

**Untersuchungen zur stereospezifischen Pharmakokinetik
und Metabolismus von Phenprocoumon bei
Erwachsenen und zu Pharmakokinetik und Metabolismus
von Piritramid bei Kindern mittels LC-MS-Kopplung**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Rainer Kahlich

Die experimentelle Anleitung der Dissertation erfolgte durch Dr. B. Kammerer am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie und am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Zeitraum Oktober 2001 bis März 2005.

Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2005

Dekan	Prof. Dr. S. Laufer
1. Gutachter	Prof. Dr. S. Laufer
2. Gutachter	Prof. Dr. C.H. Gleiter

Mein besonderer Dank gilt...

... an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer für die Betreuung der Dissertation und für sein offenes Ohr auch für darüber hinausgehende Belange.

... Herrn Prof. Dr. C. Gleiter und Herrn Dr. B. Kammerer von der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die Ermöglichung einer interessanten Arbeit an einer pharmazeutisch-medizinischen Schnittstelle, Herrn Gleiter insbesondere für die Übernahme des Zweitgutachtens.

... für anregende Diskussionen, Unterstützung bei fachlichen Problemen, (für den Apfelsaft) und für die gemeinsame Zeit in Tübingen meinen Laborkollegen und MitdotorandInnen Antje Frickenschmidt, Holger Scheible und Dino Bullinger.

... meiner Kollegin Apothekerin Dr. Ursula Delabar für ihre versierte Hilfe bei HPLC-technischen Problemen und viele anregende Konversationen.

... meiner Kollegin aus der Abteilung Klinische Pharmakologie, Frau Barbara Proksch, für ihre Starthilfe und auch anschließende tatkräftige Unterstützung in Sachen Probenextraktion, für viele hilfreiche kritische Anmerkungen und ihre erfrischende Art.

... Frau Dr. Lusine Danielyan und Christina Schneider für ihre wertvolle freundschaftliche und moralische Unterstützung auch und vor allem in schwierigen Momenten.

... Herrn PD Dr. Klaus Mörike aus der Abt. Klinische Pharmakologie für viele fachliche Anregungen und die kritische Begutachtung pharmakokinetischer Daten.

... Frau Dr. Christine Jäggle und Frau Dr. Gabriele Böhmer für die Mithilfe bei der Beschaffung von Plasma- und Urinproben aus dem Klinikum.

... ebenso Frau cand. med. Eva Dessecker für die Organisation der Piritramid-Studie und die Beschaffung der Patientenproben.

... Frau Katharina Bauer, Herrn Gerd Helms, Herrn Holger Kahnt und den Mitdotoranden des Arbeitskreises von Prof. Laufer am Institut für Pharmazeutische Chemie für die gemeinsame Zeit und die Unterstützung in vielen praktischen Angelegenheiten.

... allen weiteren Mitarbeitern des AK Prof. Laufer und der Abteilung Klinische Pharmakologie, die Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben und hier nicht namentlich erwähnt sind.

... Herrn Dr. Jürgen Meier-Rosenkranz für seine anregenden Ideen bei der Umsetzung der Säulenkopplung für die Analyse der Phenprocoumon-Metabolite.

... Herrn Graeme Nicholson für die FT-ICR-MS Messung des Dehydro-Piritramid-Metaboliten.

... Herrn Dr. Mike Ufer für die kritische Auseinandersetzung mit mehreren Phenprocoumon-bezogenen Publikationsentwürfen und die Einbringung seines umfangreichen Wissens zum Thema Antikoagulantien.

... meinen Apotheker-Kollegen Zita und Ted Driesler für die motivierenden Worte zur richtigen Zeit.

... meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Hilfe und viel Geduld.

... vor allem und zu guter Letzt meiner zukünftigen Frau Alexandra für ihre Liebe und rückhaltlose Unterstützung.

Für

Alexandra
und
meine Familie

Teile dieser Dissertationsschrift und darüber hinausgehende Arbeiten wurden in der folgenden Form veröffentlicht:

Publikationen

- 1 **Determination of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma by enantioselective liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry**
B. Kammerer, R. Kahlich, M. Ufer, S. Laufer, C. H. Gleiter, Rapid Commun.Mass Spectrom. 18 (2004) 458-464.
- 2 **Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers**
J. Kirchheiner, M. Ufer, E. C. Walter, B. Kammerer, R. Kahlich, C. Meisel, M. Schwab, C. H. Gleiter, A. Rane, I. Roots, J. Brockmoller, pharmacogenetics 14 (2004) 19-26.
- 3 **Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-hydroxylation in vitro and in vivo**
M. Ufer, B. Kammerer, R. Kahlich, J. Kirchheiner, Ü. Ysar, J. Brockmoller, A. Rane, Xenobiotica 34 (2004) 847-859.
- 4 **Mass spectrometric pathway monitoring of secondary metabolites: systematic analysis of culture extracts of Streptomyces species**
B. Kammerer, R. Kahlich, S. Laufer, S. M. Li, L. Heide, C. H. Gleiter, Anal.Biochem. 335 (2004) 17-29.
- 5 **CloR, a bifunctional non-heme iron oxygenase involved in clorobiocin biosynthesis**
F. Pojer, R. Kahlich, B. Kammerer, S. M. Li, L. Heide, J.Biol.Chem 278 (2003) 30661-30668.
- 6 **CloN2, a novel acyltransferase involved in the attachment of the pyrrole-2-carboxyl moiety to the deoxysugar of clorobiocin**
H. Xu, R. Kahlich, B. Kammerer, L. Heide, S. M. Li, Microbiology 149 (2003) 2183-2191.
- 7 **Quantitative determination of Piritramide in human plasma and urine by off- and on-line solid phase extraction LC-MS/MS**
Kahlich, R., Laufer, S., Gleiter, C. H., Kammerer, B.; submitted to Therapeutic Drug Monitoring
- 8 **Achiral-chiral LC/LC-MS/MS coupling for determination of chiral discrimination effects in phenprocoumon metabolism**
Kammerer, B., Kahlich, R., Ufer, M., Laufer, S., Gleiter, C.H.; Analytical Biochemistry, 2005 (in press)

Posterpräsentationen

- 1 **Chiral analysis of phenprocoumon and its metabolites by one- and two-dimensional LC-MS/MS**
Kahlich, R., Laufer, S., Gleiter, Ch., Kammerer, B.
Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft – Herbsttagung 2003, Regensburg
- 2 **Identification of new Piritramid Metabolites in Human Urine and Human Liver Microsomes by LC-MSⁿ**
Rainer Kahlich, Christoph H. Gleiter, Stefan Laufer, Bernd Kammerer
American Society for Mass Spectrometry Conference, Nashville, Tennessee, 2004
- 3 **Mass-spectrometric elucidation of piritramide metabolites by LC-ion-trap MSⁿ-technology**
R. Kahlich, C.H. Gleiter, S. Laufer, B. Kammerer
6th Annual Congress of Clinical Pharmacology, Nov. 4-6 2004, Stuttgart, Germany Abstrakt erschienen in: International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 42 (11), Nov. 2004, p. 614

Diese Dissertation wurde unter Einbeziehung der Publikationen 1, 7 und 8 in semikumulativer Form erstellt.

Inhaltsverzeichnis

1	VORWORT UND ZUSAMMENFASSUNG	1
2	PHENPROCOUMON – CYP2C9 ABHÄNGIGE PHARMAKOKINETIK UND METABOLISMUS	3
2.1	Einleitung	3
2.1.1	Pharmakodynamik und Indikationen von Phenprocoumon	3
2.1.2	Pharmakokinetik und Vergleich mit Warfarin	4
2.1.3	Bedeutung des CYP2C9-Genotyps	6
2.1.4	Problemstellung	6
2.2	Stereoselektive LC-MS/MS-Analytik von Phenprocoumon aus Plasma	7
2.2.1	Übersicht über publizierte Methoden	7
2.2.2	Probenvorbereitung	9
2.2.3	Chromatographische Trennung	9
2.2.4	MS-Detektion	10
2.2.5	Methodenvalidierung	12
2.3	Untersuchung der Plasmaproben der klinischen Studie	15
2.3.1	Studiendesign und Probennahme	15
2.3.2	Enantiospezifische pharmakokinetische Auswertung	15
2.3.3	Diskussion der Ergebnisse	20
2.4	Stereoselektive LC-LC-MS/MS-Analytik der Phenprocoumon-Metabolite aus Plasma	21
2.4.1	Problemstellung	21
2.4.2	Probenvorbereitung	22
2.4.3	MS-Detektion	23
2.4.4	Methodenentwicklung: Achiral-chirale chromatographische Trennung mittels zweidimensionaler HPLC-MS-Kopplung	24
2.4.5	Methodenvalidierung	31
2.4.6	Diskussion	36
2.5	Untersuchung der Metabolite in Probandenplasmaproben mittels LC-LC-MS/MS-Kopplung	36
2.5.1	Identifizierung neuer Metabolite	36
2.5.2	Enantiospezifische pharmakokinetische Auswertung	43
2.5.3	Diskussion	47
3	PIRITRAMID – PHARMAKOKINETIK UND METABOLISMUS BEIM KIND UND ERWACHSENEN	51
3.1	Einleitung	51
3.1.1	Pharmakodynamik	51

3.1.2	Pharmakokinetik: Stand des Wissens	52
3.1.3	Problemstellung	52
3.2	LC-MS-Analytik von Piritramid aus Plasma und Urin	53
3.2.1	Übersicht über publizierte Analytik	53
3.2.2	Probenvorbereitung	53
3.2.3	Chromatographische Trennung	55
3.2.4	MS-Detektion	59
3.2.5	Methodenvalidierung	60
3.2.6	Vergleich der Plasma- und Urinmethode	66
3.3	Messung der Piritramid-Studienproben	67
3.3.1	Studiendesign und Probennahme	67
3.3.2	Pharmakokinetische Auswertung	68
3.3.3	Vergleich Altersgruppe 1 und 2	72
3.3.4	Pharmakokinetisches Modell für iv-Bolusgabe	74
3.3.5	Vergleich zwischen Kindern und Erwachsenen	77
3.3.6	Diskussion	79
3.4	Metabolismus von Piritramid	82
3.4.1	LC-MS-Metaboliten-Screening in Human- und Rattenleber- mikrosomenproben, Humanplasma und –urin	82
3.4.2	Strukturaufklärung mittels ESI-MS	86
3.4.3	Diskussion	98
4	EXPERIMENTELLER TEIL	101
4.1	Determination of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma by enantioselective liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry	101
4.2	Achiral-chiral LC/LC-MS/MS-coupling for determination of chiral discrimination effects in phenprocoumon metabolism	115
4.3	Quantitative determination of Piritramide in human plasma and urine by off- and on-line solid phase extraction LC-MS/MS	140
4.4	Piritramid: Metabolitenidentifizierung	157
4.4.1	Chemikalien, Materialien, Geräte und Proben	157
4.4.2	Rattenlebermikrosomenpräparation	159
4.4.3	Mikrosomeninkubation	160
4.4.4	Probenvorbereitung	161
4.4.5	HPLC-triple-quadrupol-MS-Analytik	163
4.4.6	HPLC-Ionenfallen-MS-Analytik	166
4.4.7	MS-Spektren	167
5	LITERATUR	177

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AUC	Area under the curve
CID	Collision induced fragmentation
CL	Gesamtkörperclearance
C_{max}	(Plasma-) Maximalkonzentration
ESI	Electrospray-Ionisation
FM	schneller Metabolisierer (fast metaboliser)
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IM	intermediärer Metabolisierer
IS	Interner Standard
LLE	Liquid-Liquid-Extraction
LLOQ	Lower Limit of Quantification (untere Bestimmungsgrenze)
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
NCA	non-compartmental analysis
PK	Pharmakokinetik
PM	langsamer Metabolisierer (poor metaboliser)
PPC	Phenprocoumon
QC's	Quality-Control (Samples) Proben
S/N	Signal to Noise
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SPE	Solid-Phase-Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
t_{1/2}	Halbwertszeit
t_{max}	Zeit bis zum Erreichen der Maximalkonzentration
λ_z	terminale Eliminationskonstante

1 Vorwort und Zusammenfassung

Die Kopplung chromatographischer Trennmethode mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS, seit ca. 1960 [1] und HPLC-ESI- bzw. -APCI-MS, seit ca. 1980 [2]) stellt ein leistungsfähiges Werkzeug sowohl für strukturelle als auch quantitative Fragestellungen dar. Die Bedeutung der HPLC-MS-Kopplung für die Analytik von Makromolekülen und "kleinen" Molekülen wie Arzneistoffen verdeutlicht die Suche nach den Begriffen "HPLC-MS" und "LC-MS" in Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), die allein für das Jahr 2004 3477 Treffer liefert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die HPLC-Triple-Quadrupol-MS- und HPLC-Ion-Trap-MS-Kopplung für pharmakokinetische Untersuchungen und Metabolitenauflärung des Antikoagulans Phenprocoumon (Marcumar[®]) und des Opioid-Analgetikums Piritramid (Dipidolor[®]) angewendet. Eine ausführliche Auseinandersetzung mit diesen Techniken und deren Anwendung auf klinisch-chemische Fragen findet sich in der Fachliteratur (z.B. [3-7]).

Es wurde eine LC-Triple-Quadrupol-MS-Methode mit vorangehender konventioneller Festphasenextraktion für die stereoselektive Messung von Phenprocoumon aus Humanplasma entwickelt und eine Methodvalidierung durchgeführt. Die Methode umfasst einen linearen Messbereich von 62.5-1000 ng/ml (pro Enantiomer) bei einer Wiederfindungsrate von >89 % und einer Präzision von 3.24-7.01 % (Variationskoeffizient) sowie einer Richtigkeit von -9.04 - +3.02 %. Anhand der Plasmakonzentrationswerte von Cytochrom-P-450-2C9-genotypisierten Probanden konnte gezeigt werden, dass der CYP2C9 Genotyp auf die stereospezifische Pharmakokinetik von Phenprocoumon im Gegensatz zu Warfarin keinen signifikanten Einfluss hat.

Mittels HPLC-Ion-Trap-MS-Messungen konnten zwei weitere Phenprocoumon-Metabolite identifiziert werden: 2'-OH-Phenprocoumon und ein aliphatisch hydroxylierter Metabolit. Stereoselektive Messungen der fünf Phenprocoumon-Metabolite mit Hilfe einer zweidimensionalen HPLC-MS-Kopplungstechnik zeigten, dass alle Metabolite stereoselektiv, meist mit einem deutlichen (R)-Enantiomer-Überschuss, gebildet werden und für die neu entdeckten Metabolite – im Gegensatz zu den bekannten - keine Abhängigkeit vom CYP2C9-Genotyp vorliegt.

Für die Messung von Piritramid aus Humanplasma bzw. -urin wurde eine off-line-SPE-LC-MS/MS- bzw. on-line-SPE-LC-MS/MS-Methode entwickelt und validiert. Die Methode ist linear im Bereich von 0.5-100 ng/ml, das LOD liegt bei ca. 0.05 ng/ml. Hinsichtlich Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Wiederfindung (>90 %), Matrixeinflüssen und Probenstabilität erfüllt sie die für bioanalytische Assays geltenden Anforderungen.

Die pharmakokinetischen Parameter C_{\max} , t_{\max} , AUC_{0-180} und $t_{1/2}$ wurden bei 25 Kindern im Alter von 6.4-43.6 Monaten ermittelt. Die C_{\max} -Werte von Piritramid betragen 35.4 ± 8.9 ng/ml (Mittelwert \pm SD), t_{\max} 7.0 ± 4.2 min, die AUC_{0-180} 2600.3 ± 617.8 min*ng/ml und $t_{1/2}$ 188.6 ± 62.4 min. Die pharmakokinetische Kompartiment-Analyse ergab für die einmalige iv-Bolusgabe von 0.1 mg/kg KG Piritramid für das Zweikompartiment-Modell die beste Anpassung. Außer für die dosisnormierte AUC_{0-180} gab es zwischen den zwei Altersgruppen (6.4-12.2 und 17.1-43.6 Monate) keine signifikanten PK-Unterschiede.

Die Pharmakokinetik-Daten der Kinder-Studienpopulation wurden mit Daten einer früheren Studie mit erwachsenen Patienten verglichen. Dabei ergaben sich für die Auswertung bis sechs Stunden nach Dosisgabe im Wesentlichen Unterschiede für das zentrale Verteilungsvolumen (Kinder: 2.1 l/kg, Erwachsene: 1.4 l/kg) und die Halbwertszeit für die zweite (höchstwahrscheinlich noch nicht terminale) Eliminationsphase (Kinder: ca. 3 h, Erwachsene: ca. 4,5 h).

Insgesamt konnten acht Piritramid-Metabolite aus Rattenlebermikrosomeninkubat identifiziert werden, von denen sechs auch in Humanurin- und -mikrosomenproben vorhanden sind. Dabei handelt es sich um drei Dihydroxy-, vier Monohydroxy- und einen Dehydro-Piritramid-Metaboliten. Mittels ESI-Ion-Trap-MS konnten die hydroxylierten Regionen im Molekül eingegrenzt, wenn auch letztlich nicht vollständig strukturell aufgeklärt werden. Nach den vorliegenden Daten liegen zwei aromatische Hydroxylierungen sowie im endständigen Piperidinring eine N-Oxidierung oder eine Hydroxylierung in α -Position zum Stickstoff und im gleichen Ring eine Dehydrogenierung vor.

2 **Phenprocoumon – CYP2C9 abhängige Pharmakokinetik und Metabolismus**

2.1 **Einleitung**

2.1.1 **Pharmakodynamik und Indikationen von Phenprocoumon**

Phenprocoumon ist wie die anderen 4-Hydroxycoumarin-Derivate Warfarin und Acenocoumarol (Abb. 2.1) ein indirekt wirkendes Antikoagulans, das durch kompetitive Hemmung der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und möglicherweise auch der Vitamin-K-Reduktase zu einer Akkumulation von Vitamin-K-Epoxid und einer Verringerung der reduzierten Form von Vitamin K in der Leber führt. In der Folge steht dieses nicht mehr als Coenzym für die Carboxylase zur Verfügung, die für die γ -Carboxylierung von Glutaminsäureresten der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X sowie Protein C und Protein S benötigt wird [8] (Schema siehe Abb. 2.2). Es entstehen somit nur noch inaktive Vorstufen. Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen zählen solche, die sich aus dem pharmakologischen Hauptwirkungsmechanismus ergeben, insbesondere Zahnfleischbluten, Mikrohämaturien, Nasenbluten, Hämatome, Blutungen im Magen-Darm-Trakt. Seltener treten Übelkeit, Urtikaria, reversible Alopecia diffusa, Dermatitis oder Gewebsnekrosen (sog. Coumarin-Nekrosen) auf [9,10]. Anwendungsgebiete sind die Langzeittherapie und Prophylaxe von venösen und arteriellen Thrombosen und Embolien sowie die Langzeittherapie des Herzinfarkts bei erhöhtem Risiko von thromboembolischen Komplikationen [9]. Die Therapiekontrolle erfolgt über die Messung der Gerinnungsparameter (Prothrombinzeit bzw. International Normalized Ratio INR).

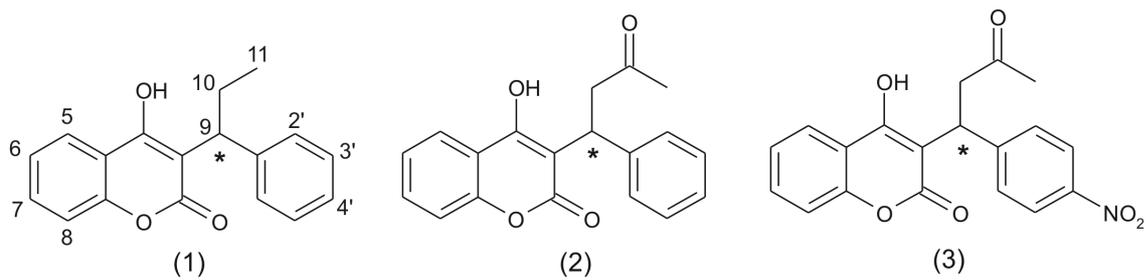


Abb. 2.1: Strukturformeln von (1) Phenprocoumon, (2) Warfarin und (3) Acenocoumarol

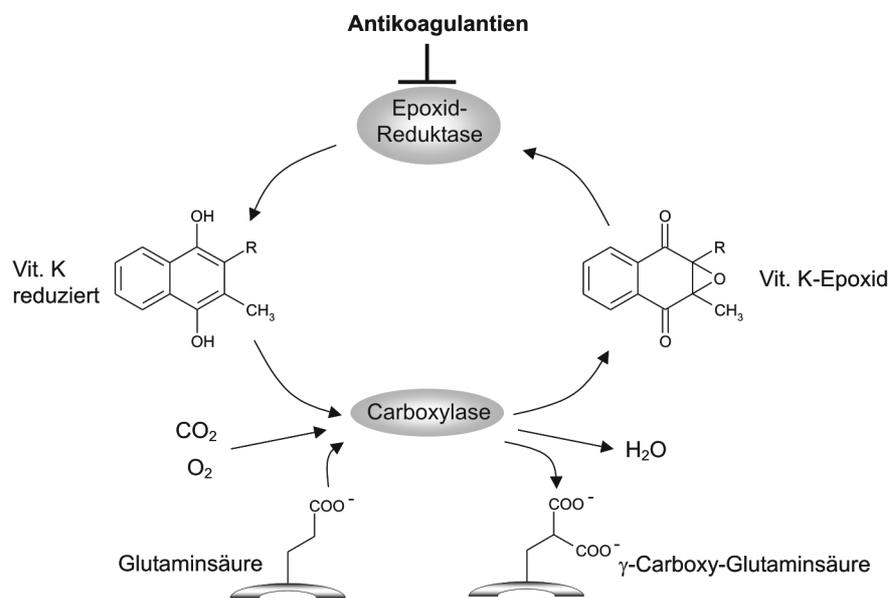


Abb. 2.2: Der Vitamin-K-Zyklus, schematisiert (nach [11])

2.1.2 Pharmakokinetik und Vergleich mit Warfarin

Alle drei genannten Antikoagulantien haben die gleiche Wirkung auf den Vitamin-K-Stoffwechsel, sie unterscheiden sich alleine in ihrer Pharmakokinetik. Die kürzeste Halbwertszeit besitzt Acenocoumarol mit 3-6 h, gefolgt von Warfarin mit 30-40 h und Phenprocoumon mit der längsten HWZ von 90-140 h [12]. Sowohl Warfarin als auch Phenprocoumon scheinen eine hohe orale Bioverfügbarkeit (>90 %) aufzuweisen, spezielle Untersuchungen hierzu liegen allerdings nicht vor [9]. Die Plasmaproteinbindung beträgt für beide Substanzen ca. 99 % (v.a. gebunden an Plasmaalbumin) [10].

