



**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

②1 Gesuchsnummer: 90/85

⑦3 Inhaber:  
Bristol-Myers Company, New York/NY (US)

⑥2 Teilgesuch von: 6017/81

②2 Anmeldungsdatum: 17.09.1981

⑦2 Erfinder:  
Mayol, Robert F., Evansville/IN (US)  
Gammans, Richard E., Evansville/IN (US)

③0 Priorität(en): 18.09.1980 US 188184

②4 Patent erteilt: 15.10.1985

④5 Patentschrift  
veröffentlicht: 15.10.1985

⑦4 Vertreter:  
Bovard AG, Bern 25

**⑤4 Verfahren zur Bestimmung von Encainid und Metaboliten davon in biologischen Flüssigkeiten.**

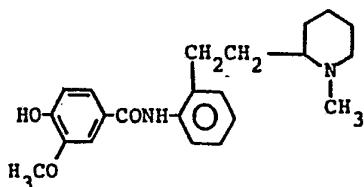
⑤7 Die quantitative Bestimmung von Encainid und den O-Demethyl- und 3-Methoxy-O-demethyl-Metaboliten davon in biologischen Flüssigkeiten erfolgt, indem die Flüssigkeit vorerst extrahiert wird. Aus dem Extrakt werden dann Encainid und die genannten Metaboliten durch Hochdruck-Flüssigchromatographie auf einer Kiesel-säuresäule unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels als mobile Phase abgetrennt. Als mobile Phase wird ein Gemisch von Aethanol/Wasser/Methansulfonsäure im Volumenverhältnis 500 : 30 : 0,1 verwendet. Das Verfahren ermöglicht einwandfreie Trennung und quantitative Bestimmung der in der biologischen Flüssigkeit vorhandenen Anteile von Encainid und den genannten Metaboliten davon.

## PATENTANSPRUCH

Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Encainid und den O-Demethyl- und 3-Methoxy-O-demethyl-Metaboliten davon in einer biologischen Flüssigkeit, durch deren Extraktion aus der Flüssigkeit und deren Abtrennung durch Hochdruck-Flüssigchromatographie auf einer Kiesel säure-säule unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels als mobile Phase, dadurch gekennzeichnet, dass man als mobile Phase ein Gemisch von Äthanol/Wasser/Methansulfonsäure im Volumenverhältnis 500:30:0,1 verwendet.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Encainid und den O-Demethyl- und 3-Methoxy-O-demethyl-Metaboliten davon in einer biologischen Flüssigkeit unter Anwendung von Hochdruck-Flüssigchromatographie.

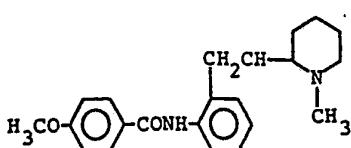
Die neue Verbindung 4-Hydroxy-3-methoxy-N-[2-[2-(1-methyl-2-piperidinyl)-äthyl]phenyl]benzamid der Formel



ist ein im Menschen vorkommender Metabolit von Encainid und hinsichtlich seiner ausgedehnten Wirkungsdauer in Beziehung auf Encainid ein verbessertes antiarrhythmisches Mittel.

Encainid-hydrochlorid ist eine antiarrhythmische Verbindung, die in der Literatur auch als «MJ 9067» bezeichnet wird («USAN And The USP Dictionary of Drug Names 1980, S. 122, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Library of Congress Catalog Card No. 72-88571»).

Encainid entspricht der Strukturformel



In den nachstehenden Veröffentlichungen sind die chemische Synthese von Encainid, einer Anzahl von Analogen davon und die antiarrhythmischen Eigenschaften dieser Verbindungen in Tieren beschrieben:

Dykstra et al., «J. Med. Chem.», 16, S. 1015-1020 (1973),  
Dykstra and Minelli, US-PS 3 931 195.

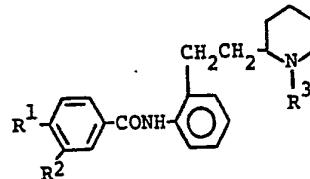
Byrne et al., «J. Pharmacology and Experimental Therapeutics», 200, S. 147-154 (1977).

Bestimmungsmethoden für Encainid und dessen Metaboliten sind in den nachstehenden Veröffentlichungen offenbart:

Mayol and Gammans, «Therap. Drug Monitoring», 1, S. 507-524 (1979) und in der US-Patentanmeldung Nr. 155 338.

Die Strukturen von Encainid und einer Anzahl Analogen davon, die in der vorstehend genannten Veröffentlichung und Patentschrift von Dykstra et al. beschrieben sind, sind in der nachstehenden Tabelle im Vergleich zur Struktur der neuen Verbindung der Formel I dargestellt. Die Numerierung der Verbindungen in der Tabelle entspricht der Numerierung der

Beispiele in der genannten Patentschrift von Dykstra. Die mit A bezeichnete Verbindung ist die neue Verbindung der Formel I.



