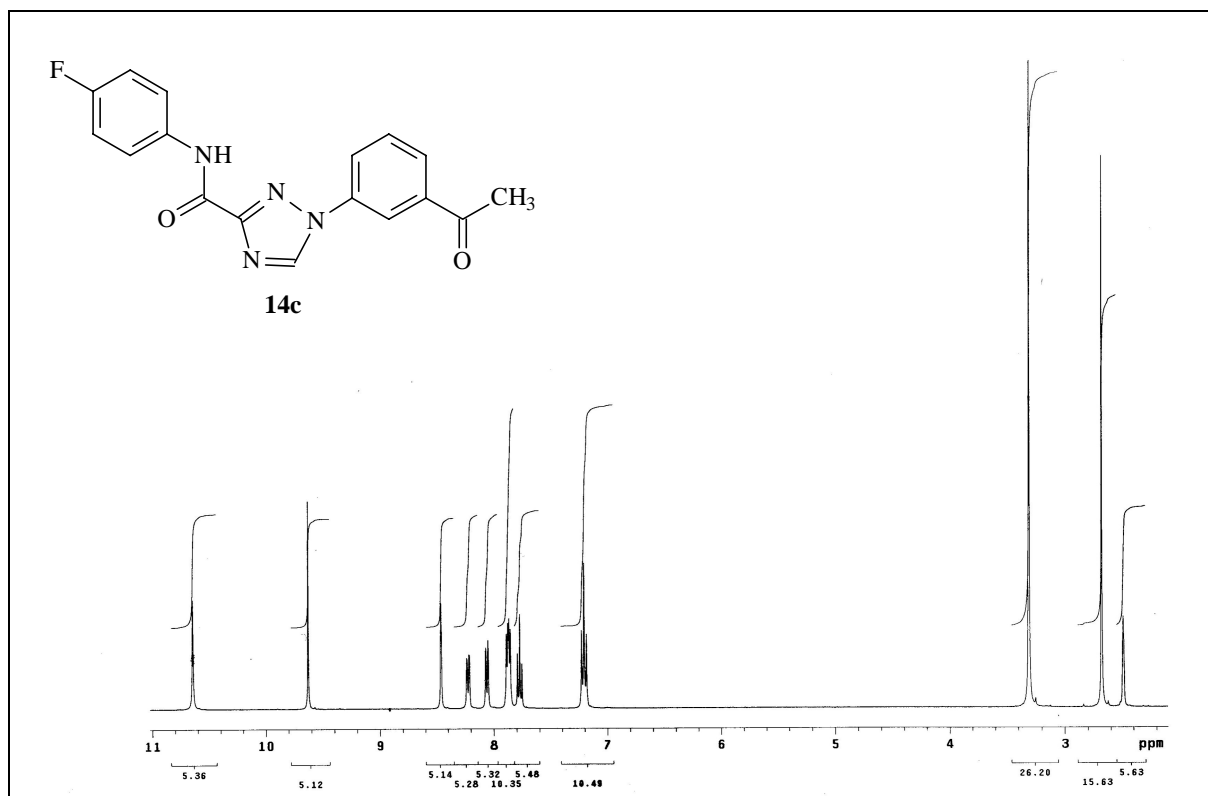
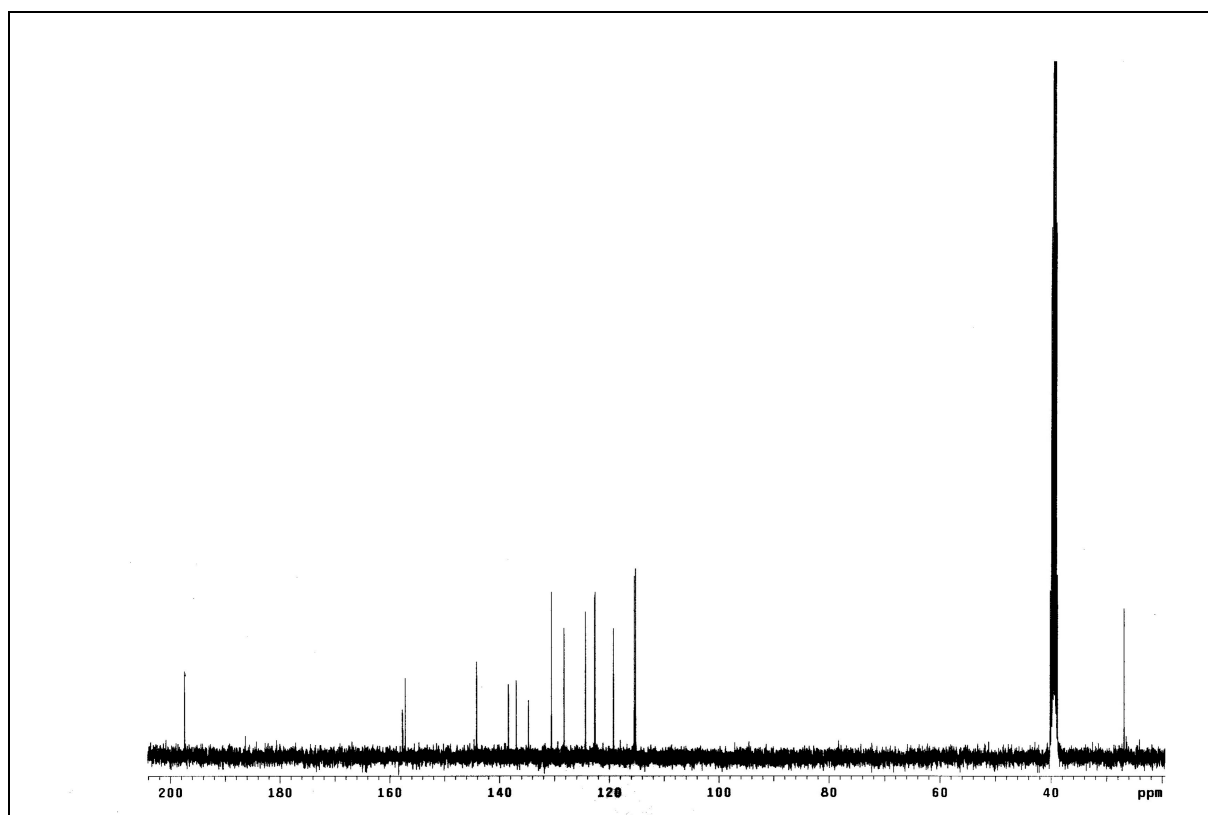
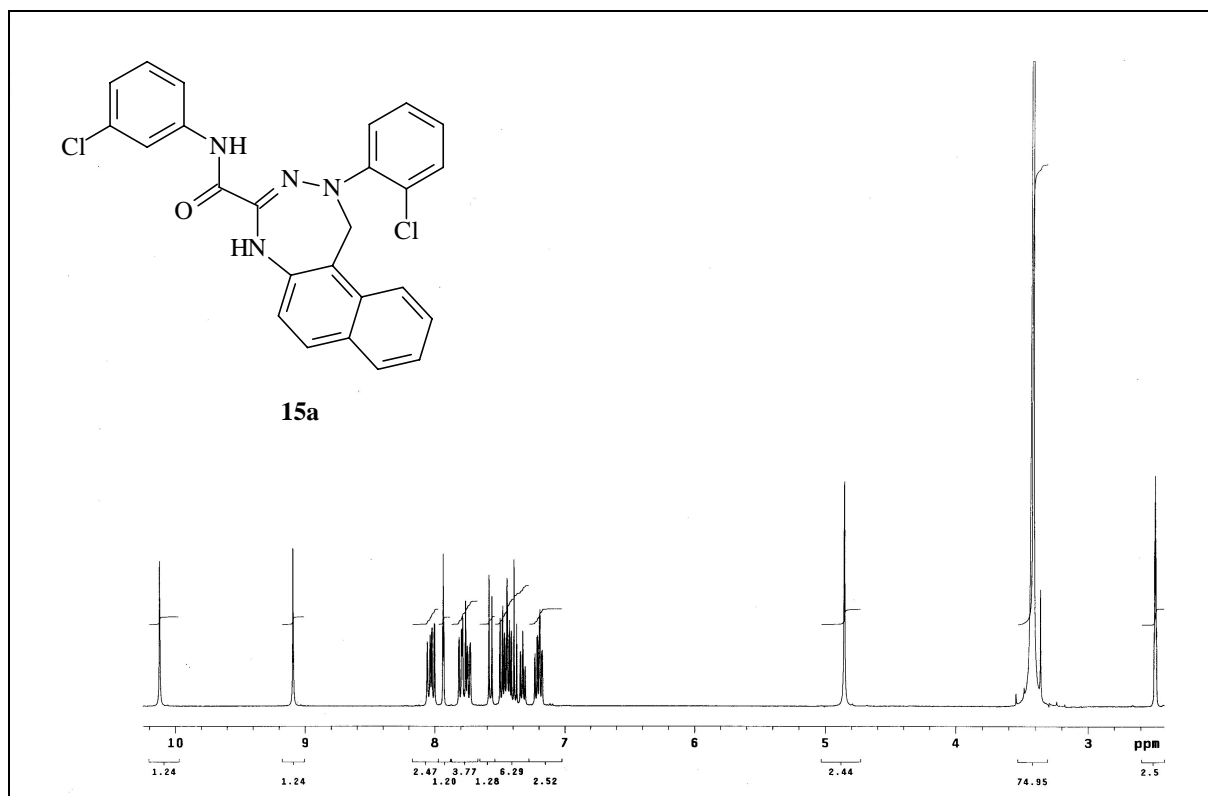
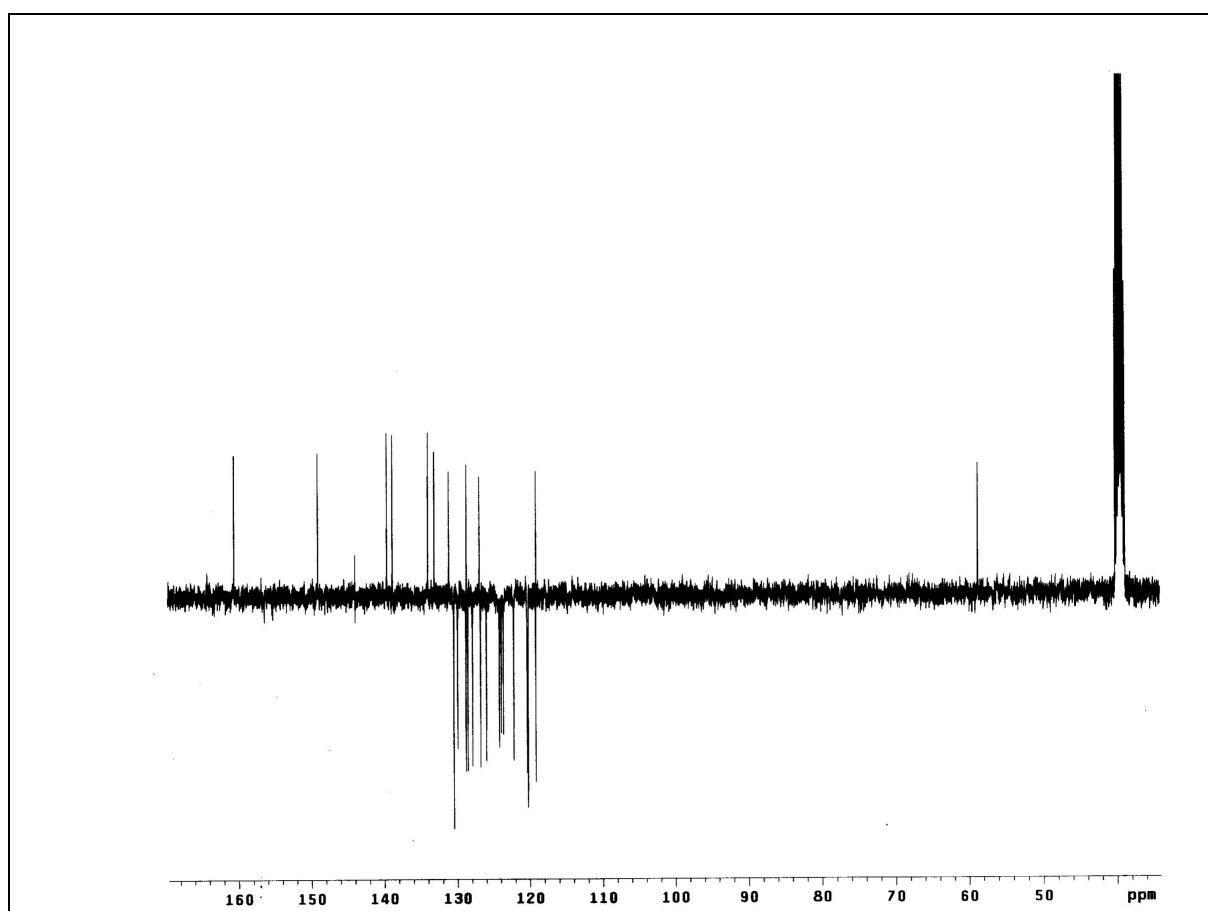