Sowohl Phenprocoumon (PPC) als auch Warfarin werden als racemische Gemische therapeutisch eingesetzt, obwohl ihre Enantiomere weder pharmakodynamisch noch –kinetisch identisch sind: Die (S)-Enantiomere haben sowohl bei Warfarin als auch bei Phenprocoumon eine ausgeprägtere gerinnungshemmende Wirkung [13]. (S)-Phenprocoumon ist 1.5 bis 2.5 mal so wirksam wie das (R)-Enantiomer. Die Plasmaproteinbindung ist für (S)-PPC in vitro ca. doppelt so hoch wie für (R)-PPC, das Verteilungsvolumen (97-120 ml/kg für (S)-PPC und 118-170 ml/kg für (R)-PPC) und die Plasmaclearance (8.9-17.7 ml/kg/d für (S)-PPC und 9.1-25.1 ml/kg/d für (R)-PPC) hingegen etwas niedriger [14]. Warfarin und Phenprocoumon werden hepatisch metabolisiert. Warfarin unterliegt einer Hydroxylierung an den Positionen 4', 6, 7 und 8 des Coumarinkerns sowie einer Reduktion der Ketogruppe zum Alkohol [15-17], Phenprocoumon wird in 4'-, 6-, 7- und 8-Position hydroxyliert (siehe Abb. 2.3) [18]. Die Hauptausscheidungsprodukte sind bei Phenprocoumon unverändertes (R)-Enantiomer im Urin und (R)-4'-OH-Phenprocoumon im Stuhl, bei Warfarin (S)-7-OH-Warfarin im Urin, unmetabolisiertes Warfarin wird praktisch nicht renal ausgeschieden [10]. Phenprocoumon wird zu ca. 63 % im Urin ausgeschieden, sowohl als Muttersubstanz als auch als Metabolite, vorwiegend konjugiert; ca. 33 % der Dosis finden sich in den Faeces wieder. Von der gesamten eliminierten Dosis macht Phenprocoumon (konjugiert und unkonjugiert) noch ca. 40 % aus, die restliche eliminierte Menge (ca. 60 %) setzt sich aus den drei Metaboliten 4'-, 6- und 7-OH-PPC zusammen [18].

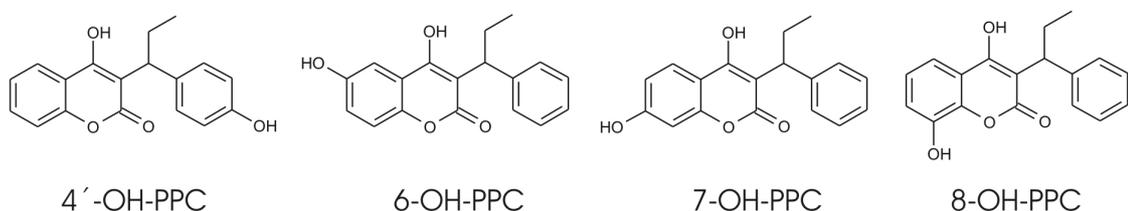


Abb. 2.3: Strukturformeln der bekannten monohydroxylierten Phenprocoumon-Metabolite

2.1.3 Bedeutung des CYP2C9-Genotyps

Die Metabolisierung der Antikoagulantien Phenprocoumon, Warfarin und Acenocoumarol zu hydroxylierten Verbindungen erfolgt über das Cytochrom-P-450 Enzymsystem [19-21]. Die Metabolisierung von Warfarin läuft dabei in hohem Maße stereoselektiv ab, (S)-Warfarin wird hauptsächlich über CYP2C9, (R)-Warfarin über CYP1A2, 2C19 und 3A4 abgebaut [21-23]. Für Acenocoumarol konnte ebenfalls CYP2C9 als metabolisierendes Enzym für beide Enantiomere identifiziert werden, hier wirken sich CYP2C9-Polymorphismen auf den Dosisbedarf und die Stabilität der Antikoagulation aus [24-28]. Im Falle von Phenprocoumon konnte zwar in-vitro gezeigt werden, dass CYP2C9 bei der Metabolisierung v.a. von (S)-Phenprocoumon eine Rolle spielt [19,29], allerdings ist über die pharmakokinetischen Auswirkungen in-vivo und die klinischen Implikationen wenig bekannt.

CYP2C9 tritt nach bisherigem Wissen bei der kaukasischen Bevölkerung in drei polymorphen Formen auf: 1) Wildtyp (CYP2C9*1, Allelfrequenz bei Kaukasiern: 82 %), 2) Arg144Cys-Mutante (CYP2C9*2, 11 %), 3) Ile359Leu-Mutante (CYP2C9*3, 7 %) [30]. Gegenüber dem Wildtyp zeigen die beiden anderen Formen eine geringere (S)-Warfarin-Hydroxylierungs-Aktivität, die sich klinisch in einem höheren Risiko für Blutungskomplikationen bzw. niedrigerem Dosisbedarf niederschlägt [31-33].

2.1.4 Problemstellung

Im Rahmen einer klinischen Probandenstudie (in Kooperation mit dem Institut für Klinische Pharmakologie – Charité (Berlin), dem Dpt. of Laboratory Medicine – Division of Clinical Pharmacology (Karolinska Institute, Stockholm, Schweden), dem Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie (Stuttgart) und der Abteilung für Klinische Pharmakologie – Georg-August-Universität (Göttingen)), veröffentlicht von Kirchheiner et al. [34], sollte der Einfluss des CYP2C9-Genotyps bei gesunden Probanden auf die stereospezifische Pharmakokinetik von Phenprocoumon nach einmaliger oraler Gabe von

12 mg des Racemats untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, ob sich im Bezug auf die PK-Parameter (v.a. AUC) zwischen Trägern verschiedener Allelvarianten Unterschiede ergeben, wie dies aufgrund der Strukturhomologie zu Warfarin zu erwarten wäre. Erste Zielgröße hierfür ist die Plasmakonzentration von (R)- und (S)-Phenprocoumon zu jedem Abnahmezeitpunkt. Zu diesem Zweck wurde eine LC-MS/MS-Methode zur stereospezifischen Quantifizierung von Phenprocoumon aus Plasma entwickelt und validiert.

2.2 Stereoselektive LC-MS/MS-Analytik von Phenprocoumon aus Plasma

2.2.1 Übersicht über publizierte Methoden

Phenprocoumon ist seit über 40 Jahren im Handel und besitzt zumindest im europäischen Raum eine herausragende Rolle in der Antikoagulationstherapie. Dementsprechend viele analytische Verfahren, stereoselektiv wie nicht stereoselektiv, zur Bestimmung in verschiedenen biologischen Proben (Blut, Plasma, Serum, Urin, Muttermilch) wurden bereits veröffentlicht. Eine kurze Übersicht gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 2.1: Übersicht über bioanalytische Methoden zur Bestimmung von Phenprocoumon

Messmethode	Matrix	linearer Bereich; LOD	stereoselektiv ?	Literatur
Fluorimetrie	Plasma	nicht angegeben (ca. 0.2-5 µg/ml)	-	[14]
DC-Fluoreszenz	Plasma	0.5-3 µg/ml LOD: 0.1 µg/ml	-	[35]
DC-Fluoreszenz	Plasma	0.005-10 µg/ml LOD: 5 ng/ml	-	[36]
HPLC-Fluoreszenz	Plasma, Urin	0.01-2.6 µg/ml	-	[37]
HPLC-Fluoreszenz	Plasma	2-10 µg/ml LOD: 20 ng/ml	-	[38]
HPLC-Fluoreszenz	Serum, Serumwasser	0.1-10 mg/l LOD: 0.5 µg/l	-	[39]
HPLC-UV+Fluoreszenz	Plasma, Urin, Muttermilch	0.2-5 µg/ml (Plasma), LOD 0.1 µg/ml 0.1-1.0 µg/ml (Urin), LOD 0.05 µg/ml 0.02-0.1 µg/ml (Milch), LOD 5 ng/ml	-	[40]

HPLC-UV+Fluoreszenz	Plasma, Urin	0.1-4.0 µg/ml (Plasma) 0.05-2.0 µg/ml (Urin) LOD: 50 ng/ml	st.sel.	[41]
HPLC-UV+Fluoreszenz	Lösungsmittel	qualitativ	st.sel.	[42]
HPLC-UV+Fluoreszenz, GC-MS	Urin	qualitativ	-	[43]
HPLC-UV	Urin	25-500 ng/ml LOD: 8 µg/ml	-	[44]
HPLC-UV	Plasma, Urin	0.1-5 µg/ml LOD: 0.1 µg/ml in Plasma; 0.02 µg/ml in Urin	-	[45]
HPLC-UV	Plasma	15-2200 ng/ml LOD: 5 ng/ml	st.sel.	[46]
GC-MS	Mikrosomen-inkubat	10-2000 ng/ml LOD: 20 ng/ml	-	[47]
HPLC-ESI-MS (neg. mode)	Plasma, Urin	0.04-10 µM LOD: < 40 nM	-	[48]
HPLC-MS/MS	Plasma	50-4000 ng/ml LOD: 1 ng/ml	-	[49]
HPLC-TSP-MS	Plasma, Urin	0-5 µg/ml LOD: 5 ng/ml	-	[50]
Kapillarelektrophorese-UV/LIF	Urin	0.2-20 µg/ml LOD: ?	st.sel.	[51]
Kapillarelektrophorese-UV	Lösungsmittel	qualitativ	st.sel	[52]

Von den 19 aufgelisteten Methoden beschreiben nur fünf die stereoselektive Analyse von Phenprocoumon, zwei davon lediglich auf qualitativer Stufe. Die hier neu entwickelte HPLC-MS Methode [53] vereinigt gleich mehrere Vorteile bereits publizierter Arbeiten: 1) Die Enantiomerentrennung erfolgt mittels einer stationären Phase, die eine höhere Robustheit als die sonst verwendeten Dextran- oder Protein-basierten stationären Phasen besitzt (über 1000 Injektionen ohne Anzeichen auf Verschleiß); 2) Verwendung eines Eluentensystems, das sich für die ESI-MS-Detektion und damit die Gewinnung von Strukturinformationen eignet; 3) Hohe Spezifität, gute Sensitivität und breiter linearer Messbereich durch die SRM-Detektion trotz einer Probenvorbereitung (SPE), die deutlich schneller und unkomplizierter durchzuführen ist als die sonst meist verwendete Flüssigflüssig-Extraktion.

2.2.2 Probenvorbereitung

Aus der Fülle der bereits publizierten Methoden zur Extraktion von Phenprocoumon aus biologischen Flüssigkeiten wurden einige getestet, wobei sich aber bald zeigte, dass zum einen Methoden, die bei nicht-stereoselektiver Analyse gute Ergebnisse lieferten, nicht zwangsläufig auch bei chiraler HPLC-Trennung für eine zufriedenstellende Probenreinheit sorgten, und zum anderen, dass die Festphasenextraktion - sowohl was den zeitlichen Aufwand als auch die Extraktionsausbeute anbelangt - der Flüssig-Flüssig-Extraktion meist überlegen ist. Mit einer von McAleer et al. [54] veröffentlichten, leicht modifizierten SPE-Methode unter Verwendung von Octadecyl-Silan-Kartuschen wurden die besten Ergebnisse erzielt. Diese Methode wurde daher für die nachfolgende Methodvalidierung und die Messung der Studienproben angewendet.

2.2.3 Chromatographische Trennung

Auf einer Chira-Grom 2 Säule wurde eine Basislinientrennung der beiden Phenprocoumon- und Warfarin-(=IS)-Enantiomere bei isokratischer Elution mit Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (48/52/0.1) erreicht. Hierbei handelt es sich um Silica-Material, an das kovalent chirale Polymere gebunden sind (nähere Angaben unterliegen dem Firmengeheimnis). Der Trennungsmechanismus beruht bei diesem Typ von stationärer Phase auf π - π -, Wasserstoffbrücken-, Dipol-Dipol- und Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und dem chiralen Selektor sowie Einschlüsse in Hohlräume (ähnlich denen bei Cellulose- und Amylose-Phasen) [chirale stationäre Phase Typ II nach Wainer; Dr. J. Meier-Rosenkranz, Fa. Grom Analytik, Rottenburg – persönl. Mitteilung]. Der besondere Vorteil besteht darin, dass die Säule unter Normalphasen- als auch – wie für die LC-MS-Kopplung nötig – unter Reversed-Phase-Bedingungen betrieben werden kann. Ein repräsentatives Chromatogramm findet sich in Abb. 2.4. Der erste Warfarin-Enantiomeren-Peak überlappt nur geringfügig mit Phenprocoumon und wurde daher als interner Standard für die Quantifizierung herangezogen.

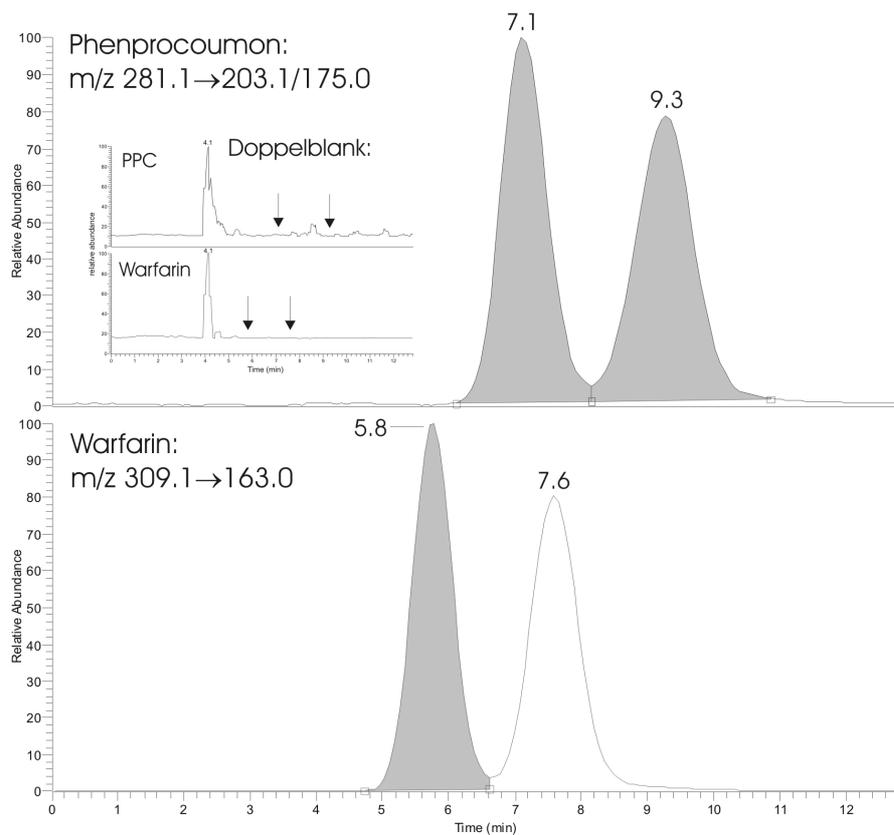


Abb. 2.4: SRM-Chromatogramme von Phenprocoumon und Warfarin am LLOQ (62.5 ng/ml pro Enantiomer und einer Doppelblank-Plasmaprobe (inneres Bild))

2.2.4 MS-Detektion

Die Detektion erfolgte im Selected Reaction Monitoring (SRM) Modus nach Ionisierung der Analyten im positiven Elektrospray-Verfahren (wie in Lit. [49,50]). Die Detektion bei Ionisierung im Negativmodus (also als Anionen) wäre prinzipiell bei Phenprocoumon und Warfarin als 1-4-vinyloge Säuren auch möglich (so wie z.B. in Lit. [48]), allerdings enthält das Laufmittel 0.5 % Ameisensäure, was die Deprotonierung und damit die Detektion in diesem Modus erschwert. Vorversuche zeigten, dass die Ionsierungseffizienz im Positivmodus mindestens gleichwertig ist. Abb. 2.5 und Abb. 2.6 zeigen die Full Scan- und MS/MS-Spektren von Phenprocoumon und Warfarin mit den postulierten Hauptfragment-

strukturen. Für die Quantifizierung wurden die Hauptionenübergänge m/z 281.1→203.1 und 175 für Phenprocoumon und m/z 309.1→163.0 für Warfarin als IS gewählt.

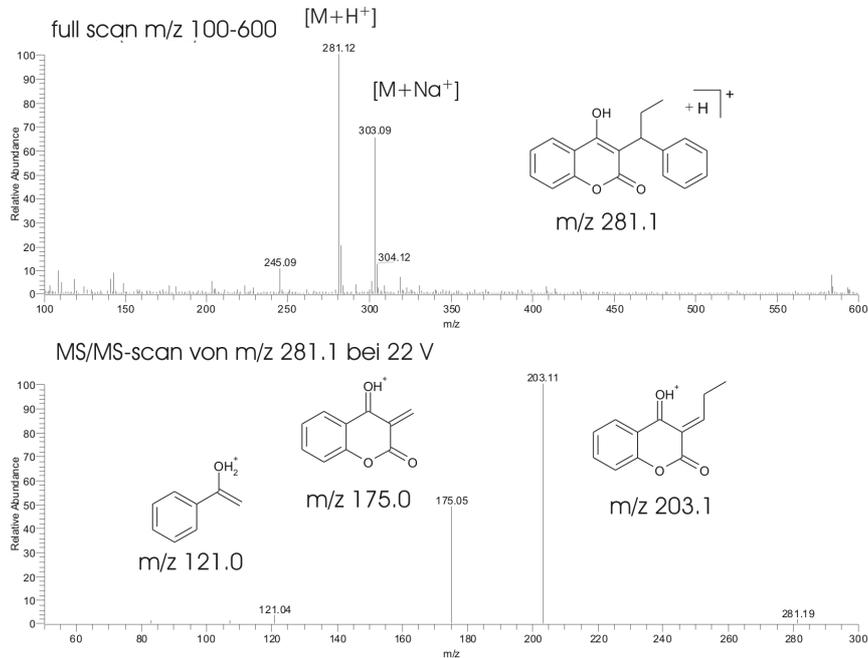


Abb. 2.5: (+)-ESI-FullScan- und MS/MS-Spektrum von Phenprocoumon mit postulierten Fragmentstrukturen

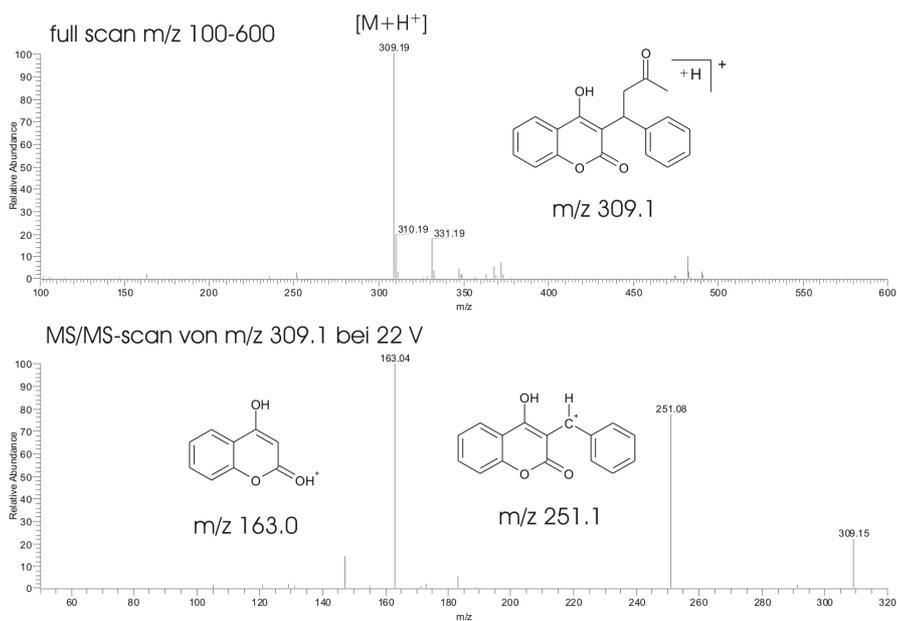


Abb. 2.6: (+)-ESI-FullScan- und MS/MS-Spektrum von Warfarin mit postulierten Fragmentstrukturen

2.2.5 Methodenvalidierung

2.2.5.1 Selektivität, LOD, Linearität

Selektivität: Mehrere Blankplasmaproben wurden analysiert ($n > 6$), ohne dass dabei Störpeaks bei der Retentionszeit von Phenprocoumon oder Warfarin Störpeaks aufgetreten wären. Detektionslimit (LOD): Das Detektionslimit mit einem S/N-Verhältnis von mind. 3:1 lag bei 12.5 ng/ml (pro Enantiomer). Bei Anwendung des S/N-Verfahrens auf die Ermittlung des unteren Quantifizierungslimits (S/N mind. 10:1) würde eine Konzentration von ca. 37.5 ng/ml resultieren. Da aber innerhalb der PK-Studie keine so niedrigen Konzentrationen zu erwarten waren, wurde die Methode innerhalb des Bereichs von 62.5-1000 ng/ml (pro Enantiomer) kalibriert und validiert. Die Kalibrierfunktion, kalkuliert mittels linearer Regression der kleinsten Fehlerquadrate, lieferte bei einer Messwert-Gewichtung von $1/x^2$ die besten Ergebnisse. Sämtliche innerhalb der Validierung ermittelten Bestimmtheitsmaße (R^2 ; $n=11$) lagen zwischen 0.988-0.999 für (R)-Phenprocoumon und 0.989-0.999 für (S)-Phenprocoumon. Keine der Kalibrierproben lag außerhalb des Akzeptanzbereichs von ± 20 % am LLOQ bzw. ± 15 % für alle anderen Konzentrationen.