	Verbindung Nr.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
89	(O-Demethylencainid bzw. ODE)	HO-	H-	CH <sub>3</sub>
107	(Encainid bzw. E)	CH <sub>3</sub> O-	H-	CH <sub>3</sub> -
108		H-	CH <sub>3</sub> O-	CH <sub>3</sub> -
109		CH <sub>3</sub> O-	CH <sub>3</sub> O-	CH <sub>3</sub> -
139	(N-Demethylencainid bzw. NDE)	CH <sub>3</sub> O-	H-	H-
A	(3-Methoxy-O-demethylencainid bzw. 3-Methoxy-ODE)	HO-	CH <sub>3</sub> O-	CH <sub>3</sub> -

I 25

Die Verbindungen Nrn. 89 und 139 wurden durch Mayol und Gammans (op. cit.) als Metabolite von Encainid (Verbindung Nr. 107) identifiziert, wobei das erstere mit «ODE» und das letztere als «NDE» bezeichnet wurde. Das erstere (ODE) wurde als hauptsächlicher Metabolit identifiziert, der manchmal in Plasma in Mengenanteilen vorhanden ist, die der mehrfachen Konzentration von Encainid nach Behandlung mit dem letzteren entspricht.

In der genannten Veröffentlichung von Mayol und Gammans ist eine Bestimmungsmethode für Encainid und Metaboliten davon unter Anwendung von Hochdruck-Flüssigchromatographie beschrieben, wobei Encainid und dessen Metaboliten vorerst aus einer biologischen Flüssigkeit extrahiert und dann aus dem Extrakt durch Hochdruck-Flüssigchromatographie auf einer Kiesel säure-säule unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels als mobile Phase abgetrennt werden.

Es hat sich erwiesen, dass es die in der Veröffentlichung von Mayol und Gammans beschriebene Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)-Bestimmungsmethode nicht ermöglicht, zwischen der Verbindung Nr. 89 und der Verbindung A zu unterscheiden. Es wird angenommen, dass die Verbindung A im Körper aus der Verbindung Nr. 89 durch einen biologischen Umwandlungsprozess gebildet wird.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, dieses bekannte Verfahren solcherart zu verbessern, dass es den genannten Nachteil nicht mehr aufweist.

Erfundungsgemäß wird dies dadurch erreicht, dass man als mobile Phase ein Gemisch von Äthanol/Wasser/Methansulfonsäure im Volumenverhältnis 500:30:0,1 verwendet.

Als Resultat des erfundungsgemäßen Verfahrens wurde gefunden, dass die Verbindung A nach oraler Verabreichung von Encainid auch ein hauptsächlicher Metabolit von im Menschen vorkommendem Encainid ist und zwei oder mehr Stunden nach oraler Verabreichung einer Dosierung von 50 mg Encainid-hydrochlorid im Blutplasma in wesentlich höherer Konzentration vorhanden ist als die Verbindung Nr. 89.

## Beispiel

## Bestimmungsvorgang

A. Extraktion von biologischer Flüssigkeit. In einem Reagensglas mit Schraubverschluss werden zu 1 ml Plasma oder Urin 0,2 ml 0,5 M tris-HCl-Puffer (2-Amino-2-hydroxyme-

thyl-1,3-propandiol), pH-Wert 8,5, und 10 ml 5 Vol.-% Isopropanol enthaltendes n-Butylchlorid gegeben. Dann wird das Muster in einem Schüttelmischer geschüttelt und anschließend zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Ein aliquoter Teil von 9 ml der organischen Schicht wird entnommen und unter Stickstoffstrom zur Trockene verdampft und der Rückstand erneut in 100 µl Äthanol gelöst. Ein aliquoter Teil von 50 µl der erhaltenen Lösung wird in die Säule für Hochdruckflüssigchromatographie eingespritzt.

B. Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)-Bedingungen. Es wird eine mit einem auf 254 nm Wellenlänge eingestellten UV-Detektor variabler Wellenlänge ausgerüstete Normalphasen-Kieselsäuresäule von 3,9 mm Durchmesser und 30 cm Länge verwendet. Die eingesetzte mobile Phase besteht aus 500 ml Äthanol, 30 ml Wasser und 0,1 ml Methansulfonsäure, und deren Durchflussrate beträgt 1 ml/min. Eine Reihe von Standardmustern, enthaltend 0, 25, 100 bzw. 500 ng/ml jeder der zu prüfenden Verbindungen in gesammeltem menschlichem Plasma, wird hergestellt. Diese Standardmuster wurden behandelt, wie vorstehend beschrieben. Die Quantifizierung der Detektorausschläge wurde durch digitale

Integration oder Messung von Peakhöhen erreicht. Die Standardkurve für jede Komponente wurde durch lineare Regression des Detektorausschlags gegen Konzentration der Plasma-Standardmuster konstruiert. Von diesen Kurven wurde dann die Konzentration der Verbindung im jeweiligen Muster interpoliert.

C. Resultate. Die relative Größenordnung der Eluierung von Encainid und dessen O-Demethyl- und 3-Methoxy-O-demethyl-Metaboliten aus der Säule und deren Retentionsdauer waren die folgenden: Verbindung Nr. 89 8,3 min; Verbindung A 9,7 min; Verbindung Nr. 107 11,4 min. Die letzte, aus der Säule eluierte, endogene Plasmakomponente hat eine Retentionsdauer von 3,6 min und die Basislinie war im Bereich, in welchem die Metaboliten eluieren, sehr stabil. Es erscheint somit keine Interferenz der endogenen Plasmakomponenten. Aufgrund unterschiedlicher Extraktionswirksamkeit, spezifischer molarer Absorptivität und Retentionsdauer für die einzelnen Komponenten ist die Empfindlichkeit der Prüfung für jede dieser Komponenten folgendermassen: Verbindung Nr. 89 10 ng/ml; Verbindung A 20 ng/ml; Verbindung Nr. 107 15 ng/ml.