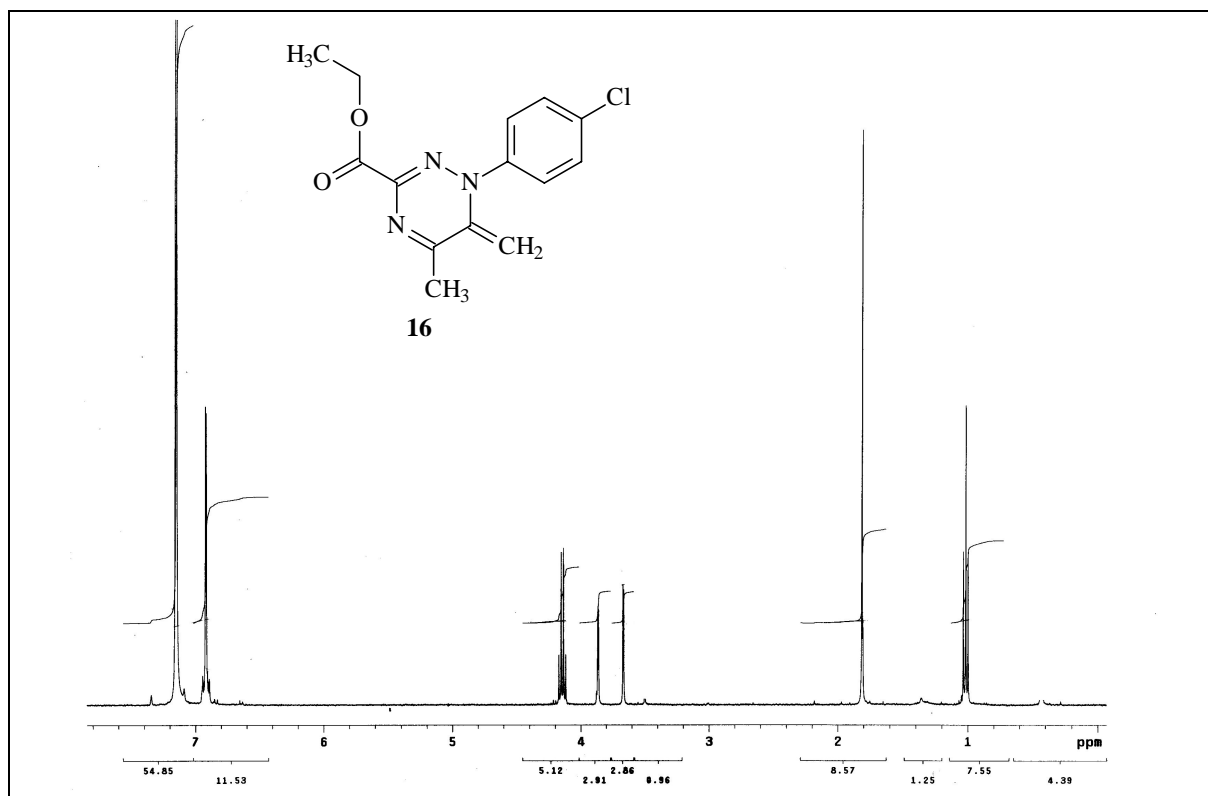
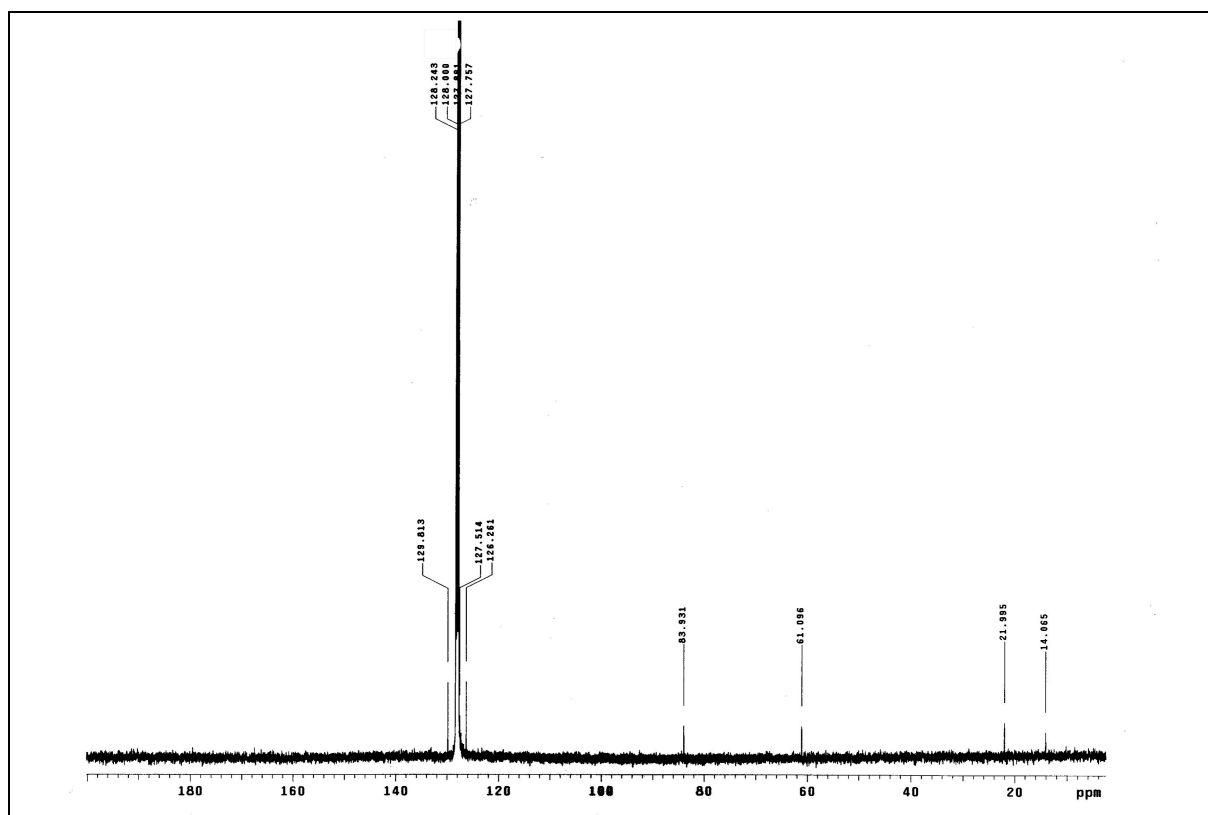
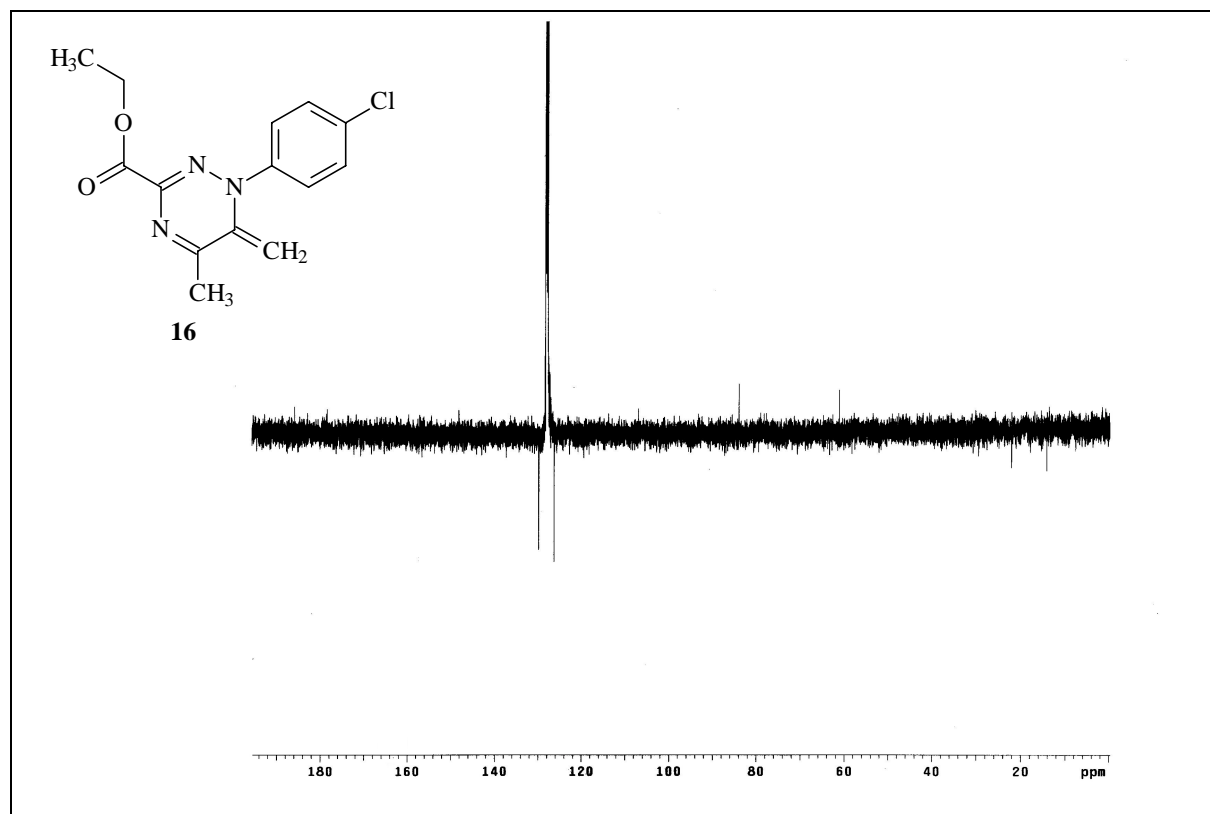