2.2.5.2 Matrix-Effekte

Der Einfluss von Matrixeffekten wurde durch die Analyse von extrahierten Blankplasmaproben ermittelt, die vor der Injektion mit Phenprocoumon (62.5, 250, 1000 ng/ml; $n=3$ pro Level) und IS gespikt wurden. Diese Proben wurden gegen Standards in Methanol der gleichen Konzentrationen gemessen. Um signifikante Matrixeffekte ausschließen zu können, sollte die durchschnittliche Signal-Antwort der Proben um nicht mehr als 15 % von der der Standards abweichen (gemäß FDA guideline "Bionalytical Method Validation"). Die maximale Abweichung bei dieser Methode war 11.8 % bei 1000 ng/ml.

2.2.5.3 Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen in Dreifachbestimmung ermittelt (100, 600, 900 ng/ml pro Enantiomer). Hierfür wurden gespikete Plasmaproben extrahiert, vor der Injektion mit IS aufgestockt und gegen Standards der gleichen Konzentration mit identischer Menge an IS vermessen. Die Extraktionseffizienz ergibt sich als Verhältnis $(\text{Peakfläche Analyt} / \text{Peakfläche IS}) \times 100 / (\text{Peakfläche Standard} / \text{Peakfläche IS})$. Bei allen Konzentrationen lag die Ausbeute zwischen 89 und 104 %.

2.2.5.4 Richtigkeit und Präzision

Richtigkeit und Präzision innerhalb der Serie und zwischen verschiedenen Serien wurde getestet, indem QC-Proben bei vier verschiedenen Konzentrationen (jeweils n=6) an drei verschiedenen Tagen zusammen mit einer neuen Kalibrierreihe gemessen wurden. Richtigkeit wird ausgedrückt als mittlere Abweichung vom Sollwert, Präzision als Variationskoeffizient (CV) in Prozent. Die Ergebnisse sind für (R)- und (S)-Phenprocoumon in Tabelle 2.2 bzw. Tabelle 2.3 wiedergegeben.

Tabelle 2.2: Intra- und Interday-Richtigkeit und Präzision für (R)-Phenprocoumon

	Intraday-Richtigkeit und Präzision			Interday-Richtigkeit und Präzision
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1+2+3
100 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	7.85	1.39	-2.81	1.93
CV [%]	5.58	2.59	1.58	5.55
300 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	9.40	-5.22	-1.06	1.46
CV [%]	2.30	1.16	1.61	6.91
600 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	-1.16	-10.30	-8.68	-5.71
CV [%]	4.30	2.55	0.50	5.64
900 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	-6.96	-9.54	-8.41	-8.60
CV [%]	5.89	2.36	1.97	3.46

Tabelle 2.3: Intra- und Interday-Richtigkeit und Präzision für (S)-Phenprocoumon

	Intraday-Richtigkeit und Präzision			Interday-Richtigkeit und Präzision
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1+2+3
100 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	6.19	0.18	-1.15	2.21
CV [%]	4.89	3.28	1.08	4.52
300 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	11.09	-3.45	-0.19	3.02
CV [%]	3.05	1.40	2.01	7.01
600 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	-0.61	-9.67	-8.05	-4.93
CV [%]	4.25	2.40	1.25	5.56
900 ng/ml				
mittlere Abw. [%]	-7.73	-10.51	-8.07	-9.04
CV [%]	5.90	1.95	2.33	3.24

2.2.5.5 Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität

Einfrier-Auftau-Stabilität: Gefrorene QC-Plasmaproben (100, 300, 600, 900 ng/ml pro Enantiomer; n=3 pro Level) wurden für 1 h aufgetaut, wieder bei -25°C für 24 h eingefroren und nach dem dritten Zyklus mit einer frischen Kalibrierreihe extrahiert und gemessen. Dieselbe Anzahl an QC-Proben wurde für 6 Monate bei -25°C gelagert und anschließend

ebenfalls zusammen mit frischen Kalibrierstandards analysiert. In beiden Fällen zeigte sich kein Anzeichen von Zersetzung, d.h. kein Messwert wich um mehr als die erlaubten 15 % von der Nominalkonzentration ab.

2.3 Untersuchung der Plasmaproben der klinischen Studie

2.3.1 Studiendesign und Probennahme

In die von Kirchheiner et al. [34] durchgeführte prospektive klinische Verlaufsstudie wurden 26 gesunde Probanden (kaukasische Abstammung, 23 Männer, 3 Frauen) eingeschlossen. Die Verteilung auf die einzelnen Genotypen zeigt Tabelle 2.4.

Tabelle 2.4: Verteilung der 26 Studienprobanden auf CYP2C9-Genotypen

Genotyp CYP2C9	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Anzahl	7	4	5	3	4	3

Vor der einmaligen oralen Gabe von 12 mg racemischem Phenprocoumon (pre-dose) und zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 96 und 144 h danach wurde venöses Blut abgenommen, durch Zentrifugation jeweils der Plasmaanteil gewonnen und dieser bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Probanden erhielten zur Prophylaxe von Blutungskomplikationen einmalig je 10 mg Phytomenadion (Konaktion[®]).

2.3.2 Enantiospezifische pharmakokinetische Auswertung

Alle Proben konnten gemessen werden, ohne dass unerwartete oder nicht erklärbare Störungen bei den Probandenproben selbst, den Kalibrierstandards oder Qualitätskontrollproben aufgetreten wären. Keiner der Messwerte lag außerhalb des Kalibrierbereichs von 62.5 – 1000 ng/ml pro Enantiomer.

Die enantiospezifischen Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven für die einzelnen Genotypen jeweils für (R)- und (S)-Phenprocoumon sind in Abb. 2.7 und Abb. 2.8 gezeigt. Anhand

dieser Kurven lässt sich erkennen, dass zum einen das R/S-Verhältnis einer relativ hohen interindividuellen Variabilität unterliegt (siehe Standardabweichungsbalken in Abb. 2.7 und Abb. 2.8) und sich für die einzelnen Genotypen kein deutlich unterschiedlicher Trend abzeichnet.

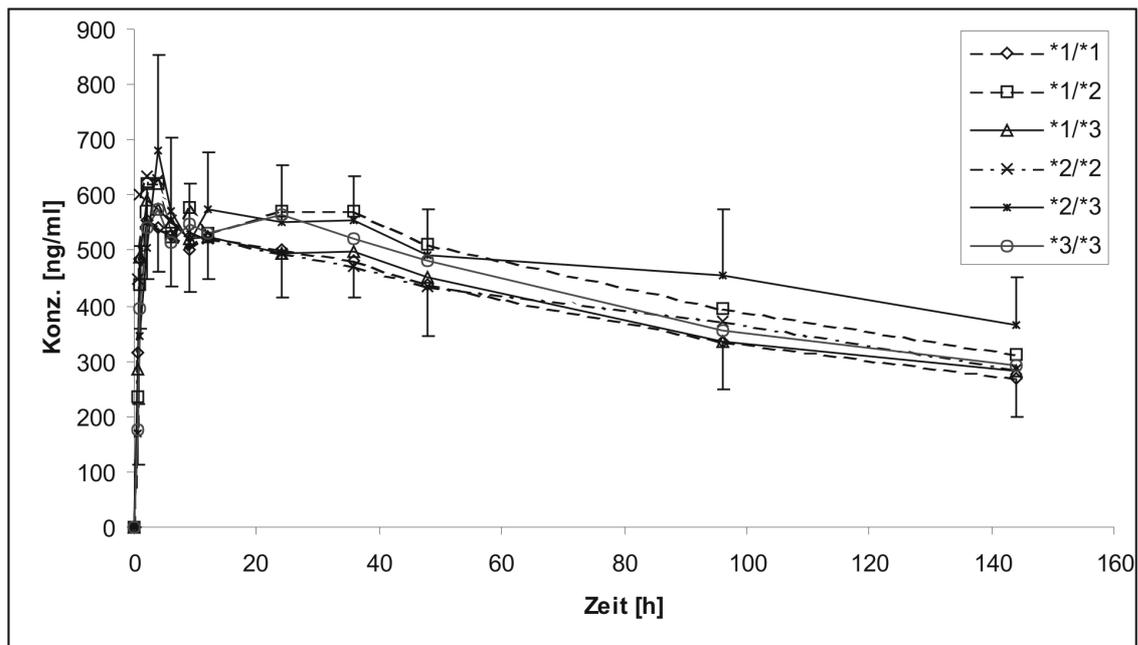


Abb. 2.7: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven der einzelnen Genotypen für (R)-Phenprocoumon; Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für die unterste und oberste Kurve gezeigt

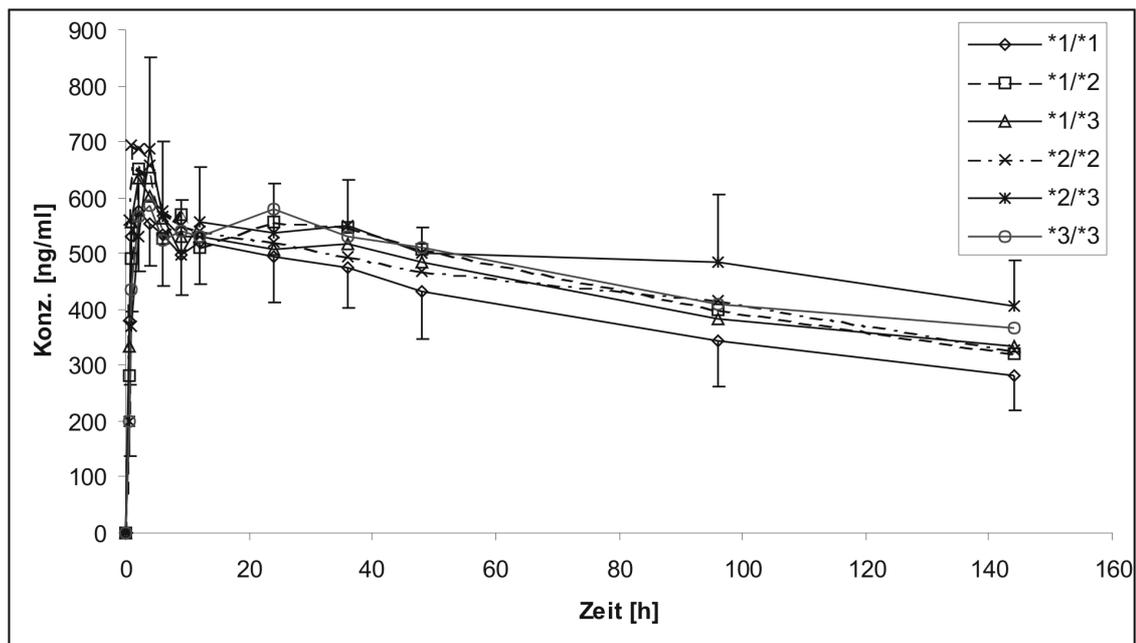


Abb. 2.8: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven der einzelnen Genotypen für (S)-Phenprocoumon; für die Standardabweichungen gilt das Gleiche wie für (R)-PPC

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven von (R)- und (S)-Phenprocoumon in Abb. 2.9 in das gleiche Diagramm eingetragen. Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, wurden die Genotypen drei verschiedenen Gruppen zugeordnet: Schnelle Metabolisierer (=FM: CYP2C9*1/*1 und *1/*2), intermediäre Metabolisierer (=IM: *1/*3, *2/*2, *2/*3) und langsame Metabolisierer (=PM: *3/*3). Diese phänotypische Einteilung basiert auf den Daten bereits durchgeführter Studien zu CYP2C9-Polymorphismen, d.h. auf den interindividuellen pharmakokinetischen Unterschieden, verursacht durch CYP2C9-Genotyp abhängige unterschiedliche Enzymaktivitäten (z.B. [55-58]). Dabei darf nicht vergessen werden, dass sich diese Einteilung durch die Untersuchung der Pharmakokinetik anderer Arzneistoffe als Phenprocoumon herauskristallisiert hat, und daher nicht zwangsläufig auch auf Phenprocoumon zutreffend und die einzig richtige sein muss. So ordnen z.B. Brockmöller et al. [59] die Genotypen *2/*3 und *3/*3 den langsamen Metabolisierern zu. Für eine klarere visuelle Darstellung der Auswertungen im Folgenden wurde jedoch die im Studienprotokoll und oben beschriebene Einteilung gewählt.

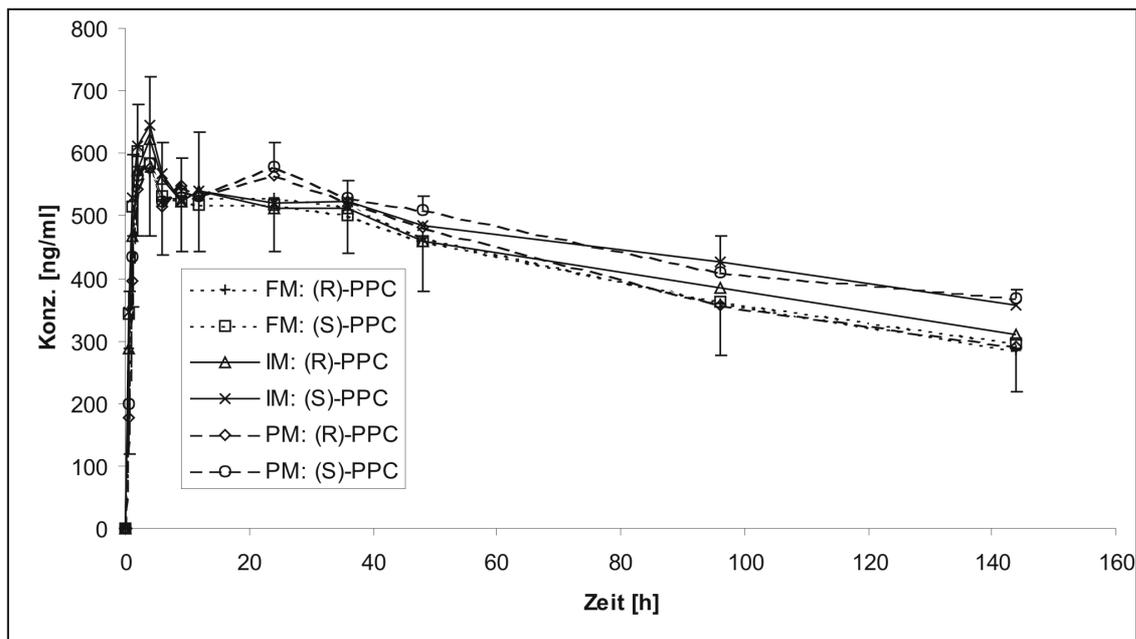


Abb. 2.9: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von (R)- und (S)-Phenprocoumon, aufgeschlüsselt nach schnellen (FM), intermediären (IM) und langsamen Metabolisierern (PM)

Auch hier ist kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Lediglich wenn die Verhältnisse von (R)- und (S)-Phenprocoumon der Metabolisierer-Gruppen zu jedem Zeitpunkt innerhalb der 144 Stunden miteinander verglichen werden, ist ein gewisser Trend zu sehen (siehe Abb. 2.10). Dabei ist aber zu beachten, dass die Mittelwerte der Peakflächenverhältnisse bei allen drei Untergruppen nur zwischen maximal 1.03 und minimal 0.79 liegen, also nur eine geringe Spannbreite aufweisen.

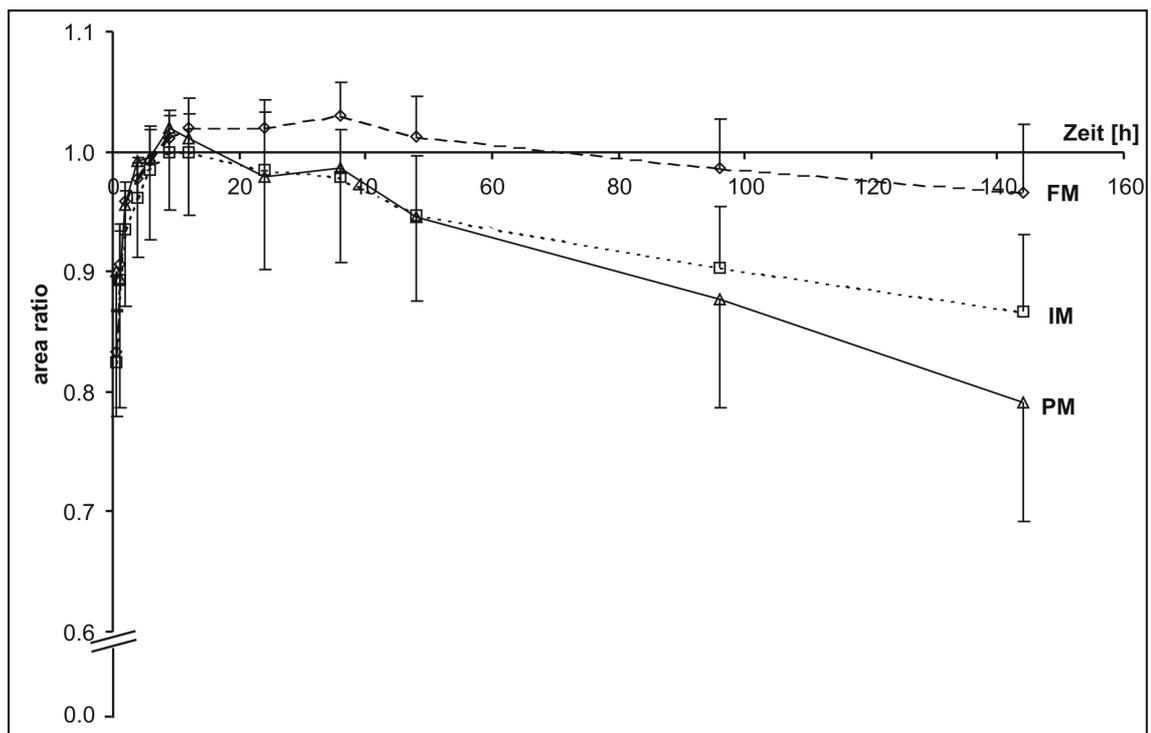


Abb. 2.10: Peakflächenverhältnisse von (R-) zu (S)-Phenprocoumon mit Standardabweichungen (FM: schnelle Metabolisierer, IM: intermediäre M., PM: langsame M.)

Während anfangs nach Dosisverabreichung (zwischen 0 und ca. 8 h) die Konzentration des (S)-Enantiomers überwiegt (R/S-Verhältnis < 1), liegt bei ca. 10 h bei den intermediären und langsamen Metabolisierern kurzzeitig mehr (R)- als (S)-PPC vor. Bis zum Ende der Messzeit (144 h) sinkt bei allen drei Genotyp-Gruppen der Verhältniswert kontinuierlich wieder unter 1.0. Letzten Endes weist die Gruppe der CYP2C9*3/*3 (PM) den größten Überschuss an (S)-Enantiomer auf, gefolgt von CYP2C9*1/*3, *2/*2, *2/*3 (IM) und CYP2C9*1/*1, *1/*2 (FM).

Hinsichtlich der Parameter AUC, Gesamtkörperclearance, C_{\max} und $t_{1/2}$ ergeben sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Allerdings ist ein Trend zu erkennen, dass Träger der CYP2C9*2- und *3-Varianten eine niedrigere (S)-Phenprocoumon-Clearance aufweisen. Für eine Darstellung der Ergebnisse im Detail sei auf die Publikation von Kirchheiner et al. [34] verwiesen.

2.3.3 Diskussion der Ergebnisse

Zum Kurvenverlauf in Abb. 2.10: Dieses Ergebnis kann folgendermaßen interpretiert werden: Nach Jähnchen et al. [14] liegt (S)-Phenprocoumon stärker an Plasmaproteine gebunden vor als sein Gegenenantiomere, und Haustein et al. [37] stellten fest, dass nach i.v.-Gabe die Clearance in den ersten 8 Stunden höher ist als nach oraler Verabreichung. Dies spricht dafür, dass initial die Verteilung in tiefere Kompartimente und/oder die Ausscheidung auch nach oraler Gabe für (R)-Phenprocoumon aufgrund seiner geringeren Proteinbindung schneller abläuft. Ab ca. 8 Stunden egalisiert sich dieser Effekt vorübergehend für beide Enantiomere; bei intermediären und langsamen Metabolisierern ist gegen Ende vermutlich die verminderte (S)-Phenprocoumon-Verstoffwechslung durch CYP2C9 verantwortlich dafür, dass wieder geringfügig mehr (S)-Enantiomer im Plasma vorliegt.

Anhand der hier beschriebenen Probandenstudie konnte gezeigt werden, dass sich der CYP2C9-Genotyp auf die stereospezifische Pharmakokinetik von (R)- und (S)-Phenprocoumon nach oraler Applikation nicht wesentlich auswirkt. Dies steht im Gegensatz zur Pharmakokinetik von racemischem Warfarin, für das bei langsamen Metabolisierern eine deutlich veränderte Pharmakokinetik von (S)-Warfarin als Substrat von CYP2C9 und damit verbunden ein geringerer Dosisbedarf festgestellt wurde [60]. Im Analogieschluss könnten sich folglich für Phenprocoumon ein im wesentlichen vom CYP2C9 Genotyp unabhängiger Dosisbedarf und möglicherweise ein reduziertes Risiko von Nebenwirkungen ergeben. Patientenstudien, in denen das Blutungsrisiko durch die Therapie mit verschiedenen Antikoagulantien bzw. in Abhängigkeit vom CYP2C9-Typ untersucht wurden, geben allerdings keine Hinweise auf eine therapeutische Überlegenheit von Phenprocoumon [61,62]. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Population der Patientenstudien nicht mit der Probandenstudie vergleichbar ist (Patienten waren älter als die Probanden), zum anderen könnte sich die deutlich längere Halbwertszeit von Phenprocoumon ungünstig auf die Therapiestabilität auswirken. Andererseits verhindert eine lange Halbwertszeit starke

Schwankungen des Plasmaspiegels bei Änderung der Dosis oder gar Dosisauslassung, was die Therapiestabilität begünstigt. Der Faktor Therapiestabilität kann also noch nicht abschließend bewertet werden. Des Weiteren ist der quantitative Einfluss weiterer Cytochrom-P-450 Enzyme (v.a. CYP3A4 [19]) in-vivo sowie die interindividuell unterschiedliche Pharmakodynamik von Antikoagulantien, bedingt z.B. durch variierende Aktivität der Gerinnungsfaktoren oder endogene Vitamin-K-Reserven, noch nicht ausreichend erforscht. Auch von der Zielstruktur der 4-Hydroxycoumarine, dem Vitamin K Epoxid-Reduktase Komplex (VKOR) sind Mutationen berichtet [63], die zur Resistenz gegenüber Antikoagulantien führen können. Allerdings sind die dafür verantwortlichen Gene noch nicht ausreichend charakterisiert, und es ist nicht bekannt, ob es interindividuell zwischen voller Resistenz und normaler Sensitivität Abstufungen gibt [64,65]. Solange diese Einflussfaktoren nicht detailliert geklärt sind, bleibt also kein anderes Mittel als die Messung der Prothrombinzeit zur Überwachung der Therapie [66].

2.4 Stereoselektive LC-LC-MS/MS-Analytik der Phenprocoumon-Metabolite aus Plasma

2.4.1 Problemstellung

Anhand der oben beschriebenen Probandenstudie konnte gezeigt werden, dass sich die Pharmakokinetik von (R)- und (S)-Phenprocoumon in Abhängigkeit vom CYP2C9-Genotyp nur wenig verändert. Dabei liegt nach der einmaligen oralen Dosis über die beobachteten 144 Stunden (R)-Phenprocoumon in Plasma ungefähr in der gleichen Konzentration vor wie das Gegenenantomer. Zwar ist die chemische Identität der Phenprocoumon-Metabolite seit längerem größtenteils bekannt, und es existieren auch grundlegende Daten über deren Pharmakokinetik, allerdings nicht unter Berücksichtigung der Stereochemie. Da Phenprocoumon als Racemat verabreicht wird, müssen - wenn Beibehaltung der Konfiguration nach Verstoffwechslung vorausgesetzt wird - die entsprechenden modifizierten Enantiomere in Plasma und Urin zu finden sein. Die Tatsache, dass das R/S-Verhältnis der Ausgangssub-

stanz nach der Verteilungsphase annähernd bei 1:1 bleibt, legt den Schluss nahe, dass die beiden Enantiomere zu gleichen Teilen metabolisiert werden. Folglich sollte für die Metabolite eine ähnliche R/S-Ratio zu messen sein. Untersuchungen, die somit einen genaueren Einblick in den stereospezifischen in-vivo-Metabolismus von Phenprocoumon erlauben würden, liegen allerdings bislang noch nicht vor. Trotz der Fülle an veröffentlichten analytischen Methoden (siehe Tabelle 2.1) befindet sich darunter kein Verfahren, das die enantio-merenselektive Messung der Metabolite für pharmakokinetische Zwecke ermöglicht. Daher musste zuerst ein entsprechendes Verfahren mit einer ausreichenden Sensitivität für die gleichzeitige, stereoselektive Bestimmung der Phenprocoumon-Metabolite aus Plasma entwickelt und validiert werden.

2.4.2 Probenvorbereitung

Als Untersuchungsmaterial standen die Plasmaproben der genannten Probandenstudie zur Verfügung. Durch nicht-stereoselektive LC-MS-Messungen [48] ist bekannt, dass sich die Konzentrationen der Phenprocoumon-Metabolite im Bereich von ca. 1 – 50 ng/ml bewegen. Zum Vergleich: Der Phenprocoumon-Spiegel liegt bei den gleichen Probanden zwischen ca. 200 und 2000 ng/ml (Racemat). Die Methode muss also eine deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze aufweisen, was sich bereits bei der Probenaufbereitung durch eine entsprechende Aufkonzentrierung erreichen lässt. Anders als für die (R)-/(S)-PPC Analytik wurde hier nicht aus 1 ml Plasma auch 1 ml Extrakt gewonnen, sondern die Probe wurde um den Faktor 16 aufkonzentriert (2 ml Plasma → 125 µl Extrakt). Die Extraktionsmethode entspricht im Wesentlichen der für die Analyse von Phenprocoumon aus Plasma beschriebenen mit einigen Anpassungen (z.B. SepPak C18, 200 mg/3 ml statt 100 mg/1 ml SPE-Kartuschen).

2.4.3 MS-Detektion

Von allen vier bekannten Phenprocoumon-Metaboliten (4'-, 6-, 7-, 8-OH-PPC; siehe Abb. 2.3), die als Standards verfügbar waren, wurde jeweils separat per Spritzenpumpeninfusion das MS/MS-Spektrum im positiven Elektrospray-Modus aufgenommen, um das Fragmentierungsverhalten der Verbindungen zu studieren. Dabei war festzustellen, dass 4'-OH-PPC aufgrund der Hydroxylierung im Seitenaromaten massenspektrometrisch von den anderen drei Metaboliten unterscheidbar ist, während letztere identische Fragmentierungsspektren ergeben, und sich damit über die Masse der Fragmente nicht unterscheiden lassen (siehe Abb. 2.11).

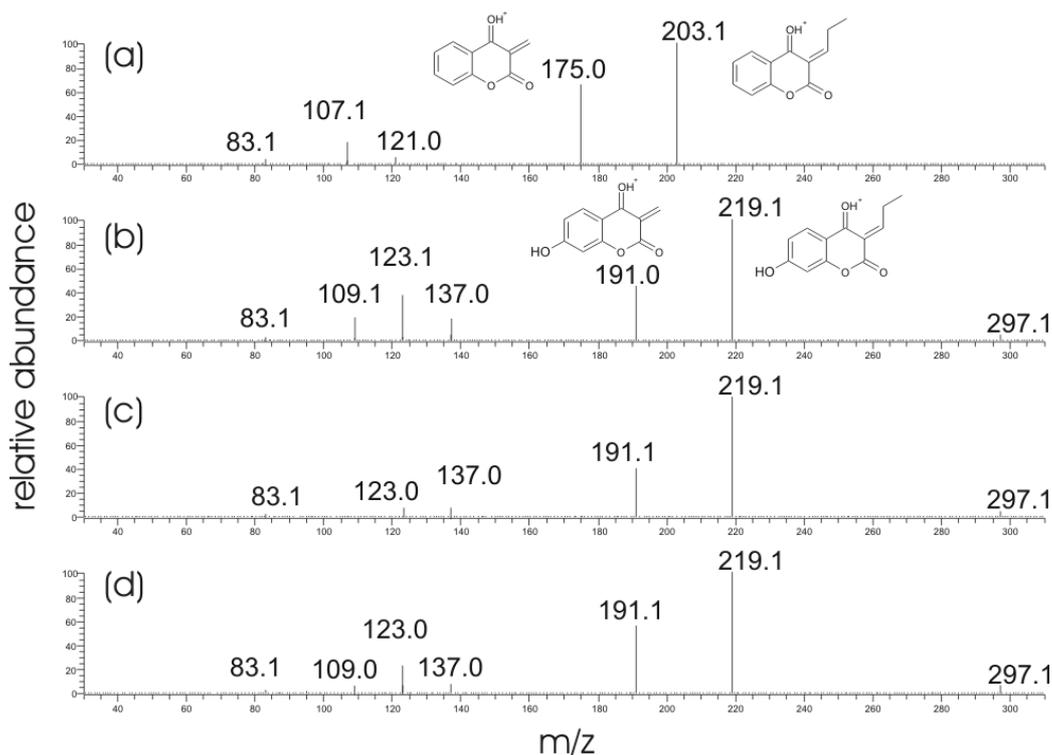


Abb. 2.11:(+)-ESI-MS/MS-Spektren bei 25 V Kollisionsenergie und 1.0 mTorr Argon von (a) 4'-OH-PPC, (b) 6-OH-PPC, (c) 7-OH-PPC und (d) 8-OH-PPC mit postulierten Fragmentstrukturen (m/z 123 und 137 konnten keine Strukturen zugeordnet werden)

Für die Detektion im SRM-Modus wurden die intensivsten Übergänge m/z 297.2 \rightarrow 175.0 + 203.2 (4'-OH-PPC) und m/z 297.2 \rightarrow 191.2 + 219.1 (6-, 7-, 8-OH-PPC) gewählt.

Die Detektion im Negativmodus wurde ebenfalls getestet, brachte aber gegenüber positiver Ionisierung keine Vorteile, da zum einen die Fragmentierung im Negativmodus komplexer und schlechter nachvollziehbar abläuft – was die MS-Separierung der Chromatogrammspuren für die bekannten und die zwei neu entdeckten Metabolite erschwert – und weil zum anderen der Zusatz von Ameisensäure zum Eluenten die im negativen Modus nötige Deprotonierung z.T. unterdrückt.

2.4.4 Methodenentwicklung: Achiral-chirale chromatographische Trennung mittels zweidimensionaler HPLC-MS-Kopplung

2.4.4.1 Chirale HPLC-Trennung der Metabolite

Ausgehend von der Methode, die für die Trennung der Phenprocoumon-Enantiomere angewendet wurde, wurde ebenfalls unter Verwendung von Chira-Grom 2 Säulen eine Methode zur stereoselektiven Trennung der Phenprocoumon-Metabolite entwickelt. Lösungen der als Racemate verfügbaren synthetischen Standards wurden für diesen Zweck nacheinander injiziert. Dabei zeigte sich zum einen, dass mit der bereits zuvor benutzten 250 x 1 mm Säule mit Wasser/Acetonitril/Ameisensäure als Eluenten und einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ eine gute Trennung der Enantiomere erreichbar ist, und zum anderen, dass mit einer 250 x 2 mm Säule des gleichen Materials bei Verdopplung der Fließgeschwindigkeit bei mindestens gleichwertiger Auflösung deutlich schärfere Peaks resultieren (Eluent: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure – 50/50/0.5; 200 $\mu\text{l}/\text{min}$). Wie in Abb. 2.12 zu erkennen ist, sind die jeweiligen Enantiomere praktisch basisliniengetrennt, jedoch überlappen alle Metabolite zu einem gewissen Grad. Da aber nur die Spur von 4'-OH-PPC massenspektrometrisch von den anderen unterschieden werden kann, ist also eine direkte chirale Trennung einer Mischung der Metabolite auf der Chira-Grom 2 Säule nicht möglich.

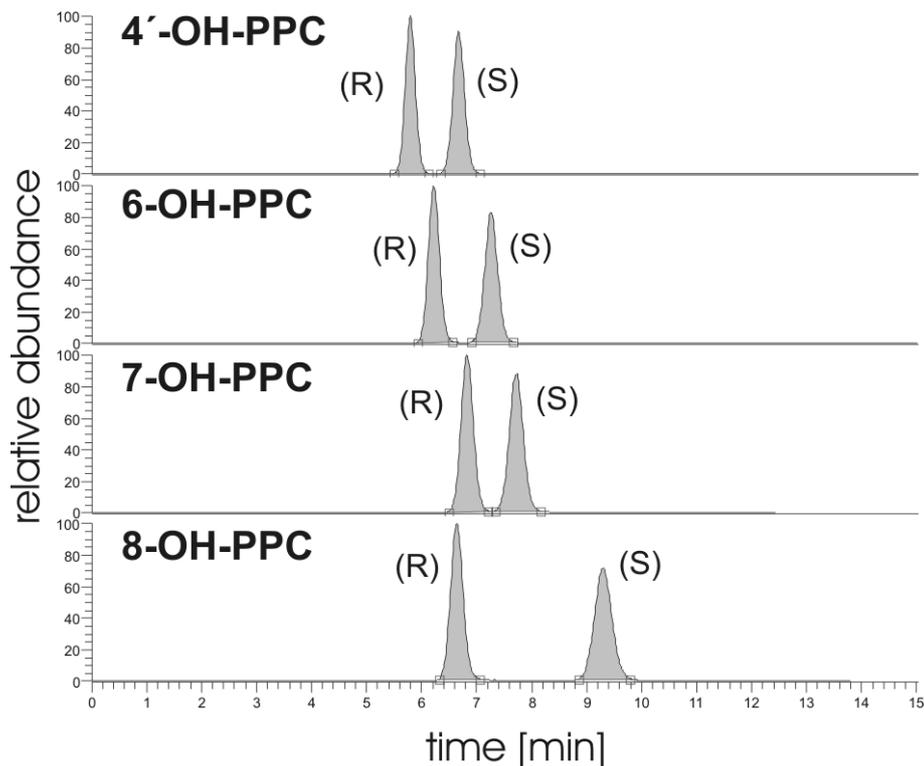


Abb. 2.12: Chirale Trennung der einzelnen Phenprocoumon-Metabolite auf Chira-Grom 2 (250 x 2 mm)

2.4.4.2 Achirale HPLC-Trennung der Metabolite

Die fehlende Selektivität der chiralen Säule gegenüber den verschiedenen monohydroxylierten Phenprocoumon-Verbindungen führte zu der Überlegung, der chiralen Trennung eine nicht-chirale vorauszuschalten, um dann die einzelnen Racemat-Peaks der chiralen Chromatographie zu unterziehen. Bereits mehrere Methoden für die Trennung von Phenprocoumon-Metaboliten auf C18-Reversed-Phase-Säulen wurden veröffentlicht, als Eluenten dienen hier Acetonitril/Methanol/Tetrahydrofuran/Essigsäure [44], Acetonitril/Wasser/Essigsäure [45], Ammoniumacetat-Puffer/Methanol [40] und Methanol/0.5 % Essigsäure [43]. Des weiteren wurde auch neuartiges Calixaren-Material (Caltrex II, 150x1 mm, 5 μ m; Grom Analytik, Rottenburg) mit verschiedenen Eluenten als stationäre Phase getestet, allerdings ohne das angestrebte Ergebnis. Die Testung dieser Systeme ergab, dass mit der vorhandenen Instrumentierung eine Gradientenelution mit Ammoniumacetat-Puffer (5 mM, pH 3.9) und Methanol die beste Trennung der 4er-Mischung liefert. Ein entspre-

chendes Chromatogramm zeigt Abb. 2.13. Die Elutionsreihenfolge wurde durch Einzelinjektion der Standards und Vergleich der Retentionszeiten ermittelt.

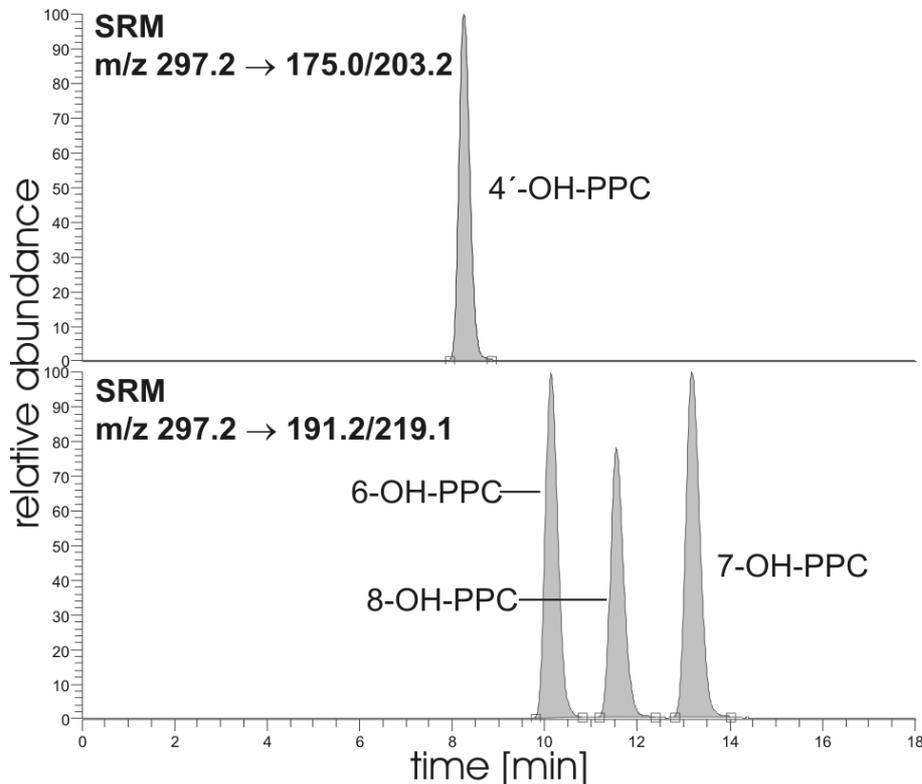


Abb. 2.13: Repräsentatives Chromatogramm der achiralen Trennung einer Metaboliten-4er-Mischung (Standards) auf der C18-Säule

2.4.4.3 Kombination von achiraler und chiraler Trennung

Das Problem bestand nun in einer sinnvollen Kombination der achiralen und chiralen Trennung, bei der die Effektivität der jeweiligen separaten Methode erhalten bleibt. Mehrere Ansätze für ähnliche Fragestellungen sind in der Literatur zu finden, so z.B. die direkte In-Reihe-Schaltung zweier Säulen (achiral-chiral) [67], die direkte Kopplung über ein Schaltventil [68], manuelles Auffangen von Fraktionen der achiralen Trennung und anschließende separate stereoselektive Analyse [69] oder (teil-)automatisierte zweidimensionale HPLC [70,71]. Allerdings hat jedes dieser Verfahren einen systematischen Nachteil, der es für dieses Problem nicht anwendbar macht. Eine direkte Säulenkopplung ist nicht möglich, erstens weil die Kopplung zweier relativ langer Säulen (15cm+25cm) mit

geringem Innendurchmesser und Teilchengröße zu hohe Rückdrücke erzeugt und zweitens weil der Ammoniumacetat-Puffer/Methanol-Eluent der achiralen Trennung sich nicht für die chirale Chromatographie eignet. Aus demselben Grund ist eine direkte Kopplung über ein Schaltventil nicht möglich, welches die C18- und die chirale Säule nur dann verbindet, wenn ein Peak von der ersten Säule eluiert. Die Laufmittelmenge, die in dieser Zeit auf die chirale Säule gelangt, reicht aus, um die Enantiomerentrennung zu verhindern. Die weiteren erwähnten Ansätze eignen sich ebenfalls nicht, da dabei zu viel Substanz verloren geht oder diese nicht mit MS-Detektion kompatibel sind und damit nicht die nötige Sensitivität für die Analytik im unteren ng/ml-Bereich aufweisen.

Die Lösung besteht darin, die Metabolite erst achiral zu trennen und die einzelnen Peaks auf kleinen Säulen "zwischenzuparken" (eine Parksäule pro Metabolit). Anschließend werden die Verbindungen ebenfalls einzeln von diesen Parksäulen mit dem passenden Laufmittel auf die chirale Säule eluiert, auf der die Enantiomere getrennt werden. Als Parksäulen wurden Chira-Grom 2 Vorsäulen (10x2mm) verwendet. Obwohl dieses Material eine höhere Retentionskraft besitzt als herkömmliches C18-Silikagel, würden die Phenprocoumon-Metabolite bei einem Methanol-Anteil von über 50 % während der Peak-Akkumulation z.T. bereits wieder eluiert. Daher wurde nach der C18-Säule und noch vor der Park-Kartusche Wasser/Methanol (95/5) dazugepumpt, um die Elutionskraft zu senken und die Peaks vollständig aufzufangen. Das Prinzip dieser Säulenschaltung ist in Abb. 2.14 veranschaulicht.

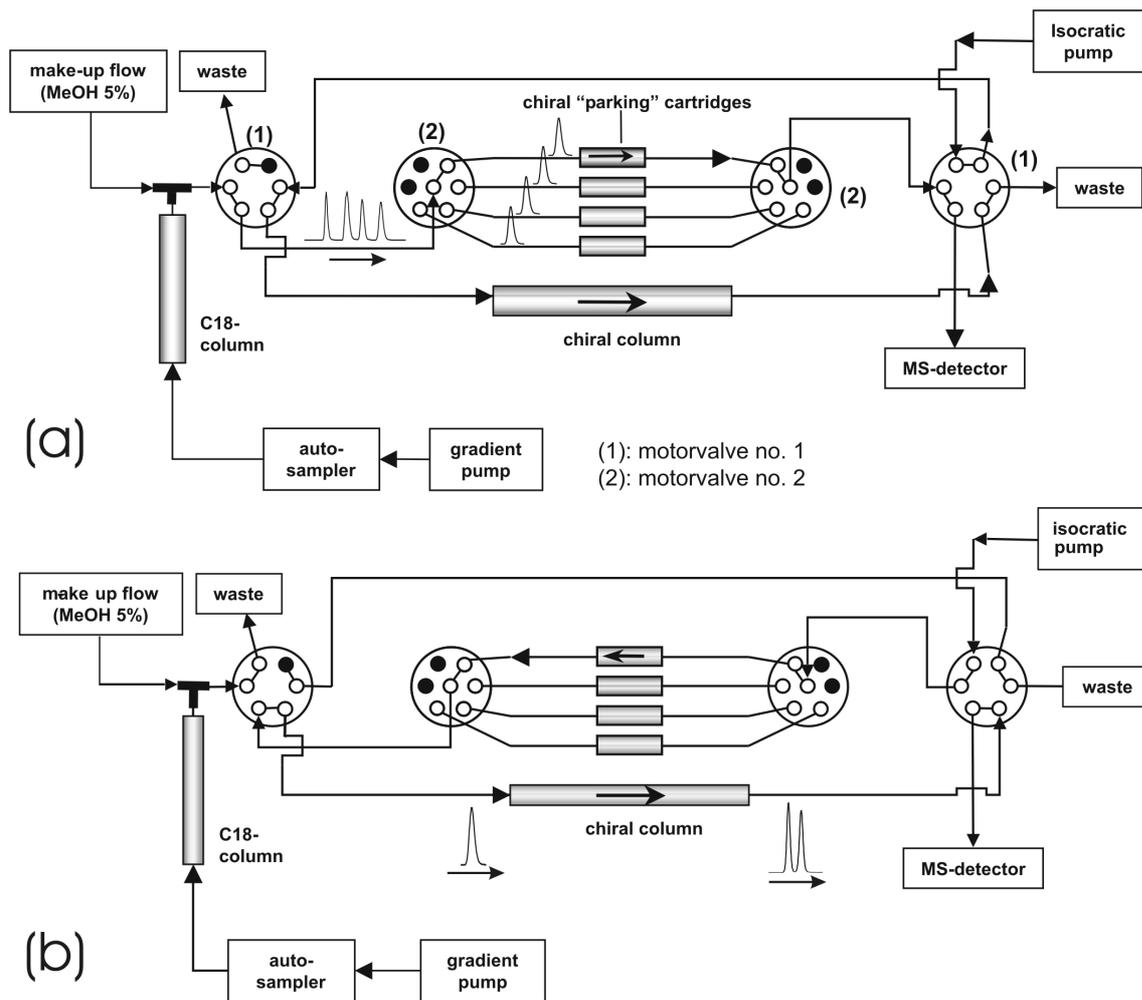


Abb. 2.14: Prinzip der zweidimensionalen achiral-chiralen Säulenschaltung

(a) Schritt 1: Die Phenprocoumon-Metabolite werden über die C18-Säule getrennt und nacheinander auf den Park-Kartuschen aufgefangen

(b) Schritt 2: Ventil Nr. 1 schaltet um, die geparkten Verbindungen werden sequentiell rückwärts auf die chirale Säule gespült, dort enantiomeren-getrennt und per MS detektiert

Das Ergebnis dieser zweidimensionalen Trennung zeigt Abb. 2.15 für eine Standard-4er-Mischung der Phenprocoumon-Metabolite (4'-, 6-, 7-, 8-OH-PPC). Die Elutionsreihenfolge der Enantiomere wurde durch Mikrosomeninkubation von reinem (R)- bzw. (S)-PPC und anschließender LC-LC-MS/MS-Analyse bestimmt. Dabei trat im Extrakt des (R)-PPC-Inkubats jeweils nur der erste Peak der Enantiomerenpaare auf, beim (S)-PPC-Inkubat entsprechend nur der zweite.