Abbildung 39: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **13d** in DMSO-d_6 , versetzt mit CF_3COOD nach elf Tagen

Abbildung 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **14c** in DMSO-d_6 Abbildung 41: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **14c** in DMSO-d_6

Abbildung 42: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **15a** in DMSO-d_6 Abbildung 43: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **15a** in DMSO-d_6 , APT-Technik

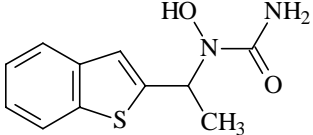
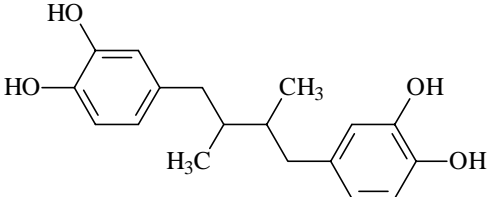
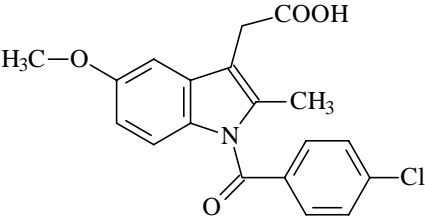
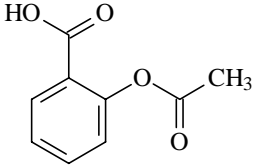
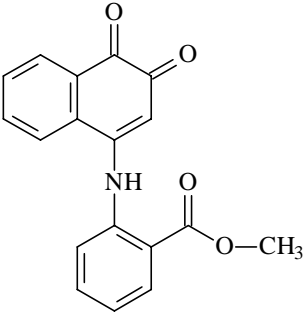
Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **16** in Benzen- d_6 Abbildung 45: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **16** in Benzen- d_6

Abbildung 46: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **16** in Benzen- d_6 , APT-Technik

II Strukturformeln und Testergebnisse der Inhibitoren

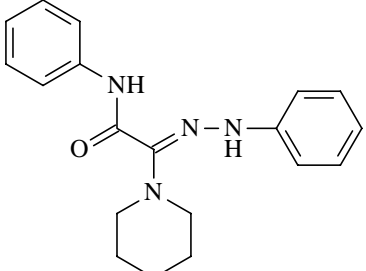
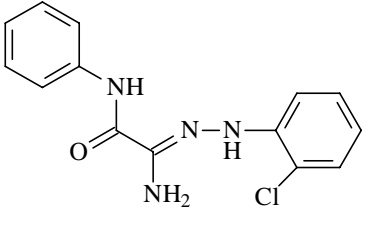
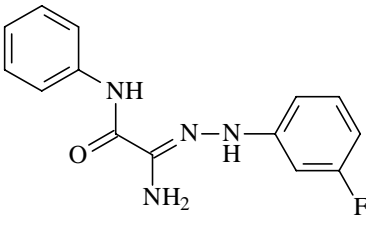
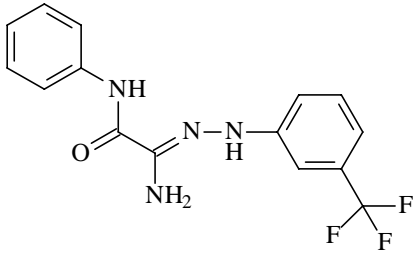
II.1 Referenzinhibitoren

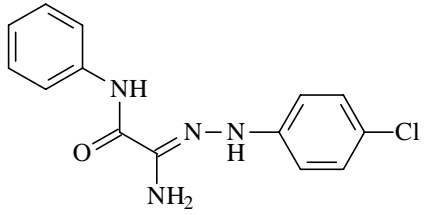
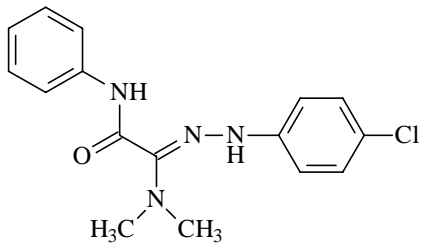
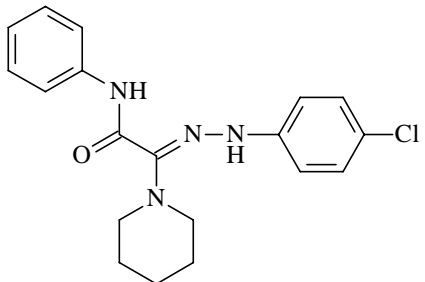
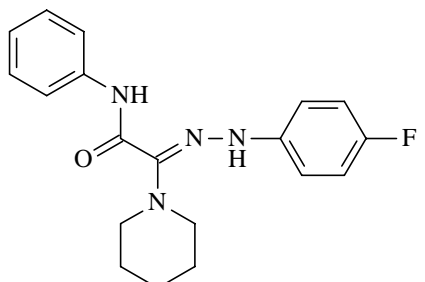
Tabelle 19: Strukturformeln der Referenzinhibitoren