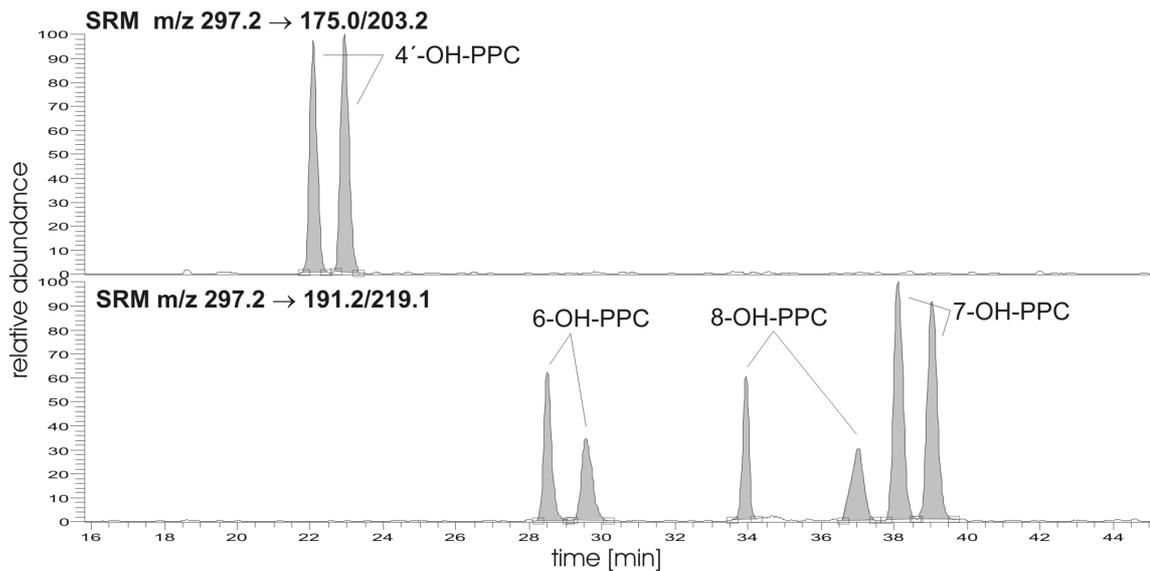


Abb. 2.15: SRM-Chromatogramm der Säulenschaltung für eine Standard-4er-Mischung der Metabolite

Die Methode wurde anschließend auf Plasmaproben von CYP2C9-genotypisierten Probanden angewendet, in denen erwartungsgemäß 8-OH-PPC nicht zu finden war, da dieses offenbar beim Menschen nicht oder nur in nicht nachweisbaren Mengen gebildet wird. Allerdings wurden in der SRM-Spur von 4'-OH-PPC zwei neue Peaks bei 8.8 (Bezeichnung: M1) bzw. 10.6 min (M2) auf (Abb. 2.16(a)) detektiert. Näheres zur Identität dieser Verbindungen in Kapitel 2.5.1.

Das Fehlen von 8-OH-PPC und die Existenz von zwei weiteren PPC-Metaboliten machte eine leichte Modifizierung der Säulenschaltung notwendig. Die Enantiomerenpaare von 4'-OH-PPC und M1 trennen sich auf der chiralen Säule vollständig, so dass diese beiden Peaks nach der achiralen Trennung gemeinsam auf der ersten Park-Kartusche aufgefangen werden können. Die nach der C18-Trennung fast koeludierenden Peaks von 6-OH-PPC und M2 lassen sich massenspektrometrisch leicht unterscheiden, sie werden ebenfalls gemeinsam auf der zweiten Parksäule adsorbiert. Es bleibt noch 7-OH-PPC übrig, für welches Parksäule Nr. 3 bestimmt ist. Die vierte Kartusche wurde folglich nicht mehr benötigt, und die Schaltzeiten für das Schaltventil Nr. 2 (Abb. 2.14) wurden entsprechend angepasst. Das Ergebnis

dieser LC-LC-MS/MS-Kopplung für eine Patientenprobe 144 h nach Dosisgabe ist in Abb. 2.16(b) dargestellt.

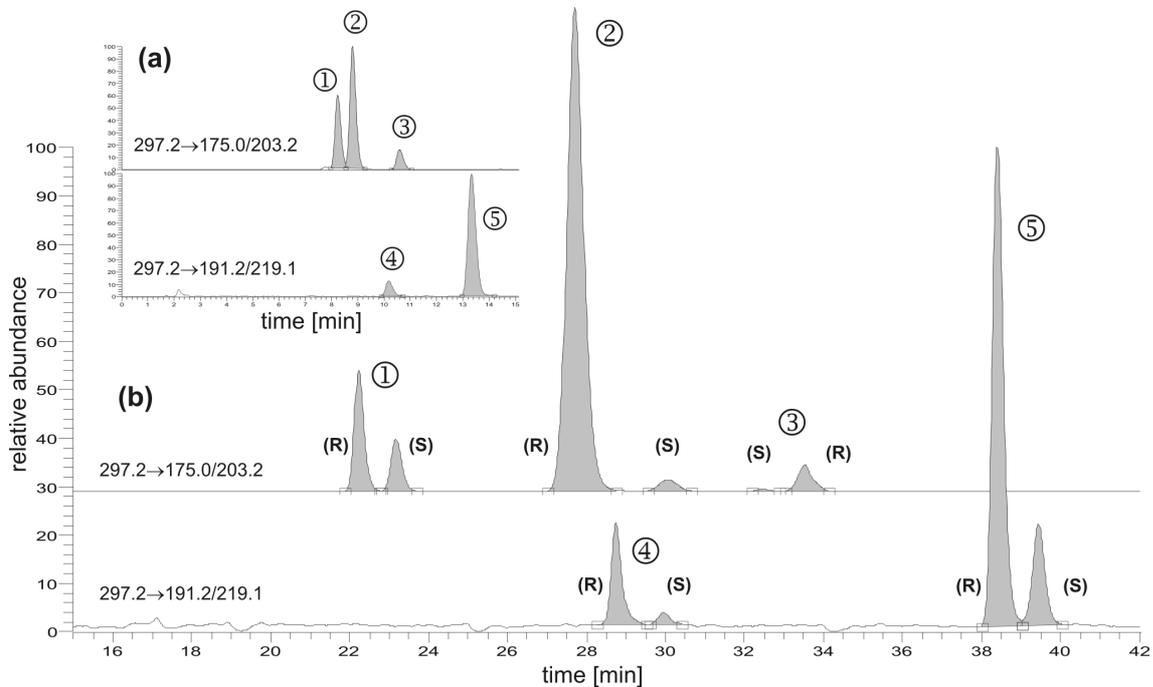


Abb. 2.16: Patientenplasmaprobe: (a) achirale Trennung mit zwei neuen Metaboliten in der Spur m/z 297.2 \rightarrow 175.0/203.2; (b) LC-LC-Chromatogramm derselben Probe; (1) 4'-OH-PPC, (2) M1, (3) M2, (4) 6-OH-PPC, (5) 7-OH-PPC

Die oben erwähnte Humanlebermikrosomeninkubation von (R)- bzw. (S)-PPC ergab, dass die Elutionsreihenfolge der Enantiomere von M1 der aller bekannten PPC-Metabolite entspricht, während für M2 die Reihenfolge offenbar invers ist (S vor R).

Die Methode wurde für die Bestimmung des R/S-Enantiomerenverhältnisses bei mehreren Probanden eingesetzt und funktionierte während der Messreihen ohne Fehler. Die Automatisierbarkeit (wichtig wegen Analysenzeiten über 40 min) ist gegeben, lediglich beim Wechsel der Probenreihe eines Individuums auf die nächste müssen die Retentionszeiten in der achiralen Trennung während der ersten beiden Injektionen überwacht werden, weil sich aufgrund unterschiedlicher Matrixeffekte diese geringfügig verschieben können. Die Schaltzeiten für das Motorventil Nr. 2 müssen dann entsprechend angepasst werden.

2.4.5 Methodenvalidierung

Eine umfassende Methodenvalidierung der achiral-chiralen-HPLC-MS-Kopplungsmethode wie sie z.B. in der FDA-guideline "Bioanalytical Method Validation" gefordert ist, war nicht das Ziel des hier beschriebenen Vorgehens. Dies wäre nur möglich, wenn die einzelnen Phenprocoumon-Metabolite enantiomerenrein in wägbaren Mengen verfügbar wären. Die Enantiomere sind jedoch weder kommerziell noch über Universitäten oder andere Institute zu beziehen. Da es um die Bestimmung der R/S-Verhältnisse geht, wurde die Validierung auf die dafür notwendigen und sinnvollen Parameter beschränkt. Dies umfasst die Bestimmung der Nachweisgrenze, des linearen Bereichs, der Präzision und Richtigkeit in Bezug auf Standards sowie die Präzision bei mehrfacher Analyse einer Probandenprobe, die Extraktionsaufbeute und die Frage, ob durch Extraktion und Analyse Racemisierung auftritt.

2.4.5.1 LOD und Linearität

Zur Bestimmung des Detektionslimits und der Linearität wurden drei gespikete Plasmareihen mit Konzentrationen von 0.05 – 200 ng/ml (jeweils Racemate von 4', 6-, 7-OH-PPC) extrahiert und per LC-LC-MS/MS analysiert. Selbst der niedrigste Standard mit 0.05 ng/ml ergab sichtbare Enantiomerenpaare mit einem Signal/Noise-Verhältnis von deutlich über 3:1. Die Methode war linear im Bereich 0.5 – 200 ng/ml für alle drei gemessenen Metabolite, ermittelt per externer Standard-Methode. Für die Berechnung der Kalibrierfunktion wurde eine lineare Regression der kleinsten Fehlerquadrate angewendet, bei einer Gewichtung von $1/x$. Keiner der Standards lag außerhalb der erlaubten Grenzen von $\pm 20\%$ am LOQ bzw. $\pm 15\%$ für alle weiteren Konzentrationen. Damit ist sichergestellt, dass bei keiner der Probandenproben Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs auftreten (festgestellt durch achirale LC-MS-Messung [48]). Details der Kalibrierfunktionen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Validierungsdetails: Linearität ($y=a+b*x$); Bereich: 0.5-200 ng/ml (Racemat)

	Achsenabschnitt a	Steigung b	R ²	max. Abweichung vom Sollwert*
(R)-4'-OH-PPC	32677	172460	0.9981	-19.8 % (0.5 ng/ml)
(S)-4'-OH-PPC	32444	175061	0.9979	-19.0 % (0.5 ng/ml)
(R)-6-OH-PPC	20794	81081	0.9968	-18.7 % (0.5 ng/ml)
(S)-6-OH-PPC	22651	81916	0.9969	-18.8 % (0.5 ng/ml)
(R)-7-OH-PPC	14391	114568	0.9989	-15.9 % (0.5 ng/ml)
(S)-7-OH-PPC	15113	114364	0.9987	-16.9 % (0.5 ng/ml)

*) Anm.: Die Abweichungen bei allen höheren Konzentrationen waren durchweg niedriger.

2.4.5.2 Präzision und Richtigkeit

(1) Standards: Um die Robustheit der Methode in Bezug auf Präzision und Richtigkeit zu bestimmen, wurden mit 4'-, 6- und 7-OH-PPC gespikte Plasmaproben bei drei verschiedenen Konzentrationen (0.5, 5.0 und 50 ng/ml; n=4 pro Level) an drei aufeinanderfolgenden Tagen mittels LC-LC-MS/MS-Kopplung gemessen. Da der Zweck der Methode die Messung von R/S-Verhältnissen (Peakfläche R-Enantiomer / Peakfläche S-Enantiomer) war, wurde allein dieser Parameter herangezogen, um die Variabilität der Methode zu bewerten. Der maximale Wert des Variationskoeffizienten als Maß für die Präzision lag bei 7.57 % (4'-OH-PPC bei 0.5 ng/ml), derjenige für die Richtigkeit (=Abweichung der R/S-Ratio vom Sollwert 1.0) bei +7.65 % (6-OH-PPC bei 0.5 ng/ml). Ergebnisse im Detail siehe Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Präzision und Richtigkeit der R/S-Ratio für gespikte Plasmaproben

4'-OH-PPC	Intraday-Variabilität (n=4 pro Level)			Interday-Variabilität
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1+2+3
0.5 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	3.12	0.86	1.23	1.74
CV [%]	2.10	7.57	3.34	4.61
5.0 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	5.21	-2.05	-1.68	2.98
CV [%]	5.76	2.40	1.65	4.77
50 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	-0.45	-2.34	1.63	1.48
CV [%]	4.96	4.56	6.91	5.29
6-OH-PPC	Intraday-Variabilität (n=4 pro Level)			Interday-Variabilität
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1+2+3
0.5 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	2.02	7.65	5.14	4.94
CV [%]	4.61	1.00	3.75	3.84
5.0 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	1.17	-0.52	-0.30	0.66
CV [%]	1.13	2.93	2.04	2.10
50 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	-0.05	-0.60	-0.10	0.25
CV [%]	0.59	1.41	1.39	1.05
7-OH-PPC	Intraday-Variabilität (n=4 pro Level)			Interday-Variabilität
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1+2+3
0.5 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	-3.21	-4.56	-1.74	3.17
CV [%]	2.57	5.78	4.34	4.21
5.0 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	0.74	-1.86	0.88	1.16
CV [%]	2.05	3.51	0.87	2.44
50 ng/ml				
mittl. Abweichung [%]	0.44	-0.23	0.24	0.30
CV [%]	0.48	0.45	0.47	0.52

(2) Präzision der Messung bei Probandenproben: In den Probandenproben kommen noch zwei weitere, in der Literatur bisher nicht beschriebene Phenprocoumon-Metabolite vor, die nicht als synthetische Standards verfügbar sind und damit Blankplasmaproben zur Überprüfung der Präzision und Richtigkeit nicht zugespikt werden können. Um dennoch ein Maß für die Präzision bei diesen realen Proben zu erhalten, wurden homogene Plasmaproben eines CYP2C9*1/*2 und CYP2C9*2/*3 Individuums jeweils 6 mal extrahiert und gemessen. Für keinen der Metabolite bei beiden Probanden überstieg der Variationskoeffizient der R/S-Ratio 7.0 %. Die Präzision bei diesen in-vivo-Proben entspricht also der von gespikten Blankplasmaproben. Details siehe Tabelle 2.7.

Tabelle 2.7: Präzisionsbestimmung der R/S-Ratio bei Probandenproben

	Mittelwert Peak- flächenverhältnis (R/S); n=6	SD	CV [%]
4-OH-PPC			
CYP2C9*1/*2	1.52	0.08	5.37
CYP2C9*2/*3	1.88	0.05	2.71
M1			
CYP2C9*1/*2	24.18	0.89	3.70
CYP2C9*2/*3	23.96	0.48	2.00
M2			
CYP2C9*1/*2	17.92	0.80	4.48
CYP2C9*2/*3	10.77	0.74	6.89
6-OH-PPC			
CYP2C9*1/*2	5.32	0.37	7.00
CYP2C9*2/*3	9.22	0.54	5.81
7-OH-PPC			
CYP2C9*1/*2	2.43	0.05	2.10
CYP2C9*2/*3	3.98	0.12	2.94

2.4.5.3 Extraktionsausbeute

Die Extraktionsausbeute der Festphasenextraktion für 4'-, 6- und 7-OH-PPC wurde durch Vergleich von extrahierten gespikten Proben mit direkt injizierten Standards bei drei Konzentrationen (50, 100, 200 ng/ml Racemat) in Vierfachwiederholung durch achirale LC-MS/MS-Analyse bestimmt. In diesem speziellen Fall wurde Warfarin als interner Standard zugesetzt (sonst bei keiner der LC-LC-MS/MS Analysen anwendbar). Das Ergebnis (Tabelle 2.8) zeigt, dass sich die Methode zur quantitativen Extraktion der Metabolite aus Plasma bestens eignet.

Tabelle 2.8: Ergebnis des Wiederfindungsexperiments für die Festphasenextraktion von Phenprocoumon-Metaboliten aus Plasma

Metabolit / Konz.	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml
4'-OH-PPC	97.8 %	94.7 %	98.2 %
6-OH-PPC	92.5 %	91.5 %	92.7 %
7-OH-PPC	102.6 %	101.0 %	101.9 %

2.4.5.4 Selektivität und Racemisierung

Durch mehrmalige achirale Analyse von extrahiertem Blankplasma mittels LC-MS/MS (entsprechend der 1. Dimension der Säulenschaltung) wurde auf störende Interferenzen durch endogene Substanzen geprüft. Das Ergebnis war hierbei immer negativ. Ein repräsentatives Chromatogramm einer derartigen Blankplasmaproben zeigt Abb. 2.17.

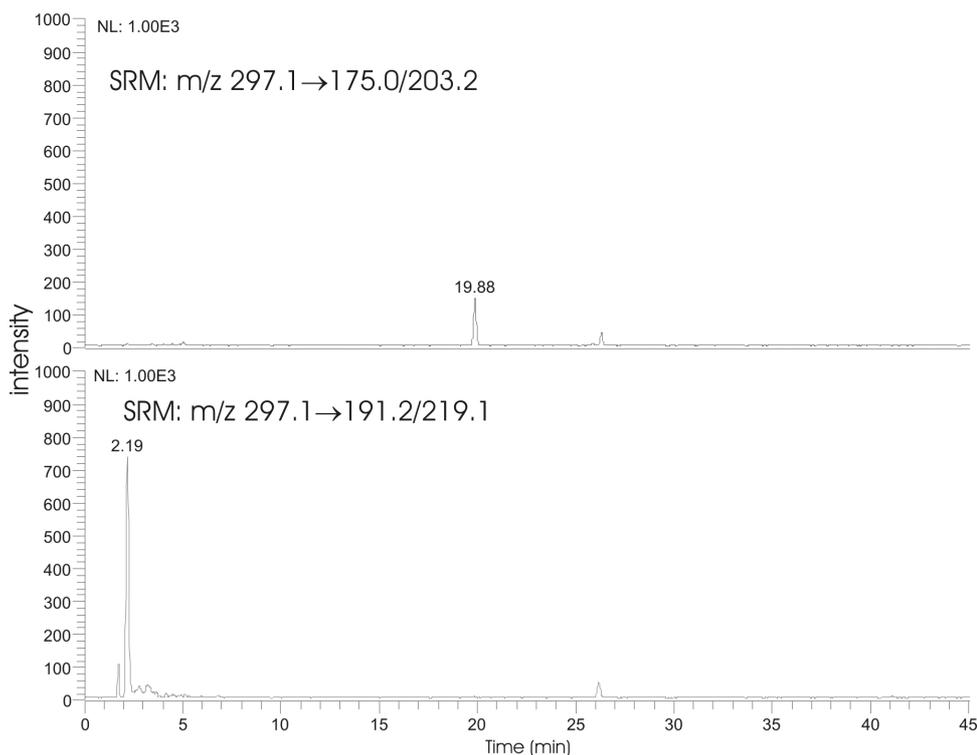


Abb. 2.17: SRM-Chromatogramm einer Blankplasmaprobe nach LC-MS/MS-Analyse

Die Frage, ob durch die Probenvorbereitung oder die anschließende LC-LC-MS/MS-Analyse teilweise oder vollständig Racemisierung eintritt, ließe sich dadurch beantworten, dass Blankplasma mit reinen (R)- bzw. (S)-PPC-Metaboliten gespikt und dieses wie alle anderen Proben extrahiert und analysiert wird. Da für keinen der Metabolite enantiomerenreine Standards vorliegen, wurde (R)- und (S)-PPC als Surrogat-Substrat herangezogen und bei den Konzentrationen 0.5, 5.0 und 50 ng/ml überprüft. Bei keinem der Enantiomere, gleichgültig bei welcher Konzentration, wurde Racemisierung beobachtet. Da bei keinem der bekannten Metabolite und M1 die Modifizierung in direkter Nachbarschaft

zum Stereozentrum liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse von Phenprocoumon auf diese Verbindungen übertragbar sind.

2.4.6 Diskussion

Die Besonderheiten des hier beschriebenen Verfahrens bestehen darin, dass erstens mehrere chirale Verbindungen trotz hoher struktureller Ähnlichkeit innerhalb einer Analyse in sehr niedrigen Konzentrationen stereoselektiv bestimmt werden können, zweitens innerhalb dieses Systems anders als bei vielen sequentiellen Methoden keine Substanzverluste auftreten (niedrigere Bestimmungsgrenze!) und drittens die Eluenten für die achirale und chirale Trennung entkoppelt sind. Dies ist insbesondere für die quantitative Bestimmung von Substanzen aus biologischen Proben von Vorteil. Damit spielt es keine Rolle, ob die beiden Laufmittel miteinander kompatibel sind oder gegenseitig die Trennung stören, da der Eluent der ersten Dimension mit dem der zweiten Dimension gar nicht in Berührung kommt. Dies ermöglicht die Kombination beliebiger Laufmittelsysteme und damit die Übertragbarkeit auf ähnliche Fragestellungen bei von Phenprocoumon völlig verschiedenen Analyten.

Ein gewisser Nachteil besteht in dem relativ hohen instrumentellen Aufwand. So werden neben einer Gradientenpumpe noch zwei weitere isokratische benötigt, außerdem zwei Schalteinheiten mit vier Rheodyne-Ventilen sowie für die Detektion ein MS-Gerät.

2.5 Untersuchung der Metabolite in Probandenplasmaproben mittels LC-LC-MS/MS-Kopplung

2.5.1 Identifizierung neuer Metabolite

In der SRM-Chromatogramm-Spur m/z 297.1→175.0/203.2 der achiralen Trennung wurden zusätzlich zu 4'-OH-PPC noch zwei weitere Peaks entdeckt. Diese Verbindungen wurden wie die restlichen Metabolite aus Plasma mitextrahiert und zeigen ein sehr ähnliches

Retentionsverhalten und besitzen die gleiche Masse wie die bekannten Metabolite ($M_r=296.1$). Außerdem liefern sie durch Kollisions-induzierte Fragmentierung im MS/MS-Experiment die gleichen Bruchstücke. Bisher wurden lediglich die drei monohydroxylierten Phenprocoumon-Metabolite 4'-, 6- und 7-OH-PPC in-vivo beim Menschen [18,43,44,72] und zusätzlich 8-OH-PPC in-vitro [19] und bei der Ratte [73] nachgewiesen.

Zur strukturellen Aufklärung dieser neuen Metabolite wurden die folgenden drei Methoden angewendet: 1) HPLC-MS/MS-Untersuchung von Plasmaproben mittels Triple-Quadrupol-MS zur Gewinnung von CID-MS/MS-Spektren; 2) HPLC-MSⁿ mittels Ionenfallen-MS zur Untersuchung des Fragmentierungswegs; 3) Synthese der vermuteten Verbindungen und Vergleich mit Plasmaproben mittels HPLC-MS (Triple-Quadrupol-MS).

zu 1) HPLC-MS/MS-Untersuchung von Plasmaproben mittels Triple-Quadrupol-MS

Verschiedene Probandenplasmaproben, bei denen eine hohe Konzentration an Metaboliten zu erwarten war (zwischen 100 und 144 h nach Dosisverabreichung) wurden wie in Kapitel 2.4.4.2 beschrieben per LC-MS analysiert. Dabei wurde zusätzlich zum SRM-Scan ein Product-Scan von m/z 297.1 im Bereich m/z 50-300 bei 25 V Kollisionsenergie im positiven Modus aufgenommen. Die resultierenden MS/MS-Spektren sind in Abb. 2.18 zu sehen.

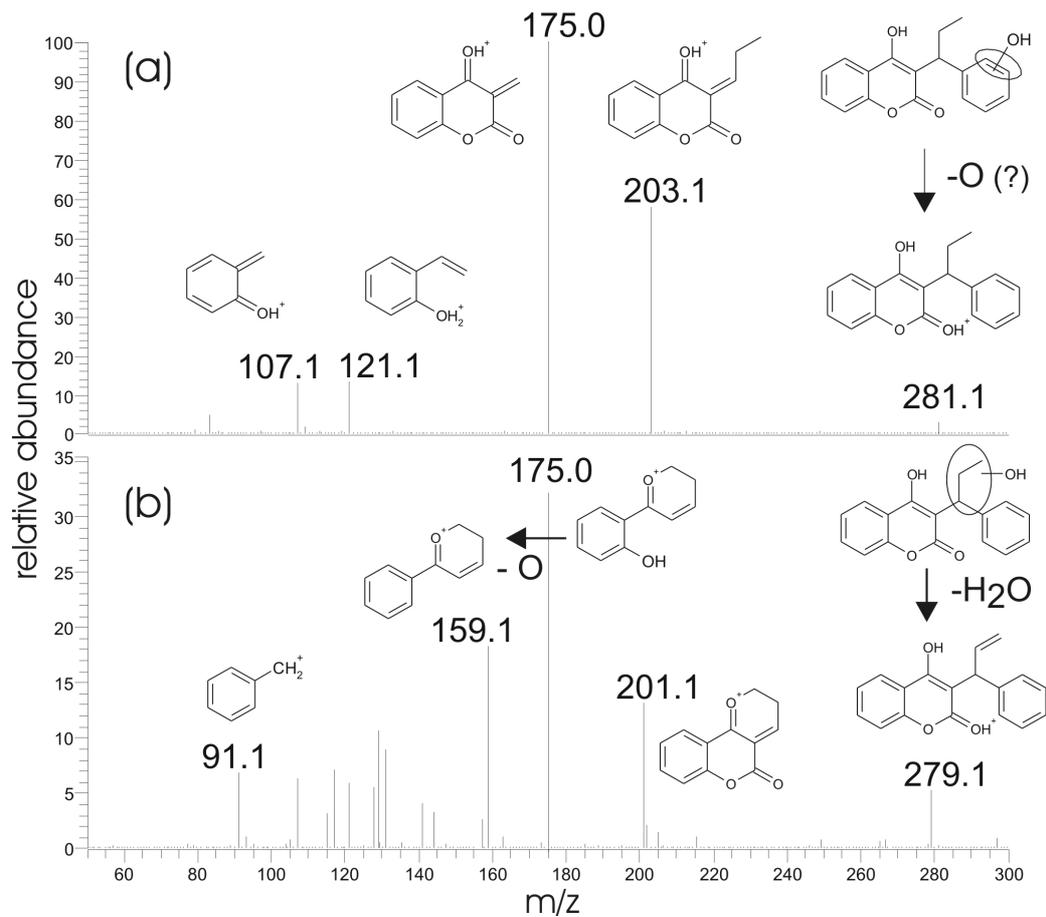
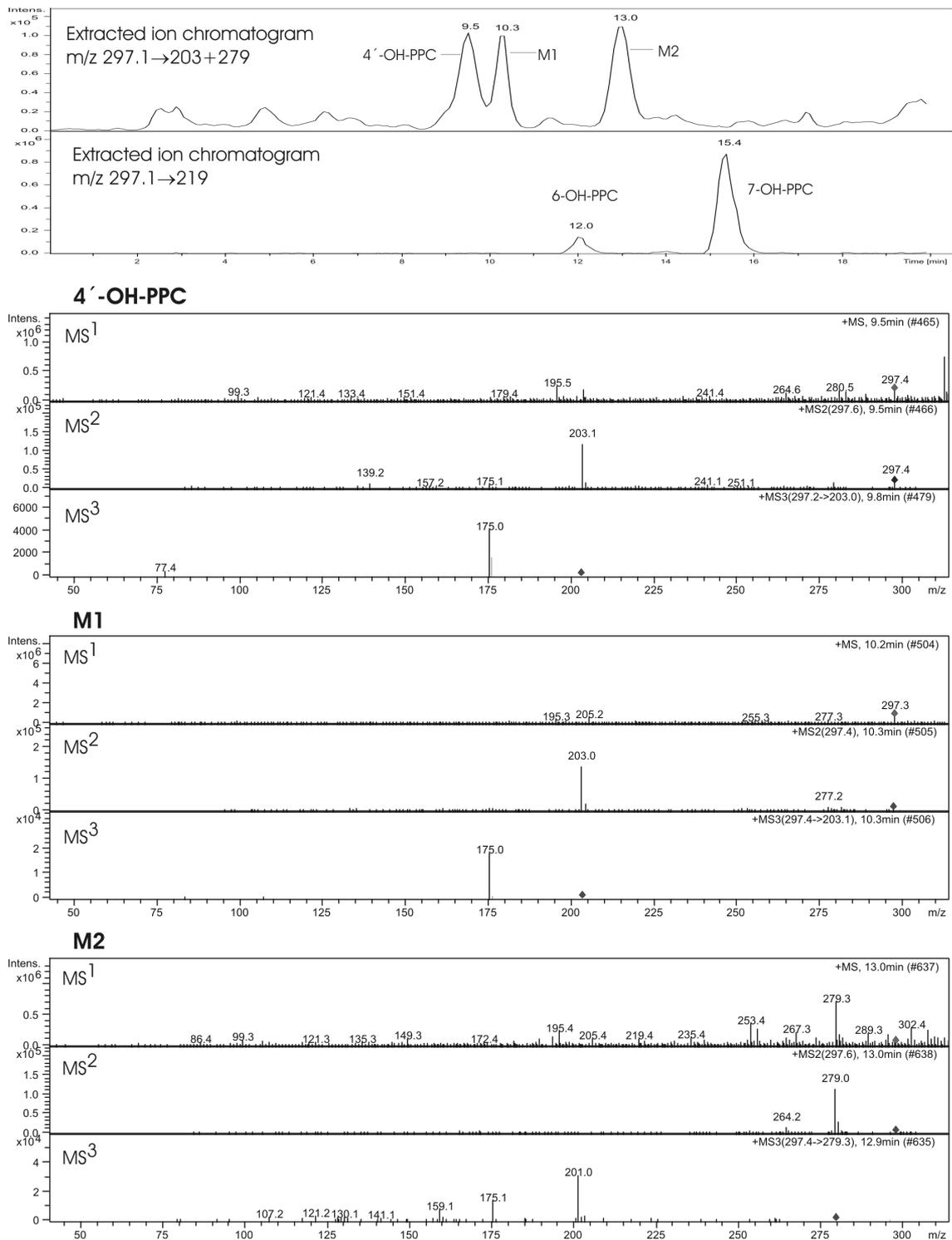


Abb. 2.18: CID-MS/MS-Spektren von (a) M1 und (b) M2 mit postulierten Ausgangs- und Fragmentstrukturen

Allein dadurch kann schon ausgeschlossen werden, dass die Modifikation im gleichen Teil des Coumarinsystems lokalisiert ist wie bei 6-, 7- oder 8-OH-PPC und es sich somit z.B. um 5-OH-PPC handeln würde, weil dann auf jeden Fall die Fragmente m/z 219 und 191 detektiert werden müssten. Das MS/MS-Spektrum von M1 stimmt exakt mit dem von 4'-OH-PPC (Strukturformel siehe Abb. 2.3) überein, was den Schluss nahe legt, dass es sich entweder um 2'- oder 3'-OH-PPC handelt. Schwieriger ist die Interpretation der Fragmentierung für M2; sie deutet allerdings darauf hin, dass keine aromatische, sondern eine Hydroxylierung im aliphatischen Teil vorliegt.

zu 2) HPLC-MSⁿ mittels Ionenfallen-MS zur Untersuchung des Fragmentierungswegs

Zur Untersuchung der Fragmentierungsreihenfolge wurde die Reversed-Phase-HPLC-Methode für Plasma auf eine Chemstation 1100-HPLC-Anlage übertragen, die an ein Bruker HCT Ion-Trap-Massenspektrometer gekoppelt ist (daraus ergeben sich leichte Verschiebungen der Retentionszeiten). Die Fragmentierung wurde bis zur Stufe MS³ verfolgt, für darüber hinausgehende Fragmentierungsexperimente reichte die Konzentration der Analyten im Plasma nicht mehr aus, ferner liefert die weitergehende Fragmentierung häufig nur noch Ergebnisse mit wenig Aussagekraft. Die Resultate (Abb. 2.19) bestätigen die Befunde der Triple-Quadrupol-MS-Experimente: 4'-OH-PPC und M1 weisen identische Fragmentierungswege auf (m/z 297.1→203.1→175.0), M2 unterscheidet sich davon jedoch deutlich. Nach einem Massenverlust von 18 (m/z 297.1→279.1; vermutlich H₂O), der bereits zu einem großen Teil bei der Ionisierung auftritt - wodurch im Full Scan kaum noch 297.1 sondern vielmehr 279.1 detektiert wird - entstehen aus m/z 279 die Fragmente 201, 175 und 159.

Abb. 2.19: Ionenfallen-MSⁿ-Spektren von 4'-OH-PPC, M1 und M2

zu 3) Synthese der vermuteten Verbindungen und Vergleich mit Plasmaproben mittels HPLC-MS (Triple-Quadrupol-MS)

Entsprechend den Ergebnissen der Triple-Quadrupol- und Ionenfallen-MS Untersuchungen der neuen Metabolite wurden die vermuteten Verbindungen 2'- und 3'-OH-PPC für M1 und 11-OH-PPC für M2 synthetisch hergestellt. Die Synthese und strukturelle Charakterisierung der potentiellen neuen Metabolite wurde in Kooperation mit Herrn Andreas Schenkel im Rahmen seiner Diplomarbeit am Institut für Pharmazie, Tübingen (November 2004 – März 2005) durchgeführt.

Aufgrund übereinstimmender Retentionszeiten nach achiraler sowie achiral-chiraler HPLC-MS-Kopplung konnte bewiesen werden, dass es sich bei M1 um 2'-OH-PPC handelt. Das synthetisierte 11-OH-PPC-Derivat stimmte jedoch weder in Retentionszeit noch MS/MS-Spektrum mit der in Plasmaproben gefundenen Verbindung M2 überein. Die Identität von M1 und 2'-OH-PPC bzw. die Nichtübereinstimmung von M2 und 11-OH-PPC zeigen sich eindeutig bei Fragmentierung im negativen Ionisationsmodus (siehe Abb. 2.20), während bei positiver Ionisation 2'-, 3'- und 4'-OH-PPC nicht unterschieden werden können. Somit bleiben im Phenprocoumon-Molekül noch zwei Positionen für eine Hydroxylierung übrig: das chirale C-Atom (Position 9; α -C-Atom), das sterisch eher gehindert aber elektronisch aktiviert sein müsste [74] sowie die Nachbarposition hierzu (Position 10; β -C-Atom). Eine endgültige Abklärung durch Synthese dieser beiden Strukturen steht noch aus. Die Identifizierung mittels Isolierung der Metabolite aus Plasma, Urin oder Mikrosomeninkubat und anschließender Charakterisierung über NMR stellte sich als äußerst problematisch heraus, weil alle Metabolite nur in sehr geringem Ausmaß gebildet werden und somit mehrere Liter extrahiert und aufgereinigt werden müssten, um die für ^1H -Kernresonanz-Messungen nötige Substanzmenge zu isolieren.

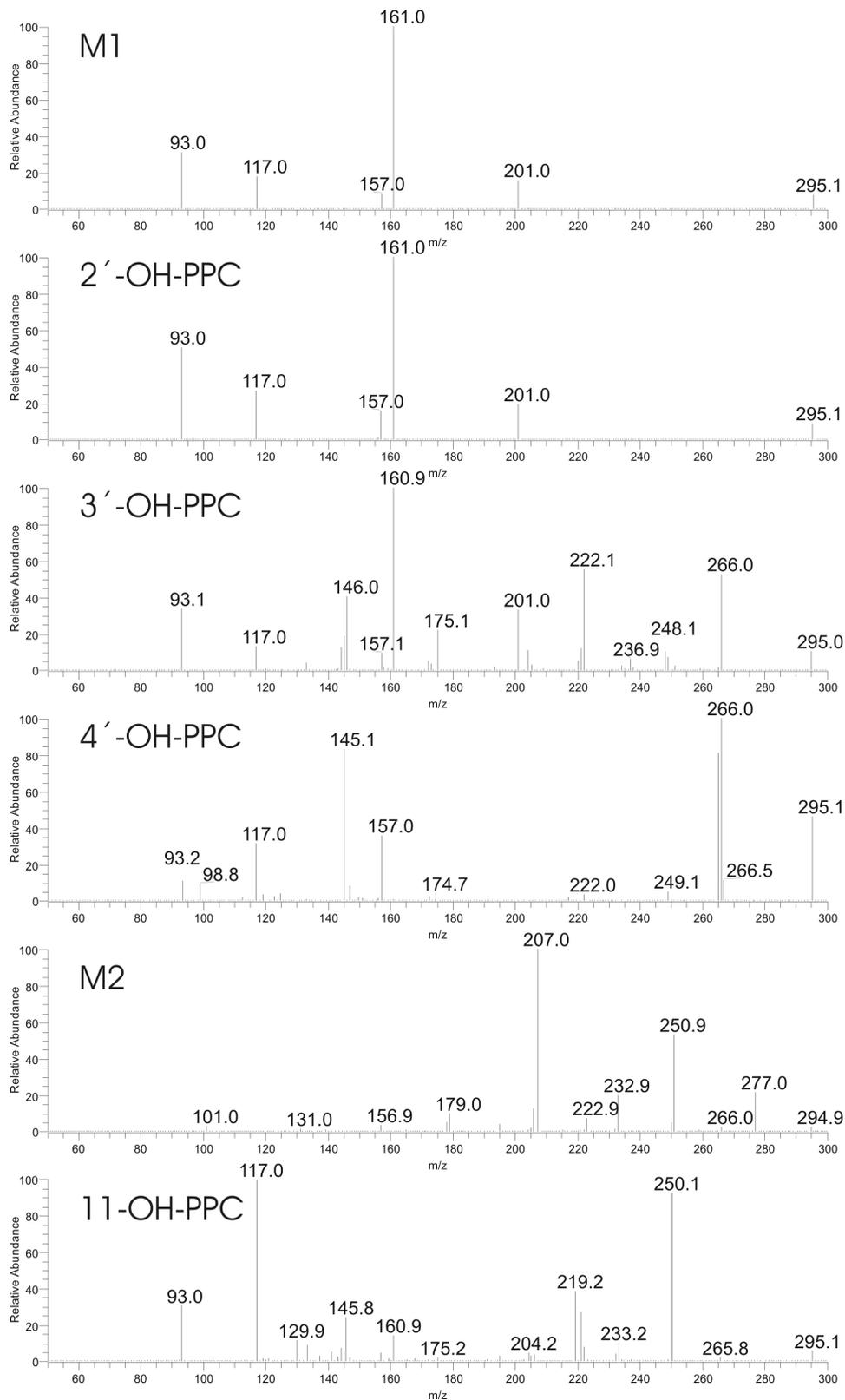


Abb. 2.20: CID-MS/MS-Spektren der neuen Phenprocoumon-Metabolite aus Plasma und der synthetisierten Standards 2'-OH-, 3'-OH- und 11-OH-Phenprocoumon im negativen Ionisationsmodus

2.5.2 Enantiospezifische pharmakokinetische Auswertung

Mittels der in Kapitel 2.4 beschriebenen Methode war es nun möglich, stereospezifisch die einzelnen Phenprocoumon-Metabolite in Plasma zu messen, wobei die Zielsetzung nicht die Ermittlung der Absolutkonzentrationen sondern das quantitative Verhältnis von (R)- zu (S)-PPC (ermittelt über die jeweiligen Peakflächen) war. Das Ergebnis wird ausgedrückt als Enantiomeren-Überschuss (EE=enantiomeric excess) von R zu S, d.h. als der Prozentsatz, um den mehr (R)- als (S)-Enantiomer vorliegt gemäß Formel (2.1).

$$EE(R) = \frac{\text{Peakfläche}(R) - \text{Peakfläche}(S)}{\text{Peakfläche}(R) + \text{Peakfläche}(S)} \times 100\% \quad (2.1)$$

Das Ergebnis für je einen Vertreter jeden Genotyps, gemessen im Zeitraum 1-144 h ist in Abb. 2.21 dargestellt.

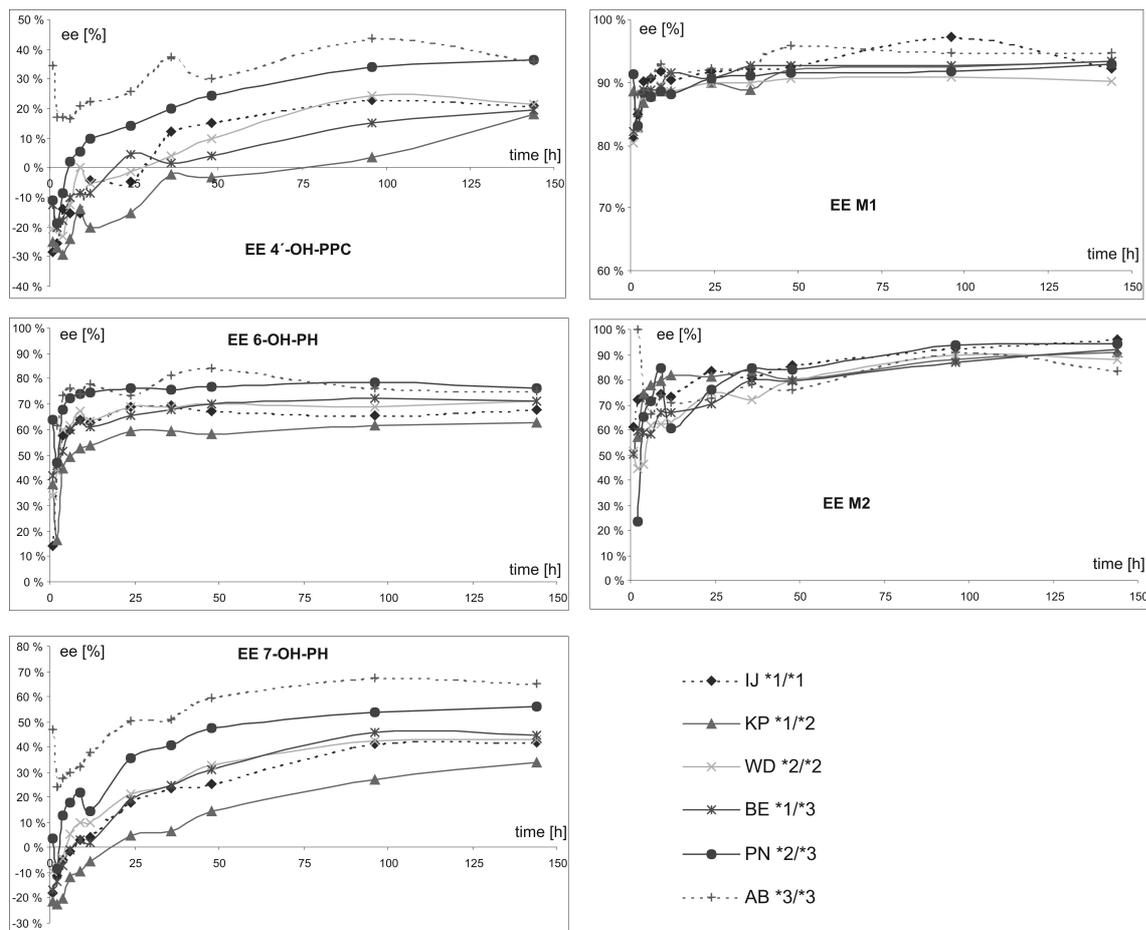


Abb. 2.21: Enantiomeren-Überschuss (EE=enantiomeric excess) des (R)-Enantiomers jedes Metaboliten bei je einem Individuum pro CYP2C9-Genotyp

Es ist zum einen deutlich zu erkennen, dass die Schwankungen zwischen den Genotypen für 6-OH-PPC, M1 und M2 geringer sind als für 4'-OH-PPC und 7-OH-PPC und zum anderen, dass sich für die Abhängigkeit des Kurvenverlaufs vom CYP2C9 Genotyp insbesondere für die beiden letzteren Metabolite kein eindeutiger Trend herauskristallisiert. So stammt die oberste Linie (mit dem höchsten (R)-Überschuss) zwar in beiden Fällen von einem langsamen Metabolisierer (*3/*3), die Kurve des entsprechenden Antipoden (*1/*1) befindet sich aber im Mittelfeld.