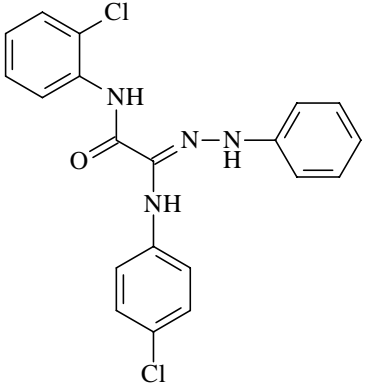
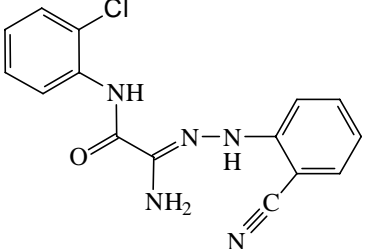
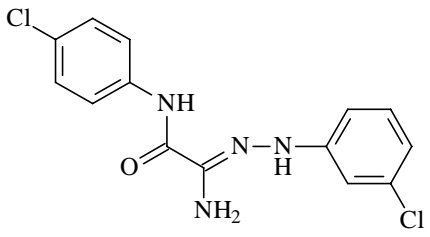
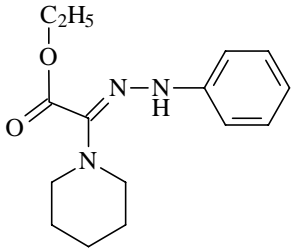
Bezeichnung	Strukturformel	Substanzquelle
Zileuton		Zyflo™ Filmtab®, Abbott
NDGA		Fluka Chemical
Indometacin		VEB Berlin Chemie
ASS		VEB Berlin Chemie
CGS 8515		H. Buff, Düsseldorf

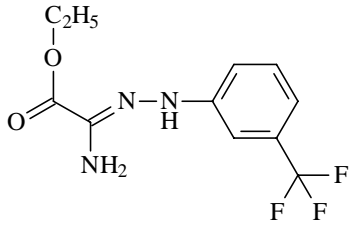
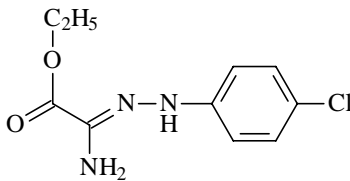
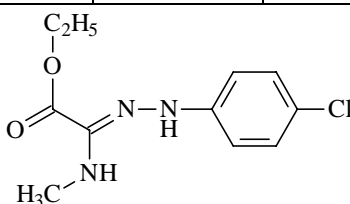
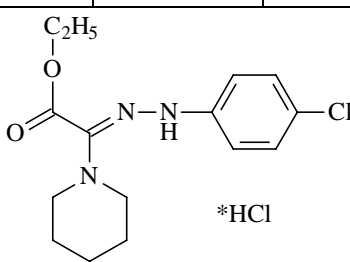
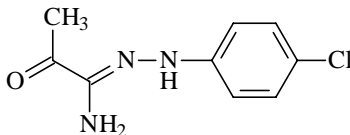
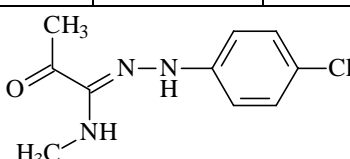
II.2 Offenkettige Verbindungen

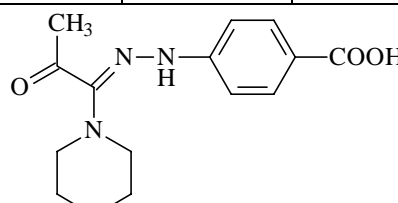
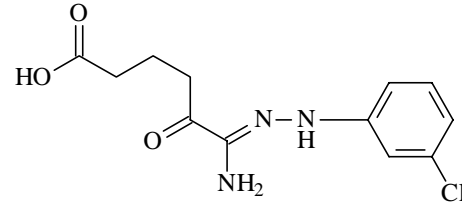
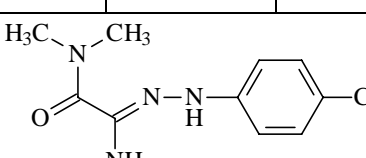
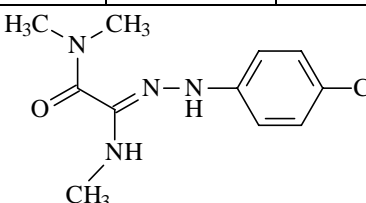
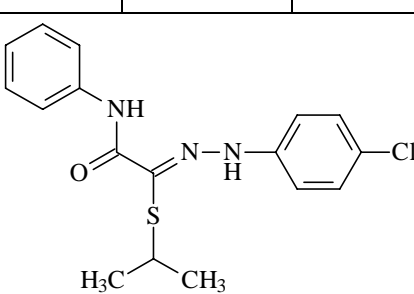
Tabelle 20: Strukturformeln und Testergebnisse der offenkettigen Verbindungen
 Hemmwerte im humanen Vollblut in der Konzentration 10 μM und IC_{50} an der
 Sojabohnen-L-1
 Hemmwertangaben in [%] $\text{MW} \pm \text{SD}$ (n = 3)

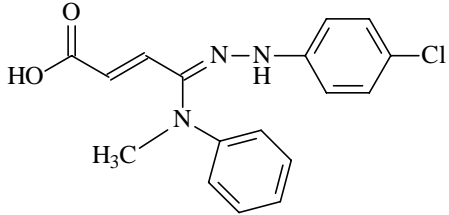
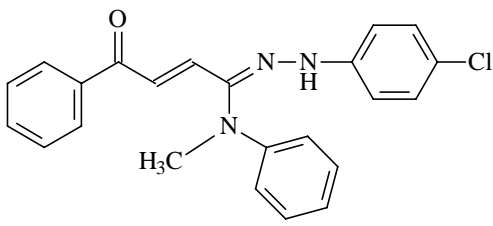
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC_{50} [μM] Sb-L1
T1						[Frohberg 1995]
	-21 \pm 2,6	-38 \pm 7,9	-44 \pm 11,4	--	51 \pm 4,9	0,011
T2						[Frohberg]
	32 \pm 4,7	36 \pm 12,6	30 \pm 15,2	--	35 \pm 3,4	2,52
9d						Kap. 2.2.1.3
	76* \pm 0,8	75* \pm 7,1	54* \pm 18,9	-11 \pm 27,5	15 \pm 39,8	0,084
9c						Kap. 2.2.1.3
	27 \pm 3,8	34 \pm 3,4	32 \pm 5,1	--	--	0,11

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	
T3						[Frohberg 1995]
	89* ± 1,3	82* ± 5,3	83 ± 18,3	68 ± 18,7	50* ± 11,3	0,061
T4						[Frohberg 1995]
	48* ± 12,8	54* ± 5,2	-96 ± 4,4	-4 ± 18,5	71 ± 10,6	0,012
T5						[Frohberg 1995]
	29* ± 8,5	21* ± 19,0	8 ± 18,5	--	83* ± 11,1	0,013
T6						[Frohberg 1995]
	-5 ± 5,3	-28 ± 14,0	4 ± 14,5	1 ± 9,5	-19 ± 21,7	0,0091

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T7						[Drut- kowski 1999]
	-37 ± 2,4	-15 ± 4,0	-48 ± 26,0	2 ± 10,8	42 ± 20,5	1,1
9g						Kap. 2.2.1.3
	63* ± 7,3	48* ± 9,2	1 ± 11,3	23 ± 27,1	41* ± 0,1	20% bei 40 μM
9k						Kap. 2.2.1.3
	32 ± 14,4	-4 ± 18,0	-4 ± 25,4	-14 ± 25,4	21 ± 15,1	0,15
T8						[Frohberg 1995]
	9 ± 7,1	-5 ± 12,2	5 ± 6,8	23 ± 9,3	17 ± 25,5	--

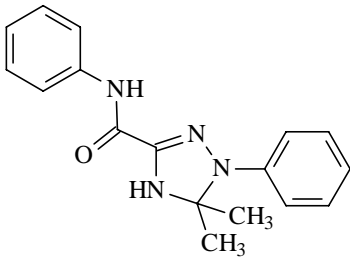
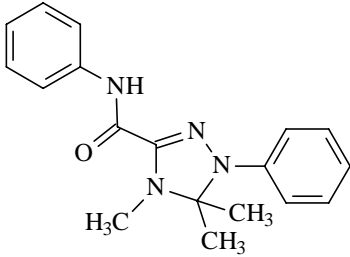
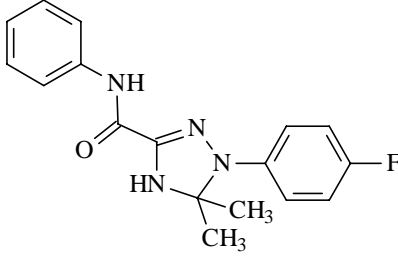
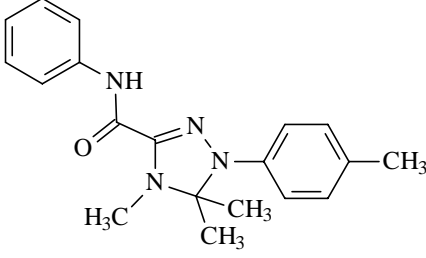
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T9						Kap. 2.2.1.3
	38 ± 9,6	42 ± 0,8	-15 ± 4,6	-110* ± 0,1	11 ± 0,8	0,10
T10						[Frohberg 1995]
	99* ± 2,6	86* ± 3,4	87* ± 1,5	56* ± 12,5	73* ± 7,6	0,23
T11						[Donner 2002]
	66* ± 11,4	61* ± 2,4	65* ± 9,0	-12 ± 27,0	46* ± 1,6	0,20
T12						[Frohberg 1995]
	14 ± 0,7	-2 ± 9,2	21 ± 14,6	19 ± 27,7	7 ± 4,6	--
T13						[Frohberg 1995]
	91* ± 1,4	76* ± 0,8	27 ± 3,1	25 ± 18,2	2 ± 5,8	0,36
T14						[Schulze 2001]
	64* ± 1,8	45* ± 5,6	50* ± 11,2	-8 ± 14,9	-44* ± 18,8	0,44