Um die Unterschiede deutlicher herausarbeiten zu können und um eine gewisse statistische Absicherung zu erzielen, wurden zusätzlich noch zwei weitere CYP2C9*1/*1 und *3/*3-Individuen betrachtet, um so auf eine Zahl von n=3 für diese beiden Extreme zu kommen. Eine weitere Erhöhung der Probenanzahl war zumindest für CYP2C9*3/*3 nicht möglich,

da aufgrund seines seltenen Vorkommens nur drei Probanden dieses Genotyps in die Studie eingeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse zeigt im Detail Abb. 2.22. Wie schon bei der vorherigen Messung des Enantiomerenüberschusses je eines Vertreters der Genotypen liegen die Kurven für M1 und M2 mit der Ausnahme von Proband CM sehr dicht beieinander und im positiven Bereich. Das bedeutet, dass von Anfang an die Konzentration des jeweiligen (R)-Enantiomers in Plasma fast konstant deutlich höher ist als die seines Spiegelbildes, mit einem Überschuss von ca. 90 % (M1) bzw. 80 % (M2). Anders sieht es für 4'-, 6- und 7-OH-PPC aus. Hier befinden sich die Kurven der *3/*3-Individuen deutlich über denen der *1/*1-Probanden, entsprechend einem geringeren Anteil von (S)-Enantiomer. Die Ausnahme bildet Proband CM (*3/*3), dessen Kurven in allen drei Fällen deutlich von den anderen Genotypen unterscheiden. Bei 7-OH-PPC ist der Kurvenverlauf sogar deckungsgleich mit denen der CYP2C9-Wildtyp-Träger. Ob es sich hierbei um eine reine interindividuelle biologische Schwankung handelt, oder ob dieser Proband möglicherweise in die falsche Genotyp-Gruppe eingeordnet wurde, lässt sich hier nicht feststellen.

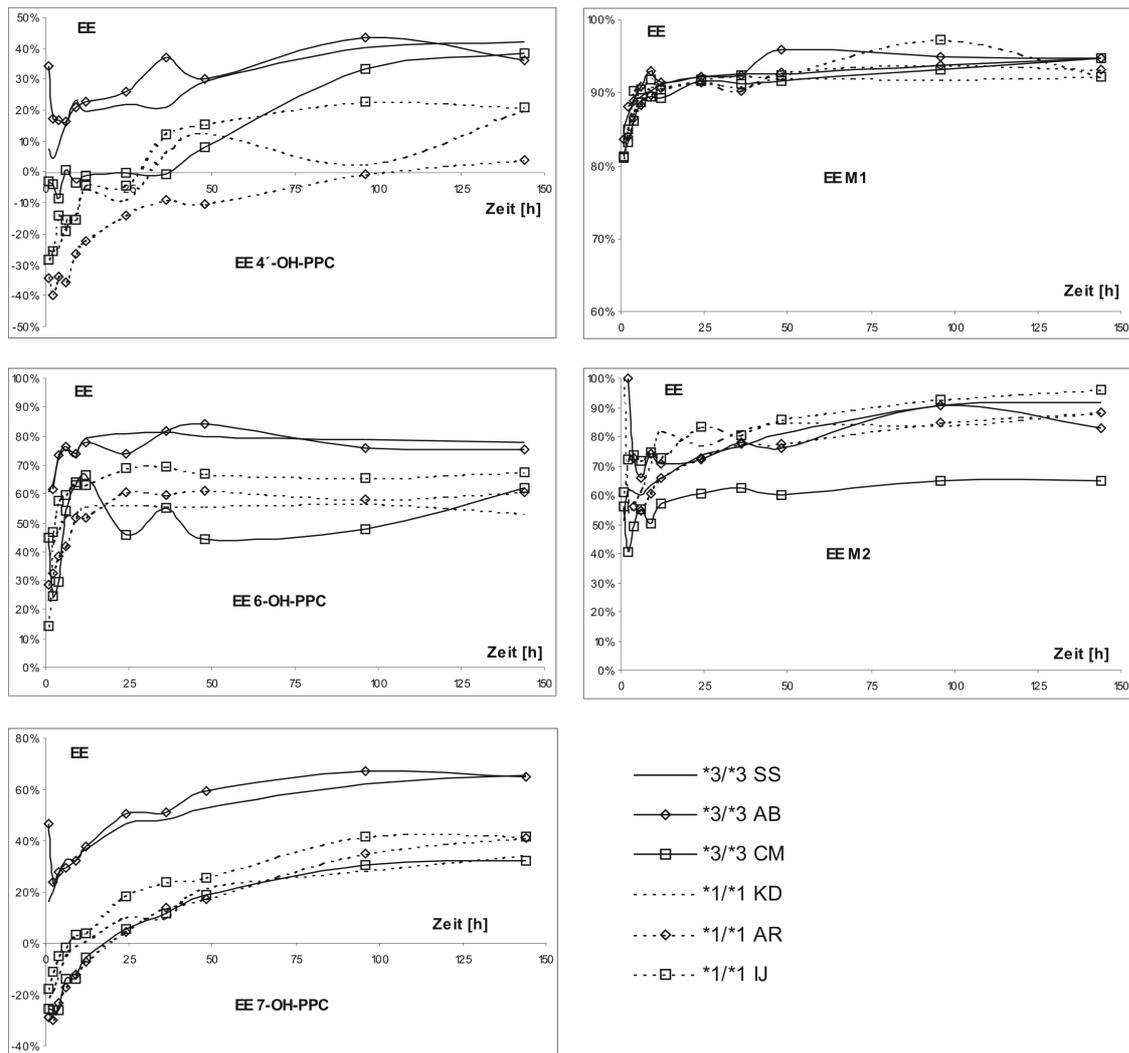


Abb. 2.22: Enantiomeren-Überschuss EE des (R)-Enantiomers jedes Metaboliten bei je drei Individuen pro CYP2C9*1/*1- und *3/*3-Genotyp

Ausgehend von diesen Daten konnten für die jeweils drei Vertreter der beiden Genotypen die Metaboliten-Enantiomeren-AUC's berechnet werden. Für die Studiauswertung [34] war zuvor mittels achiraler LC-MS-Analytik [48] zu den Zeitpunkten $t=0, 1, 4, 9, 24, 48$ und 144 h die Konzentration von 4'-, 6- und 7-OH-PPC im Plasma der Probanden bestimmt worden. Diese Werte wurden mit dem jeweiligen prozentualen Anteil des (R)- bzw. (S)-Enantiomers, ermittelt per LC-LC-MS/MS-Kopplung, zu den entsprechenden Zeitpunkten multipliziert. Ein statistischer Vergleich zwischen den beiden Genotyp-Gruppen anhand der Mittelwerte der so kalkulierten AUC-Werte liefert das in Tabelle 2.9 aufgeführte Ergebnis.

Tabelle 2.9: Enantiospezifische AUC-Werte der einzelnen Phenprocoumon-Metabolite für CYP2C9*1/*1 und -*3/*3-Genotypen

	AUC-Mittelwert ± SEM (n=3) [h*ng/ml]	P-Wert (Signifikanz-niveau 5 %)	Ergebnis	Gruppenvergleichbar?*
R-4'-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	499.1 ± 6.34	0.3775	nicht signifikant	nein
CYP2C9*3/*3	439.6 ± 52.50			
S-4'-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	441.8 ± 63.02	0.0566	nicht signifikant	ja
CYP2C9*3/*3	251.4 ± 34.15			
R-6-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	511.6 ± 45.51	0.0050	sehr signifikant	ja
CYP2C9*3/*3	214.2 ± 27.57			
S-6-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	127.0 ± 21.80	0.0180	signifikant	ja
CYP2C9*3/*3	36.30 ± 8.56			
R-7-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	2550 ± 265	0.0115	signifikant	ja
CYP2C9*3/*3	796.0 ± 294.7			
S-7-OH-PPC				
CYP2C9*1/*1	1515 ± 182.5	0.0030	sehr signifikant	ja
CYP2C9*3/*3	268.2 ± 66.29			

**) Vergleichbarkeit der Gruppen getestet über Vergleich der Varianzen mittels F-Test; bei stat.sign. Unterschied der Varianzen: Anwendung des student-t-Test mit Welch's Correction*

Abgesehen von (R)- und (S)-4'-OH-PPC zeigt sich bei allen Metaboliten ein statistisch signifikanter Unterschied bei vergleichbaren Varianzen.

2.5.3 Diskussion

Zur Identifizierung neuer Metabolite: Angesichts der Tatsache, dass Phenprocoumon sich schon seit 1963 im Handel befindet und eine fast unüberschaubare Anzahl von analytischen und pharmakologischen Arbeiten darüber existiert, überrascht der Fund zweier weiterer Metabolite zusätzlich zu den drei bekannten. Die Ursache dürfte in den damals weniger sensitiven und selektiven Analysenverfahren zu finden sein. So wurden die ersten Untersuchungen noch mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie durchgeführt [18]. Die erst später eingesetzten HPLC-Verfahren (z.B. [40,43,44]) haben offensichtlich alle die Schwäche ungenügender Auflösung zwischen den Metaboliten-Peaks

bzw. leiden unter mangelnder Probenaufbereitung. Typischerweise wurde bisher zur Metabolitenidentifizierung in Urin und Plasma der Vergleich zwischen realen Proben und synthetischen in Frage kommenden Verbindungen mittels GC-MS herangezogen [43,47,72]. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass nicht synthetisierte Verbindungen auch nicht gefunden werden und labile Substanzen sich bereits während der Chromatographie zersetzen. 2'-OH-PPC wurde vermutlich aus dem ersten Grund nicht entdeckt: Es wurde nicht explizit danach gesucht, und die Retentionszeiten von 2'- und 4'-OH-PPC unterscheiden sich bei identischen MS-Spektren zu wenig, so dass diese vermutlich deshalb nicht als separate Verbindungen identifiziert wurden. Der zweite neue Metabolit M2 (vermutl. aliphatisch hydroxyliert) spaltet sogar bei der schonenden Elektrospray-Ionisierung zu einem Großteil Wasser ab; man kann also davon ausgehen, dass dies in der GC bzw. spätestens bei der Electron-Impact-Ionisierung quantitativ geschieht, wodurch die Masse eines monohydroxylierten Phenprocoumon-Moleküls nicht mehr detektiert werden kann. Dies gilt allerdings nur, wenn die zusätzliche OH-Gruppe des Metaboliten M2 durch die Gruppenderivatisierungsreagenzien, die für solche Untersuchungen eingesetzt werden, nicht mit erfasst wird. Möglicherweise ist dies ebenfalls als Hinweis zu sehen, dass es sich hierbei um eine aliphatische OH-Gruppe handelt - mit reduzierter Reaktivität gegenüber den Derivatisierungsreagenzien. HPLC-ESI-MS/MS-Verfahren zur Metabolitenidentifizierung von Phenprocoumon wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Zur enantiospezifischen Verstoffwechslung und Pharmakokinetik der Metabolite: Die Vermutung, dass die R/S-Ratio der Phenprocoumon-Metabolite wie bei Phenprocoumon selbst nur wenig von 1:1 abweicht, konnte anhand der hier beschriebenen Versuche widerlegt werden. In beinahe allen untersuchten Fällen überwiegt nach ca. 25 h die Konzentration des (R)-Enantiomers in Plasma. Der Trend zeigt für langsame Metabolisierer (CYP2C9*3/*3) bei 4'-, 6- und 7-OH-PPC ein deutlich größeres R/S-Verhältnis verglichen mit homozygoten CYP2C9-Wildtyp-Allelträgern - am klarsten hebt sich dieser Unterschied

bei 7-OH-PPC ab. Für die beiden neu entdeckten Metabolite M1 (2'-OH-PPC) und M2 gibt es offensichtlich in Bezug auf die stereoselektive Bildung keinen Unterschied zwischen verschiedenen CYP2C9-Genotypen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass der Einfluss des CYP2C9-Genotyps auf die stereoselektive Hydroxylierung von Phenprocoumon von 7-OH-PPC über 6- und 4'-OH-PPC bis zu 2'-OH-PPC und M2 immer weiter abnimmt. Dies ist im Einklang mit in-vitro-Daten, die zeigen, dass 6- und 7-OH-PPC v.a. über CYP2C9, 4'-OH-PPC jedoch auch über CYP3A4 und CYP2C8 gebildet werden [29,75]. CYP3A4 und CYP2C8 existieren ebenfalls in polymorphen Formen (www.imm.ki.se/CYPalleles), ihr Einfluss auf den Metabolismus von Phenprocoumon ist bis dato jedoch nicht im Detail untersucht.

Die Bildung von 2'-OH-PPC und M2 erfolgt zwar hochstereoselektiv, das R/S-Verhältnis ist jedoch offensichtlich unabhängig vom CYP2C9-Genotyp. Dies deutet darauf hin, dass entweder CYP2C9 in diesen beiden Fällen nur eine untergeordnete oder gar keine Rolle spielt, sondern ein nicht-polymorphes Cytochrom hauptsächlich an diesen Reaktionen beteiligt ist, oder CYP2C9 zwar involviert ist, jedoch mit einer enzymatisch aktiven Region, die von Polymorphismen nicht beeinflusst wird. Genaueres kann nur durch die in-vitro-Untersuchung der beim Metabolismus des Menschen beteiligten Cytochrom-P-450 Enzyme im Hinblick auf die Bildung von 2'-OH-PPC und M2 herausgefunden werden (z.B. durch Blockade mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene CYP's oder schrittweise Ausschaltung mittels spezifischer chemischer Inhibitoren).

Das gegenüber Warfarin geringere Interaktionspotential von Phenprocoumon [79-81] könnte u.a. also damit erklärt werden, dass Phenprocoumon durch verschiedene CYP's zu mindestens fünf Metaboliten verstoffwechselt wird, so dass die Beeinflussung eines Abbauwegs z.B. durch gleichzeitige Verabreichung eines Enzyminduktors oder -inhibitors weniger ins Gewicht fällt. Zwar lassen sich die neu entdeckten Metabolite ohne synthetische Standards nicht genau quantifizieren – durch Vergleich der Peakgrößen lässt

sich aber abschätzen, dass deren Konzentration im Plasma in der Größenordnung der bekannten Metabolite liegt. Dieser alternative Abbauweg kann somit bei verminderter Bildung anderer Metabolite durch CYP2C9 durchaus von Bedeutung sein.

Letzten Endes sollte jedoch nicht vergessen werden, dass der Einfluss von Distribution, Konjugation und Elimination auf die enantiospezifische Pharmakokinetik von Phenprocoumon noch nicht umfassend untersucht ist. Die gefundenen R/S-Metaboliten-Verhältnisse könnten demnach auch eine Folge stereoselektiver Konjugation, wie sie für andere Verbindungen gezeigt werden konnte [82-85], oder unterschiedlich schneller Elimination der Enantiomere sein. Selbst wenn der Metabolismus von Phenprocoumon stereoselektiv und nicht-stereoselektiv bis ins Letzte geklärt wäre, hätte dies jedoch vermutlich nur wenig Auswirkung auf die Therapie, da die Metabolite im Plasma nur maximal in ca. 50-fach geringerer Konzentration vorliegen als die Muttersubstanz selbst und die hydroxylierten Verbindungen höchstwahrscheinlich pharmakodynamisch kaum aktiv sind [86] – für die Warfarin-Alkohole konnte jedoch eine gewisse antikoagulatorische Wirksamkeit gezeigt werden [87]. Abschließend müsste dies noch durch pharmakologische Experimente mit den synthetisierten Metaboliten überprüft werden. Dennoch können derartige Untersuchungen dazu beitragen, die metabolisierenden Systeme im menschlichen Körper besser zu verstehen und Parallelen für ähnliche Fälle aufzuzeigen.

3 Piritramid – Pharmakokinetik und Metabolismus beim Kind und Erwachsenen

3.1 Einleitung

3.1.1 Pharmakodynamik

Piritramid ist ein mit Morphin vergleichbares Narkoanalgetikum mit voller μ -Rezeptor-Agonisten Wirkung [8] und zählt wie Pethidin (alte Bez.: Meperidin) und Phenoperidin zu den Isonipecotin-Derivaten (Abb. 3.1). Es wird v.a. in Deutschland, Belgien, den Niederlanden und Osteuropa als das Analgetikum der Wahl bei postoperativem Schmerz eingesetzt [88]. Die in den Jahren nach dessen Einführung aufgestellten Behauptungen bezüglich eines günstigeren Nebenwirkungsprofils verglichen mit Morphin (weniger Nausea und Erbrechen, geringere Atemdepression) konnten in neueren Studien jedoch nicht gestützt werden [88]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen aufgrund zentraler bzw. peripherer Opiatwirkung dosisabhängige Sedation, Diaphoresis, Harnretention, Miosis sowie des Weiteren Thrombophlebitis. Piritramid wird sowohl intravenös als auch intramuskulär verabreicht und kommt in der Patienten-kontrollierten Analgesie (PCA) bei Erwachsenen und Kindern zum Einsatz [89,90].

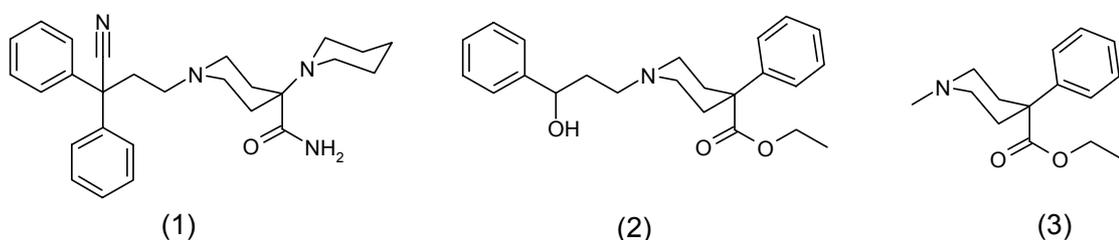


Abb. 3.1: Strukturformeln von (1) Piritramid, (2) Phenoperidin und (3) Pethidin

3.1.2 Pharmakokinetik: Stand des Wissens

Bis Anfang der 90er Jahre findet sich keine veröffentlichte Arbeit, die sich mit der Pharmakokinetik von Piritramid beschäftigt. Ein Grund hierfür liegt sicherlich in einem bis dahin bestehenden Mangel an ausreichend sensitiven Messmethoden. Erst Kietzmann et al. [91] publizierten 1996 Pharmakokinetik-Daten von 10 erwachsenen Patienten nach Piritramid-i.v.-Bolusinjektion. Das mittlere Verteilungsvolumen im Steady-State (V_{ss}) war 4.7 (SD 0.7) l/kg, die Gesamtkörperclearance 6.3-8.9 ml/kg/min, die terminale Halbwertszeit 478 (SD 85) min. Die renale Clearance spielt mit 0.13 (SD 0.09) ml/min/kg eine stark untergeordnete Rolle. Sowohl diese als auch eine spätere Studie der gleichen Arbeitsgruppe zur Ermittlung populationspharmakokinetischer Parameter [92] zeigen, dass der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf am besten mit einem linearen Drei-Kompartiment-Modell beschrieben werden kann und Piritramid extensiver Verteilung bei langsamer Elimination unterliegt. Über die Metabolisierung von Piritramid ist bisher nichts publiziert.

3.1.3 Problemstellung

Sämtliche bekannte Pharmakokinetik-Daten beziehen sich auf Erwachsene, Piritramid wird aber im klinischen Alltag schon bei nur wenige Monate alten Kindern allgemein zur Schmerzbehandlung peri- und postoperativ eingesetzt, obwohl es zur Anwendung erst ab einem Alter von über einem Jahr zugelassen ist [93]. Weder über die Pharmakokinetik dieses Arzneimittels innerhalb dieser Population noch über mögliche Veränderungen der Verstoffwechslung durch Reifungsvorgänge während der frühkindlichen Entwicklung ist etwas bekannt. Vereinzelt schwere Zwischenfälle bei Kindern mit Todesfolge werden mit der langen Wirkdauer und der damit verbundenen Gefahr der Akkumulation in Verbindung gebracht, ohne dass es hierzu jedoch gesicherte Erkenntnisse gäbe. Ziel der hier durchgeführten klinischen Studie ist daher die Ermittlung der Pharmakokinetik bei Kindern und der Metabolisierung von Piritramid durch Messung der Plasma- und Urinkonzentrationen der Ausgangssubstanz sowie die strukturelle Aufklärung von

Metaboliten. Zu diesem Zweck wurde jeweils eine Methode zur schnellen quantitativen Messung von Piritramid aus Plasma und Urin mittels LC-MS-Kopplung entwickelt. Die Strukturaufklärung der Metabolite erfolgte über LC-Ion-Trap- und -Triple-Quadrupol-MS-Analyse von Urin und Mikrosomeninkubationsproben.