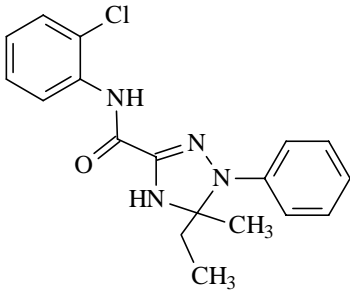
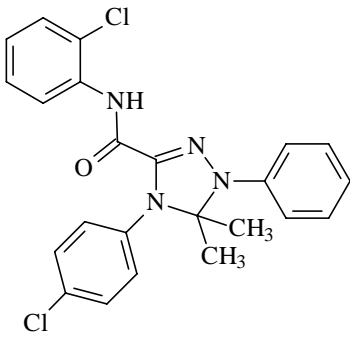
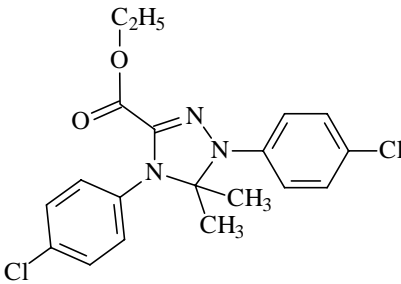
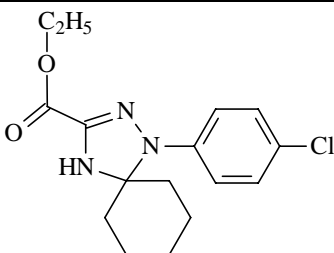
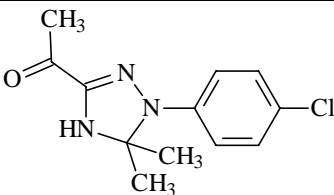
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T15						[Schulze 2001]
	28 ± 9,8	-9 ± 8,7	-32 ± 38,6	-9 ± 1,0	21 ± 13,0	keine Hemmung
T16						[Drutkowski 1999]
	-33 ± 30,6	-51* ± 6,6	-3 ± 26,6	-53* ± 2,2	-16 ± 29,8	1,5
T17						[Donner 2002]
	93* ± 12,7	83* ± 17,9	25 ± 30,1	11 ± 11,9	-8 ± 11,9	6,34
T18						[Schulze 2001]
	51* ± 5,9	54* ± 7,8	-43* ± 17,4	-23 ± 20,9	-13 ± 36,1	10% bei 250 μM
T19						[Donner 2002]
	-6 ± 4,3	5 ± 2,6	9 ± 8,9	1 ± 18,0	17 ± 11,6	0,88

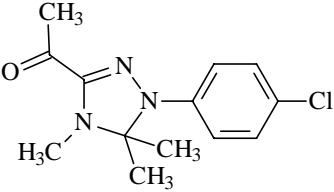
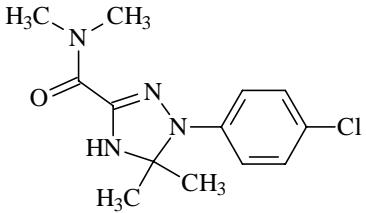
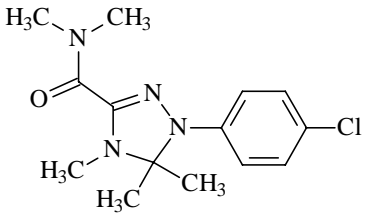
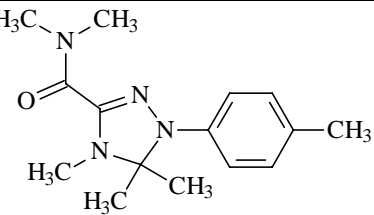
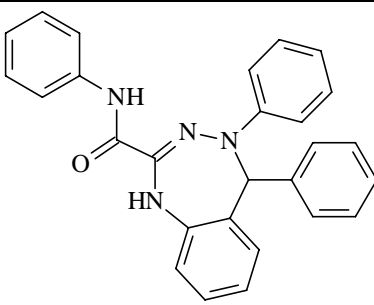
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T20						[Frohberg]
	6 ± 12,2	19 ± 14,6	-17 ± 55,9	13 ± 10,5	43* ± 9,0	
T21						[Frohberg]
	-4 ± 9,9	-35 ± 23,3	-38* ± 3,9	-55 ± 4,9	10 ± 7,4	

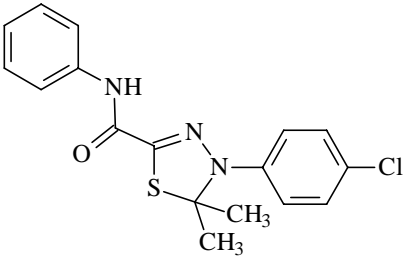
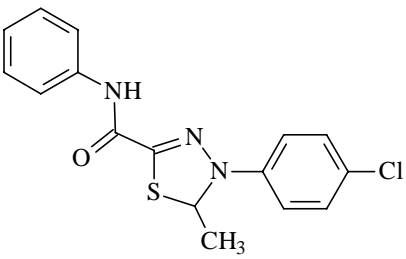
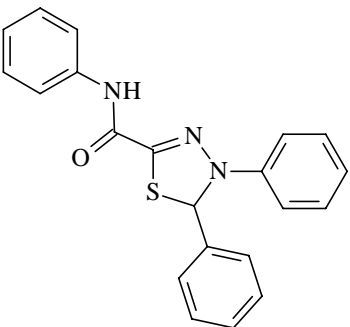
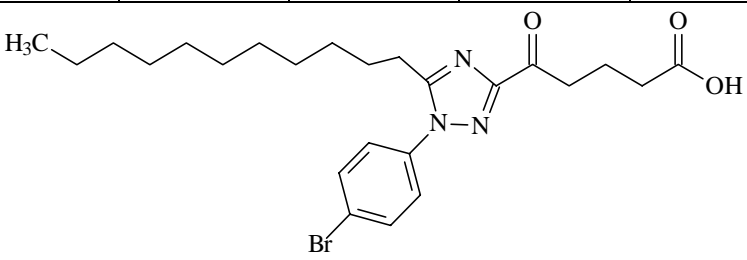
II.3 Cyclische Verbindungen

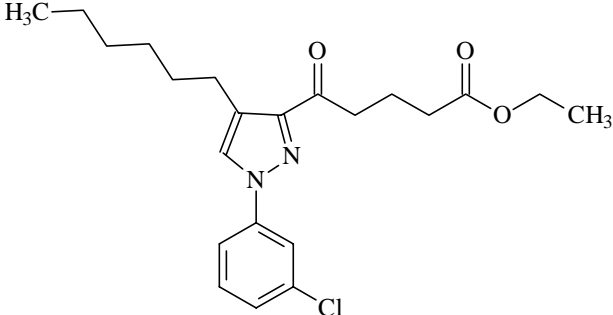
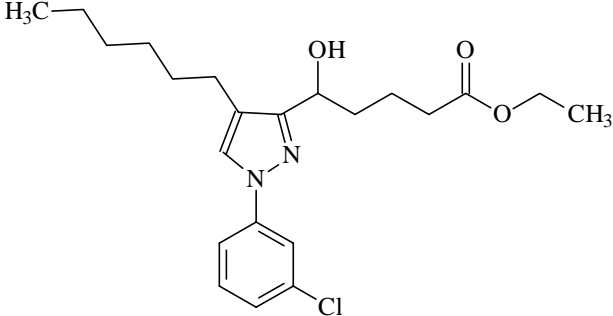
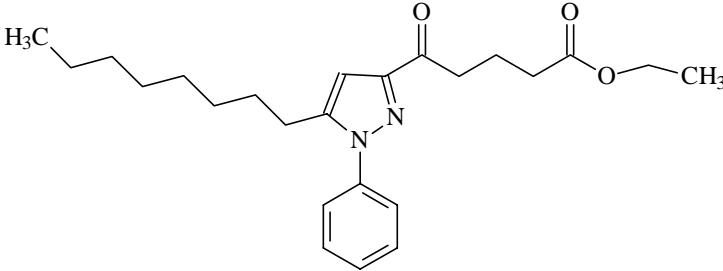
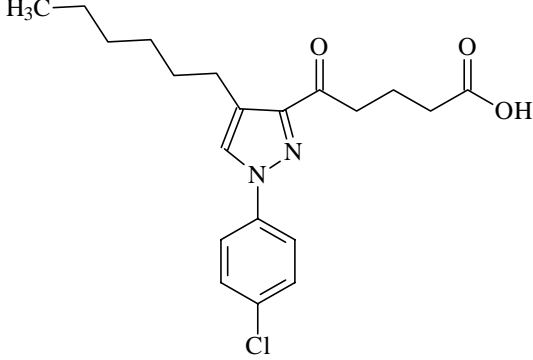
Tabelle 21: Strukturformeln und Testergebnisse der cyclischen Verbindungen
Hemmwerte im humanen Vollbut in der Konzentration 10 μ M und IC₅₀ an der
Sojabohnen-L-1
Hemmwertangaben in [%] MW \pm SD (n = 3)

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μ M] Sb-L1
T22						[Drut- kowski 1999]
	85* \pm 10,1	73* \pm 7,9	38 \pm 30,1	26 \pm 3,3	29 \pm 9,7	0,31
13a						Kap. 2.2.1.4.1
	36* \pm 0	36 \pm 11,6	45 \pm 2,5	-6 \pm 6,3	-3 \pm 14,7	0,038
T2						[Drut- kowski 1999]
	79* \pm 0,4	41 \pm 3,4	46* \pm 16,5	-6 \pm 4,2	19 \pm 7,5	0,26
T24						[Donner 2002]
	26* \pm 3,6	-1 \pm 30,3	27 \pm 6,5	20 \pm 14,9	57 \pm 3,7	0,56

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T25						[Drutkowski 1999]
	46* ± 18,8	35 ± 17,1	-42 ± 39,3	30 ± 1,0	-37* ± 9,0	0,19
T26						[Drutkowski 1999]
	32 ± 20,8	27 ± 15,9	7 ± 13,4	25 ± 6,2	39* ± 18,6	0,042
T27						[Drutkowski 1999]
	49* ± 1,5	30 ± 10,9	32 ± 17,2	--	57* ± 4,7	0,091
T28						[Drutkowski 1999]
	-4 ± 14,4	5 ± 17,4	-26 ± 45,6	-15 ± 9,7	4 ± 31,5	0,098
T29						[Drutkowski 1999]
	100* ± 0	92* ± 7,4	31 ± 32,7	16 ± 7,3	63 ± 8,4	0,74

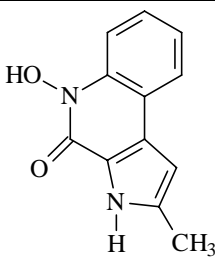
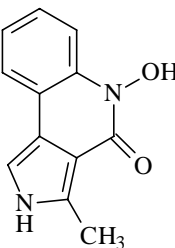
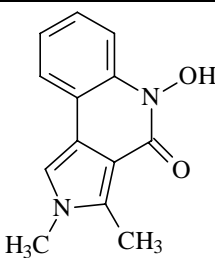
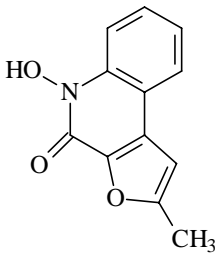
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	
T30						[Donner 2002]
	-9 ± 9,2	15 ± 11,0	-6 ± 30,7	4 ± 19,8	60* ± 10,6	0,36
T31						[Donner 2002]
	77* ± 3,2	67* ± 6,3	50 ± 31,9	-3 ± 0,8	-25* ± 2,6	0,41
T32						[Donner 2002]
	14 ± 19,2	19* ± 2,5	-24 ± 40,4	30 ± 11,9	-7 ± 1,0	1,74
T33						[Donner 2002]
	38 ± 24,3	36* ± 7,3	64* ± 7,7	15 ± 18,4	14 ± 14,7	16,1
T34						[Donner 2002]
	26 ± 4,7	2 ± 3,6	16 ± 18,9	-24 ± 5,7	-6 ± 3,2	0,088

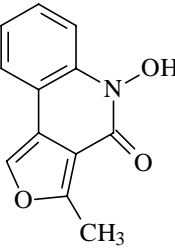
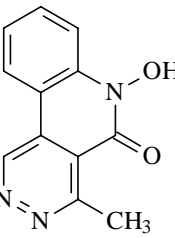
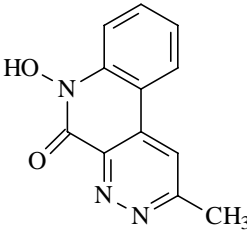
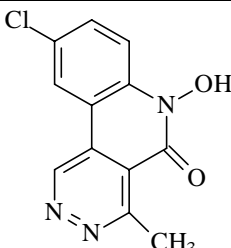
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T35						[Donner 2002]
	-4 ± 7,1	-47* ± 18,0	22 ± 33,3	33 ± 0,6	-61* ± 11,5	15,78
T36						[Donner 2002]
	-21 ± 6,7	33* ± 2,1	21 ± 16,5	13 ± 9,5	--	1,07
T37						[Donner 2002]
	32 ± 24,6	3 ± 3,3	18 ± 30,3	21 ± 18,9	16 ± 5,9	29,0
T38						[Danz 1995]
	3 ± 27,6	-5* ± 0,5	-42* ± 8,8	23 ± 17,1	-1 ± 41,7	--

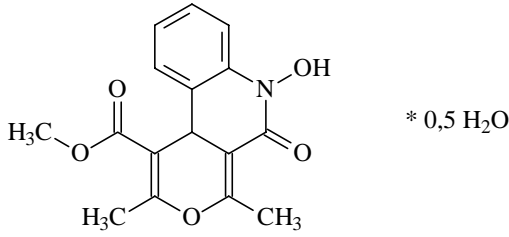
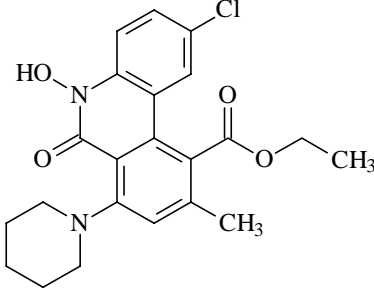
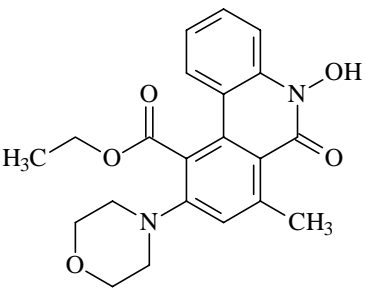
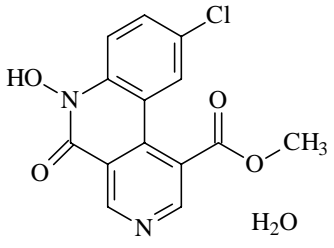
Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T39						[Danz 1995]
	2 ± 14,5	-5 ± 23,1	-36 ± 31,6	-4 ± 29,6	33* ± 3,4	--
T40						[Danz 1995]
	-26 ± 13,6	-26 ± 0,3	-10 ± 22,5	36 ± 32,9	13 ± 3,3	--
T41						[Grünhardt 1993]
	29 ± 10,2	--	-43 ± 21,8	25 ± 14,9	21 ± 3,1	--
T42						[Grünhardt 1993]
	21 ± 39,1	-17 ± 19,2	-13 ± 17,2	-3 ± 0,8	7 ± 0	--

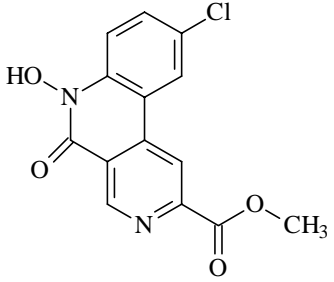
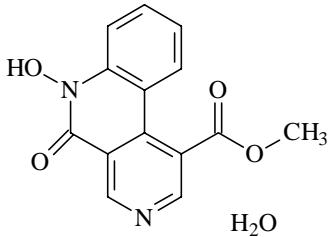
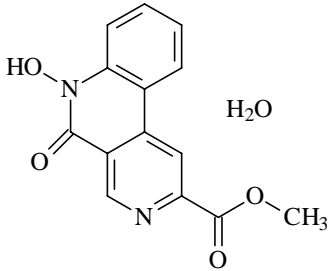
II.4 Hydroxamsäurederivate

Tabelle 22: Strukturformeln und Testergebnisse der Hydroxamsäurederivate
Hemmwerte im humanen Vollbut in der Konzentration 10 μM und IC_{50} an der
Sojabohnen-L-1
Hemmwertangaben in [%] $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n = 3$)

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC_{50} [μM] Sb-L1
T43						[Görlitzer 2002 (1)]
	-33* \pm 6,6	-21* \pm 4,0	-39 \pm 2,4	-20 \pm 6,0	-39 \pm 3,4	80
T44						[Görlitzer 2002 (1)]
	27 \pm 8,2	15 \pm 6,4	7 \pm 13,4	-30 \pm 11,9	-17 \pm 3,8	250
T45						[Görlitzer 2002 (1)]
	20 \pm 11,1	22 \pm 14,0	-2 \pm 6,9	-53* \pm 3,2	-75* \pm 18,5	18% bei 250 μM
T46						[Görlitzer 2002 (2)]
	-52* \pm 5,8	-36* \pm 3,1	-56* \pm 18,6	-36* \pm 3,2	-17 \pm 8,3	12% bei 250 μM

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T47						[Görlitzer 2002 (2)]
	-18 ± 1,7	-15 ± 17,0	-34 ± 3,5	14 ± 16,4	-34 ± 1,5	26% bei 250 μM
T48						[Görlitzer 2002 (3)]
	7 ± 8,2	17 ± 10,6	58* ± 27,6	--	-3 ± 46,1	23% bei 250 μM
T49						[Görlitzer 2002 (3)]
	25* ± 10,1	34* ± 7,0	34* ± 9,9	--	15 ± 11,4	5% bei 250 μM
T50						[Görlitzer 2002 (3)]
	22* ± 3,7	31* ± 2,7	55* ± 5,4	--	13 ± 10,5	0% bei 250 μM

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T51	 * 0,5 H ₂ O					[Görlitzer 2003 (1)]
	51* ± 1,7	14* ± 3,3	59* ± 1,0	34 ± 3,0	-1 ± 11,5	0% bei 100 μM
T52						[Görlitzer 2003 (2)]
	-31 ± 2,8	-6 ± 22,2	-6 ± 0,1	-15 ± 7,8	15 ± 13,4	0% bei 100 μM
T53						[Görlitzer 2003 (2)]
	46* ± 17,4	39 ± 14,0	36 ± 18,1	14 ± 11,6	21 ± 22,1	0% bei 100μM
T54	 H ₂ O					[Görlitzer 2003 (3)]
	12 ± 34,8	-5 ± 0,5	9 ± 13,6	30 ± 18,1	42* ± 2,0	0% bei 100 μM

Bezeichnung	Strukturformel					Synthese
	5-LOX LTB ₄	5-LOX 5-HETE	12-LOX 12-HETE	15-LOX 15-HETE	COX-1 12-HHT	IC ₅₀ [μM] Sb-L1
T55						[Görlitzer 2003 (3)]
	29* ± 14,2	16 ± 11,3	24 ± 7,8	44* ± 10,1	13 ± 5,5	0% bei 100 μM
T56						[Görlitzer 2003 (3)]
	8 ± 6,0	-30 ± 8,9	-16 ± 8,3	40* ± 10,1	-10 ± 12,4	0% bei 100 μM
T57						[Görlitzer 2003 (3)]
	26* ± 2,3	36 ± 15,1	12 ± 6,2	50* ± 13,9	22 ± 23,0	0% bei 100 μM

III Testergebnisse an der L-1 der Sojabohne

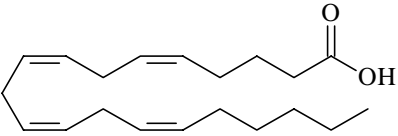
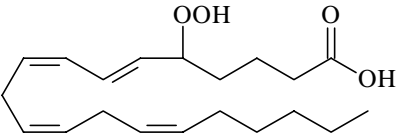
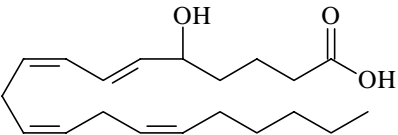
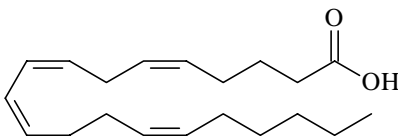
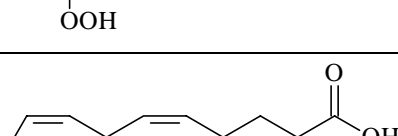
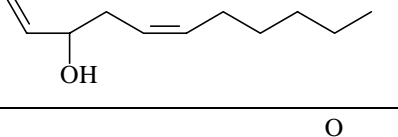
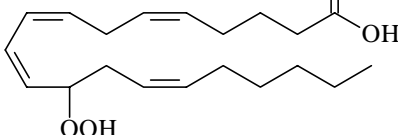
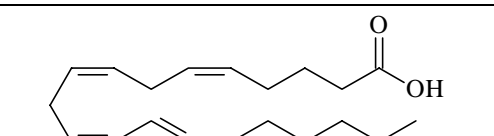
Tabelle 23: IC₅₀ an der L-1 der Sojabohne

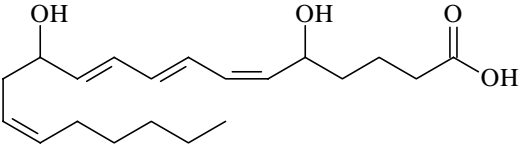
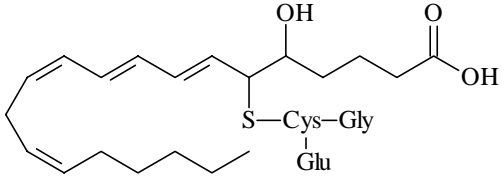
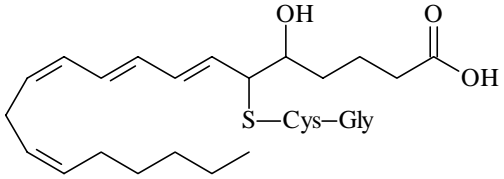
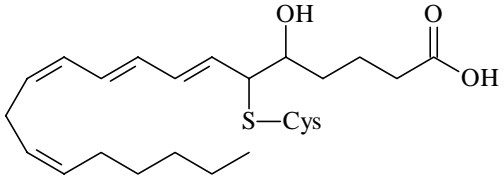
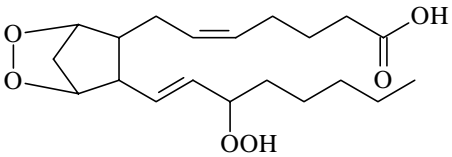
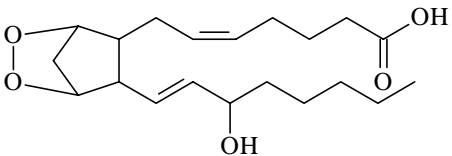
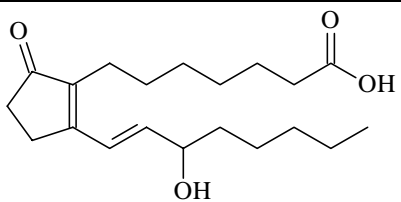
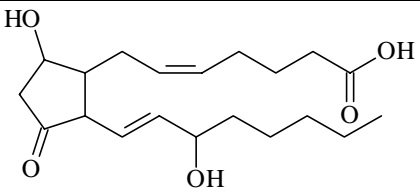
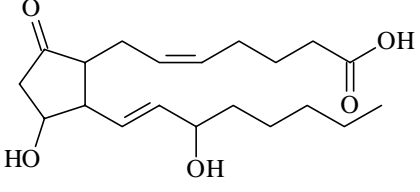
Bestimmung über Sauerstoffverbrauchsmessung. Experimentelle Bedingungen wie in [Clemens 1998, Clemens 2001 (2)] angegeben

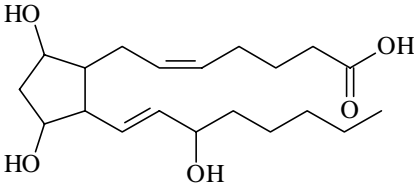
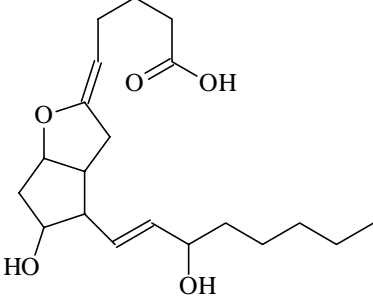
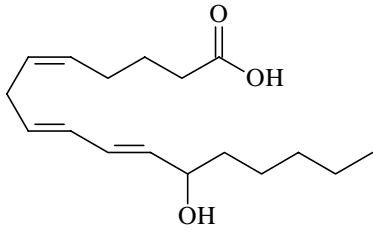
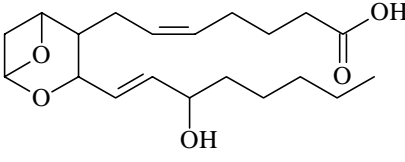
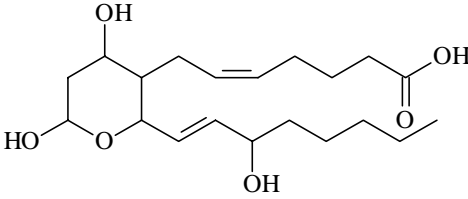
<u>Amidrazone</u>		<u>Heterocyclen</u>	
Verbindung	IC ₅₀ [µM]	Verbindung	IC ₅₀ [µM]
9a	0,69	13a	0,038
9b	0,24	13b	0,14
9c	0,11	13c	0,26
9d	0,084	13d	0,13
9e	0,061	13e	4 % bei 250 µM
9f	0,18	13f	0,21
9g	20 % bei 40 µM	13g	1,27
9h	0,11	13h	0,14
9i	15 % bei 250 µM	13i	0,11
9j	15 % bei 40 µM	13j	1,40
9k	0,15	13k	1,07
9l	1,06	13l	5,72
9m	0,13	13m	0,46
9n	0,23	13n	10,6
9o	12 % bei 80 µM	14a	11,4
9p	3,9	14b	17% bei 250 µM
9q	58,6	14c	5% bei 250 µM
9r	0,066	15a	0% bei 250 µM
9s	1,9	15b	134
10a	61 % bei 250 µM	15c	15% bei 250 µM
10b	0,025	16	10
11	70		
12	1,4		
Zileuton	12% bei 250 µM	NDGA	8,9
CGS 8515	0 % bei 250 µM		

IV Strukturformeln der AA-Metaboliten

Tabelle 24: Strukturformeln der AA-Metaboliten

Metabolit	Strukturformel
AA	
5-HPETE	
5-HETE	
12-HPETE	
12-HETE	
15-HPETE	
15-HETE	
LTA ₄	

Metabolit	Strukturformel
LTB ₄	
LTC ₄	
LTD ₄	
LTE ₄	
PGG ₂	
PGH ₂	
PGB ₁	
PGD ₂	
PGE ₂	

Metabolit	Strukturformel
PGF _{2α}	 <p>The structure of PGF_{2α} consists of a five-membered cyclopentane ring with two hydroxyl groups (HO) at the 1 and 2 positions. Two side chains are attached to the ring: one at the 3-position and one at the 4-position. Both side chains are unsaturated and terminate in a carboxylic acid group (COOH). The side chain at the 3-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position. The side chain at the 4-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position.</p>
PGI ₂	 <p>The structure of PGI₂ features a five-membered cyclopentane ring with a hydroxyl group (HO) at the 1-position and an oxygen atom at the 2-position. Two side chains are attached to the ring: one at the 3-position and one at the 4-position. The side chain at the 3-position is a six-membered ring containing a double bond and a carboxylic acid group (COOH). The side chain at the 4-position is a long chain with a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position.</p>
12-HHT	 <p>The structure of 12-HHT is a long-chain molecule with two double bonds and a hydroxyl group (OH) at the 12-position. The chain ends in a carboxylic acid group (COOH).</p>
TxA ₂	 <p>The structure of TxA₂ consists of a bicyclic system with two oxygen atoms. Two side chains are attached to the system: one at the 3-position and one at the 4-position. Both side chains are unsaturated and terminate in a carboxylic acid group (COOH). The side chain at the 3-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position. The side chain at the 4-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position.</p>
TxB ₂	 <p>The structure of TxB₂ is similar to TxA₂ but with a different bicyclic system. It has two hydroxyl groups (HO) on the bicyclic system. Two side chains are attached to the system: one at the 3-position and one at the 4-position. Both side chains are unsaturated and terminate in a carboxylic acid group (COOH). The side chain at the 3-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position. The side chain at the 4-position has a double bond at the 6-position and a hydroxyl group (OH) at the 5-position.</p>

Publikationsliste

Originalartikel:

- **Clemens, F., G. Drutkowski, M. Wiese, P. Froberg:** The inactivation of lipoxygenase-1 from soybeans by amidrazones. *Biochim. Biophys. Acta* 1549, 88-98 (2001)
- **Froberg, P., G. Drutkowski, C. Wagner, O. Lichtenberger:** Structure elucidation of *N*-aryl-2-chloro-3-oxobutanamides with respect to intra- and intermolecular hydrogen bonding. *J.Chem.Res.(S)* 13-14 (2002)
- **Froberg, P., G. Drutkowski, C. Wagner:** Synthesis and structural assignment of oxanilo-*N*-arylhyaazonoyl chlorides. *Eur. J. Org. Chem.* 1654,1663 (2002)
- **Drutkowski, G., C. Donner, I. Schulze, P. Froberg:** Derivatives of arylhyaazonic acids. Part 2: A facile approach to the novel 4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazoles via cyclization of amidrazones. *Tetrahedron* 58, 5317-5326 (2002)
- **Görlitzer, K., J. Fabian, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyrrolo[2,3-*c*]quinolines and pyrrolo[3,4-*c*]quinolines - synthesis and investigation of lipoxygenase inhibition. *Pharmazie* 57, 243-247 (2002)
- **Görlitzer, K., J. Fabian, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Furo[2,3-*c*]quinolines and furo[3,4-*c*]quinolines - synthesis and investigation of lipoxygenase inhibition. *Pharmazie* 57, 159-168 (2002)
- **Görlitzer, K., J. Fabian, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyridazino[3,4-*c*]quinolines and pyridazino[4,5-*c*]quinolines - synthesis and investigation of lipoxygenase inhibition. *Pharmazie* 57, 362-371 (2002)
- **Görlitzer, K., J. Trittmacher, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Pyrano[3,4-*c*]chinoline aus 1-Desaza-1-oxa-nifedipin. eingereicht (2003)
- **Görlitzer, K., J. Trittmacher, P.G. Jones, P. Froberg, G. Drutkowski:** Isomere Phenanthridine aus 1,2-Dihydro-5-methyl-2'-nitro-[1,1'-biphenyl]-2,6-dicarbon-säureestern. eingereicht (2003)
- **Görlitzer, K., M. Bode, P. Froberg, G. Drutkowski:** Benzo[*c*][2,7]naphthyridine aus 2,6-Dinor-nifedipin und dessen 2,5-Dicarbon-säuredimethylester-Isomer. in Vorbereitung (2003)

Posterpräsentationen:

- **Drutkowski, G., F. Clemens, P. Frohberg:** Synthesis of 1,2,4-triazoles as potential inhibitors of lipoxygenases. 17th International congress of heterocyclic chemistry, Wien (1999)
- **Drutkowski, G., F. Clemens, P. Frohberg:** Synthesis of 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazoles as potential inhibitors of lipoxygenases. Doktorandentagung der DPhG, Frankfurt (2000)
- **Clemens, F., G. Drutkowski, P. Frohberg, M. Wiese:** The mechanism of inactivation of lipoxygenase-1 from soybeans by amidrazones and triazolines. Doktorandentagung der DPhG, Frankfurt (2000)
- **Frohberg, P., F. Clemens, G. Drutkowski:** 4,5-Dihydro-1*H*-1,2,4-triazoles as inhibitors of lipoxygenases. Jahrestagung der DPhG, Münster (2000)
- **Drutkowski, G., C. Donner, I. Schulze, P. Frohberg:** In-vitro Untersuchungen an humanem Vollblut zur Auffindung von Hemmern der Eicosanoidbiosynthese. Jahrestagung der DPhG, Berlin (2002)
- **Drutkowski, G., C. Donner, I. Schulze, P. Frohberg:** In-vitro assay for the simultaneous determination of lipoxygenase- and cyclooxygenase-products in human whole blood using a HPLC-method. EUFEPS 2002 meeting, Stockholm (2002)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. Nuhn für die Überlassung des hochinteressanten Themas bedanken. Weiter danke ich ihm für Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie anzufertigen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. P. Froberg. Ihr danke für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, ihr nicht nachlassendes Interesse am Fortgang der Arbeit und für die zahlreichen fachlichen und organisatorischen Ratschläge. Gleichmaßen danke ich allen Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für das sehr angenehme Arbeitsklima und für die vielen kreativen Diskussionen.

Herrn Dr. J. Gießler danke ich in besonderem Maße für die unzähligen Blutabnahmen, die zur Durchführung der praktischen Arbeiten notwendig waren. Ebenso danke ich den vielen freiwilligen Probanden – Kollegen und Studenten – die sich für die Blutabnahme zur Verfügung gestellt haben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die Durchführung der Analytik der synthetisierten Verbindungen danke ich Frau B. Brandt, Frau M. Lunow, Frau A. Peters, Frau M. Woigk und den Mitarbeitern der NMR-Abteilung im Fachbereich Chemie.

Frau C. Ranke und Frau S. Knies gilt mein Dank für die Testung der Verbindungen am Sojabohnen-Screening-System.

Der Arbeitsgruppe Prof. Langner danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der HPLC-Anlage.

Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen – ihnen allen und jedem besonders.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Guntram Drutkowski
Geburtsdatum: 14. Januar 1974 in Karl-Marx-Stadt
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980 – 1990 POS „Wladimir-Majakowski“ in Karl-Marx-Stadt
1990 – 1992 EOS „Wladimir-Majakowski“ in Chemnitz

Zivildienst:

1993 – 1994 Klinikum Chemnitz gGmbH

Studium:

1992 – 1997 Studium am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sept. 1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Okt. 1997 – März 1998 Praktische Ausbildung in der Mohren-Apotheke Schkeuditz
April 1998 – Jan. 1999 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Synthese von 1-Aryl-5,5-dialkyl-1,2,4-triazolinen als Lipoxygenase-Hemmstoffe
Okt. 1998 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Nov. 1998 Erteilung der Approbation als Apotheker

Promotion:

seit Okt. 1998 Anfertigung der Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. P. Nuhn
Okt. 1998 – Dez. 2000 Förderung durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs des Landes Sachsen-Anhalt
seit 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle/ S., April 2003

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Guntram Drutkowski, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe erstellt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und aufgeführte Literatur benutzt und die daraus wörtlich bzw. inhaltlich zitierten Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde nur der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht, um den Doktorgrad zu erwerben.

Halle/ S., April 2003