3.2 LC-MS-Analytik von Piritramid aus Plasma und Urin

3.2.1 Übersicht über publizierte Analytik

Piritramid befindet sich zwar schon seit über 30 Jahren im Handel, dennoch gibt es nur eine sehr überschaubare Anzahl an Arbeiten, die sich mit der Konzentrationsbestimmung in biologischen Matrices beschäftigen. Eine Übersicht darüber ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Übersicht bioanalytische Methoden für Piritramid

Methoden	Matrix	weitere Details	Literatur
Gaschromatographie	Serum, Serumwasser	keine Angaben	Wiesner, 1991 [94]
Gaschromatographie	Plasma	LL-Extraktion, 3.75-2250 ng/ml, LOD 1-2 ng/ml	Michaelis, 1991 [95]
HPLC	Plasma	LL-Extraktion, 3.75-3000 ng/ml, LOD 3 ng/ml	Michaelis, 1991 [96]
HPLC	Plasma	LL-Extraktion, 0.5-2.5 µg, LOD ?; keine genaueren Angaben, Artikel in polnisch	Misztal, 1991 [97]
HPLC-MS (Ionenfalle)	Serum	LL-Extraktion, 1-80 ng/ml, LOD 0.3 ng/ml	Martens, 2003 [98]

Des Weiteren wurde Piritramid auch als interner Standard zur Bestimmung anderer Substanzen eingesetzt [99], was aber für die Fragestellung hier nicht von Belang ist.

3.2.2 Probenvorbereitung

Es ist zu erwarten, dass Bestandteile der Probenmatrices Plasma und Urin zum einen die Analytik stören könnten (Peaks mit gleicher oder überlappender Retentionszeit und dadurch evtl. Ionisationbeeinflussung in der ESI) und zum anderen zu wesentlich größerem

Verschleiß der HPLC-Säule führen, was den zusätzlichen Zeitaufwand für die Probenvorbereitung unbedingt sinnvoll macht. Prinzipiell stehen die folgenden Möglichkeiten zur Verfügung: Zentrifugation zur Abtrennung partikulärer Verunreinigungen bzw. Proteinfällung mittels organischer Reagenzien und ebenfalls anschließender Zentrifugation im einfachsten Fall, Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion als methodisch aufwendigere Verfahren.

Probenvorbereitung für Plasma:

Nach ersten Tests zeigte sich, dass die Festphasenextraktion gegenüber der bisher vorwiegend angewendeten Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe Übersicht über analytische Methoden), bei mindestens vergleichbarer Extraktionseffizienz bedeutend schneller und einfacher durchzuführen ist. Piritramid besitzt zwei protonierbare Stickstoff-Atome ($pK_{s1}=5.4$, $pK_{s2}=7.3$ [100]) und bietet sich damit für die Extraktion mittels Mischphasen-Kationenaustauscher-Materials (Waters® Oasis MCX: funktionalisiertes Copolymer mit schwachem Kationenaustauscher) an. Die Probe wird hierbei von Proteinen, Salzen, stark polaren sowie sauren unpolaren Komponenten gereinigt. Eine Aufkonzentrierung findet letzten Endes bei der hier eingesetzten Methode nicht statt.

Probenvorbereitung für Urin:

Die für Plasma gewählte off-line Extraktionsmethode wäre mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auch für Piritramid in Urin geeignet, besitzt aber gegenüber einer automatisierten on-line-Festphasenextraktion (on-line-SPE) immer noch den Nachteil höheren Zeitaufwands und damit verbunden geringeren Probendurchsatzes. On-line-SPE-Methoden, gerade in Verbindung mit massenspektrometrischer Detektion haben in den letzten Jahren ein breites Anwendungsfeld gefunden [101-114]. Das Prinzip beruht darauf, dass nach keiner oder minimaler Probenvorbereitung die "Rohprobe" durch einen Wascheluenten mit hohem Wasseranteil auf eine Reinigungssäule transportiert wird, wo makromolekulare Anteile und Salze entfernt werden, während der Analyt (und

Verbindungen mit ähnlicher Polarität) zurückgehalten wird. Anschließend wird der Analyt mittels eines Eluenten mit höherer Elutionskraft entweder direkt ohne weitere Trennung ins MS transportiert (sog. one-column-approach) oder für zusätzliche chromatographische Trennung auf eine analytische Säule und dann ins MS gespült (sog. two-column-approach). Für die Quantifizierung von Piritramid in Urin wurde der letztere Ansatz gewählt, da er mehr Möglichkeiten bietet, evtl. koeluierende Substanzen durch Veränderung der Chromatographie auf der analytischen Säule abzutrennen. Das Prinzip der eingesetzten Zwei-Säulenschaltung ist in Abb. 3.2 dargestellt. Zusätzlich zur on-line-Aufreinigung wird die Probe vorher noch mit dem gleichen Volumen Acetonitril gemischt und zentrifugiert, zum einen, um Bindungen an Proteine komplett aufzuheben, zum anderen um Partikel, die die Haltbarkeit der on-line-Reinigungssäule drastisch verringern würden, zu beseitigen.

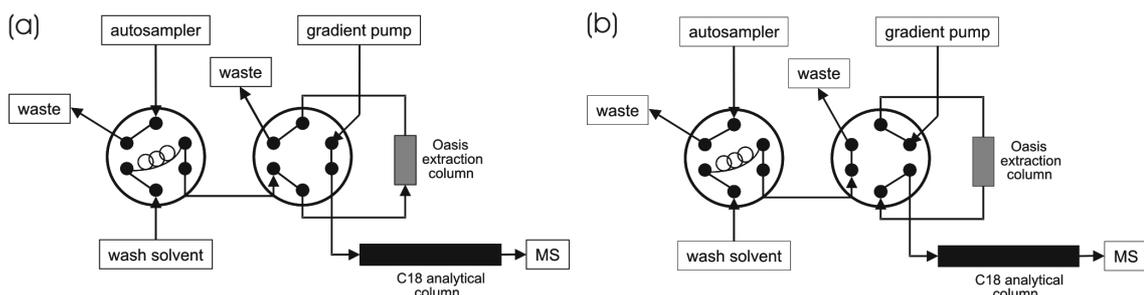


Abb. 3.2: Schema on-line-SPE-LC-MS/MS; a) Schritt 1: Probeninjektion und Reinigung auf der Oasis HLB-Säule; b) Rückelution auf die analytische Säule und MS-Detektion

Die Anwendbarkeit dieser on-line-SPE Methode wurde anhand der Parameter Selektivität und Linearität auch für die Bestimmung von Piritramid aus Plasma getestet.

3.2.3 Chromatographische Trennung

Piritramid in Plasma: Für die Messung von Piritramid in Plasma (nach off-line-SPE Probenvorbereitung) wurde eine isokratische Methode mit einem Wasser / Acetonitril / Ameisensäure-Eluenten (70/30/0.1) gewählt, wodurch die Analysendauer auf 4.2 min begrenzt bleibt. Nach jeder Plasmaprobe werden 100 µl reines Lösungsmittel (Methanol/ Acetonitril/Wasser/Ameisensäure – 40/40/20/0.1) injiziert und für 2 min chromatographiert,

um Probenverschleppung zwischen zwei Plasmaproben zu minimieren. Repräsentative Chromatogramme einer Blankprobe, einer Probe am LOD und LOQ sowie einer Patientenprobe sind in Abb. 3.3 zu sehen.

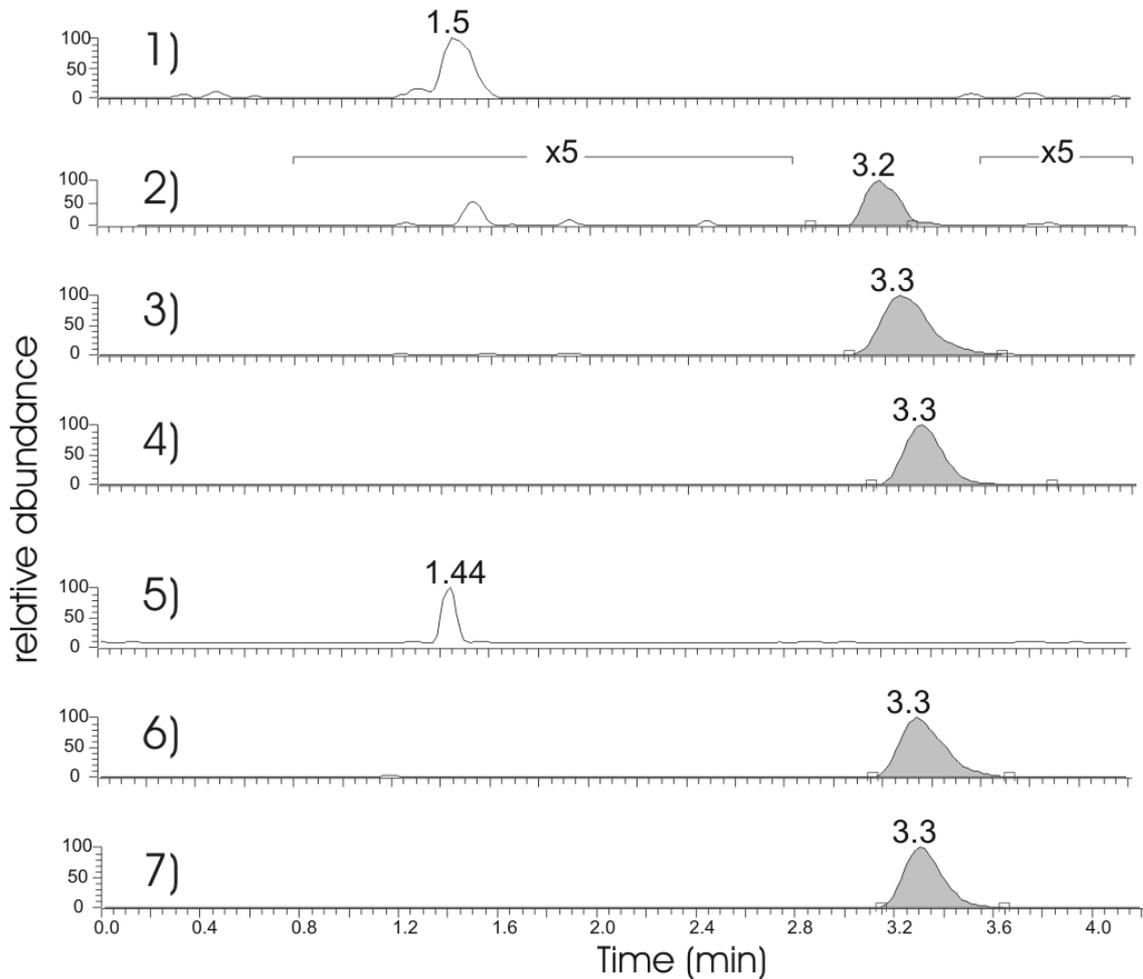


Abb. 3.3: Piritramid in Plasma: SRM-Spur für Piritramid (m/z 431→346+98): 1) Blankplasma, 2) LOD (0.05 ng/ml), 3) LOQ (0.5 ng/ml), 4) Patientenprobe; SRM-Spur für D4-Piritramid (m/z 435→350+98): 5) Blankprobe, 6) Blank+IS, 7) Patientenprobe+IS

Piritramid in Urin (on-line-Methode): Isokratische Elution analog zur oben beschriebenen Methode wäre prinzipiell möglich, jedoch würde dies zu einer deutlichen Peakverbreiterung führen, weil Piritramid erst noch von der on-line-Reinigungssäule desorbiert werden muss, bevor es auf die analytische Säule gelangt, außerdem besteht dann die Gefahr, dass der Analyt mit dem Großteil der sonst noch vorhandenen (unerwünschten) Komponenten gleichzeitig eluiert wird. Dieses Problem lässt sich mittels eines relativ steilen Gradienten aus Wasser+0.1% Ameisensäure und Acetonitril+0.1% Ameisensäure leicht beseitigen. Wie

sich bei den Patientenproben gezeigt hat, eluieren tatsächlich bis zu zwei weitere Verbindungen zeitnah mit Piritramid, welche trotz der selektiven massenspektrometrischen Detektion in der Spur von Piritramid bzw. dem internen Standard D4-Piritramid erscheinen. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Metabolite von Piritramid, die nach der Ionisierung durch in-source-collision bedingte Fragmentierung die gleiche Masse wie Piritramid und der interne Standard besitzen. So besitzt das dritte Isomer des Dehydro-Piritramid-Metaboliten die gleiche Masse wie Piritramid selbst und liefert bei der Fragmentierung ebenfalls das Fragment m/z 98. Durch eine Verlängerung des Gradienten auf 7 min konnte eine Basislinientrennung der Analyte und störender Peaks erreicht werden. (Chromatogramme siehe Abb. 3.4).

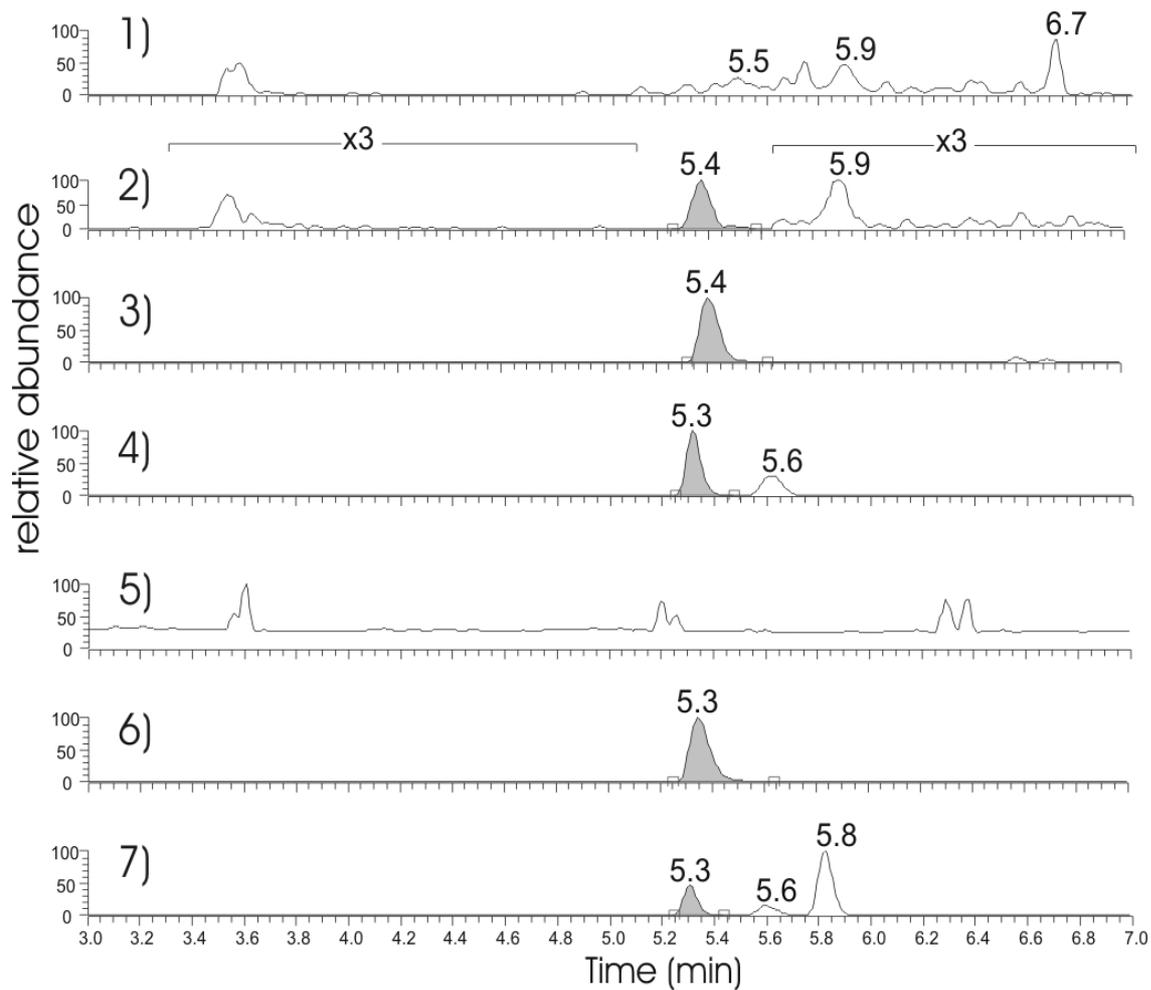


Abb. 3.4: Piritramid in Urin: SRM-Spur von Piritramid (m/z 431 \rightarrow 346+98): 1) Blankprobe, 2) LOD (0.05 ng/ml) 3) LOQ (0.5 ng/ml), 4) Patientenprobe – und D4-Piritramid (m/z 435 \rightarrow 350+98): 5) Blank, 6) Blank+IS, 7) Patientenprobe+IS

Piritramid in Plasma (on-line-Methode): Die chromatographischen Bedingungen entsprechen genau denen bei Urin. Anders als bei Urinproben trat hier lediglich in der Spur des internen Standards ein weiterer Peak auf, der aber aufgrund der Basislinientrennung vom Peak des internen Standards für die Anwendbarkeit der Methode keine Rolle spielt. Chromatogramme siehe Abb. 3.5.

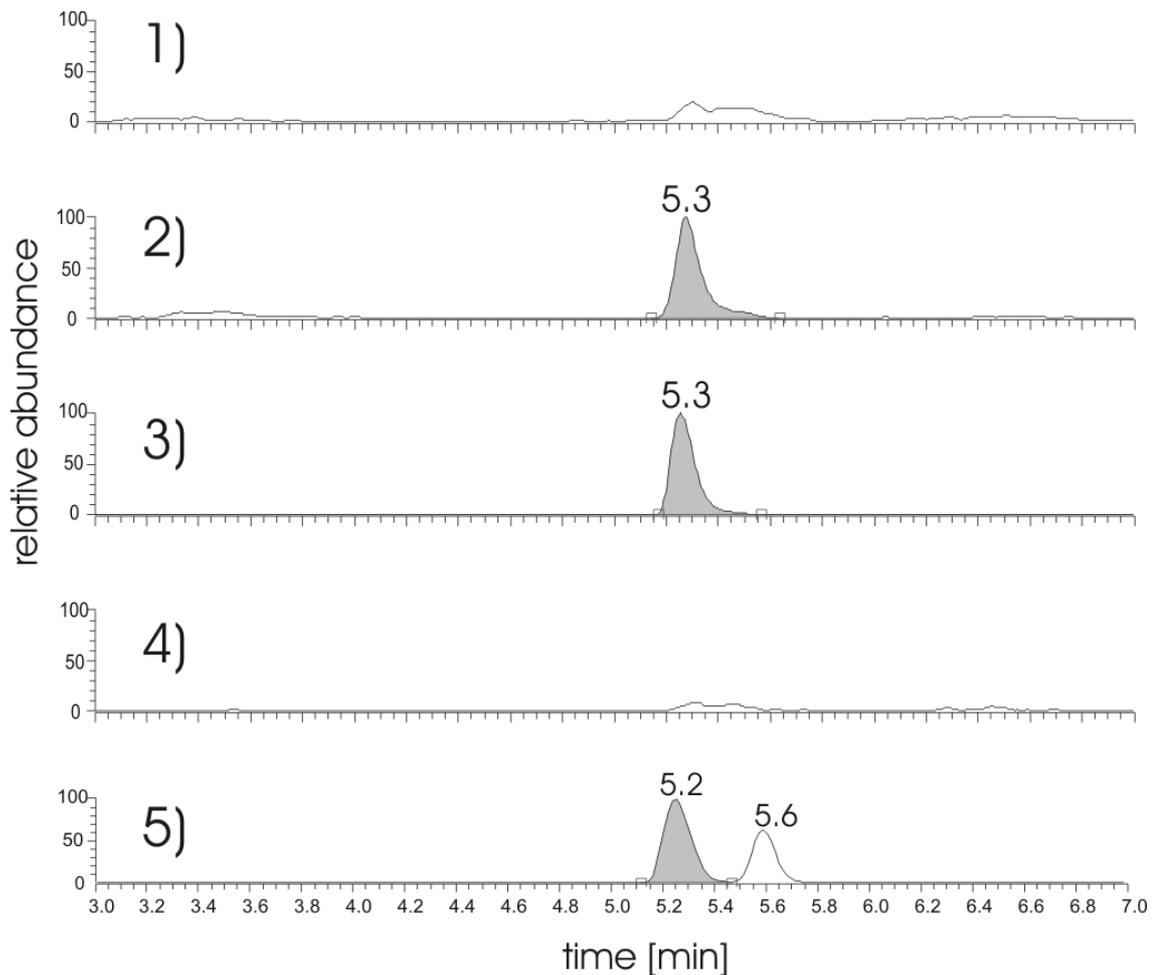


Abb. 3.5: Piritramid in Plasma (on-line-SPE-LC-MS/MS); SRM-Spur von Piritramid (m/z 431 \rightarrow 346+98): 1) Blankprobe, 2) LOQ (0.5 ng/ml), 3) Patientenprobe – und von D4-Piritramid (m/z 435 \rightarrow 350+98): 4) Blankprobe, 5) Patientenprobe+IS

3.2.4 MS-Detektion

Piritramid als eher basische Verbindung eignet sich gut für die Detektion mittels positiver Elektrospray-Ionisation, es wird folglich ein einfach protoniertes Piritramid als ionisierte Spezies gebildet. Das CID-MS/MS-Spektrum von Piritramid mit den postulierten Fragmenten ist in Abb. 3.6 dargestellt. Für die Quantifizierung im Selected Reaction Monitoring-Modus wurden die zwei intensivsten Fragmente herangezogen. Deren Intensitätsmaxima wurden ermittelt, indem bei konstanter Infusion der Analytenlösung über eine Spritzenpumpe die Kollisionsenergie von 0 bis 50 V erhöht wird und dabei die Spannung registriert wird, bei der das jeweilige Fragment die größte Intensität aufweist.

Dies ist bei Piritramid für das 346er Fragment bei 26 V, für das 98er Fragment bei 38 V und bei D4-Piritramid analog für das 350er und 98er Bruchstück ebenfalls bei 26 und 38 V der Fall.

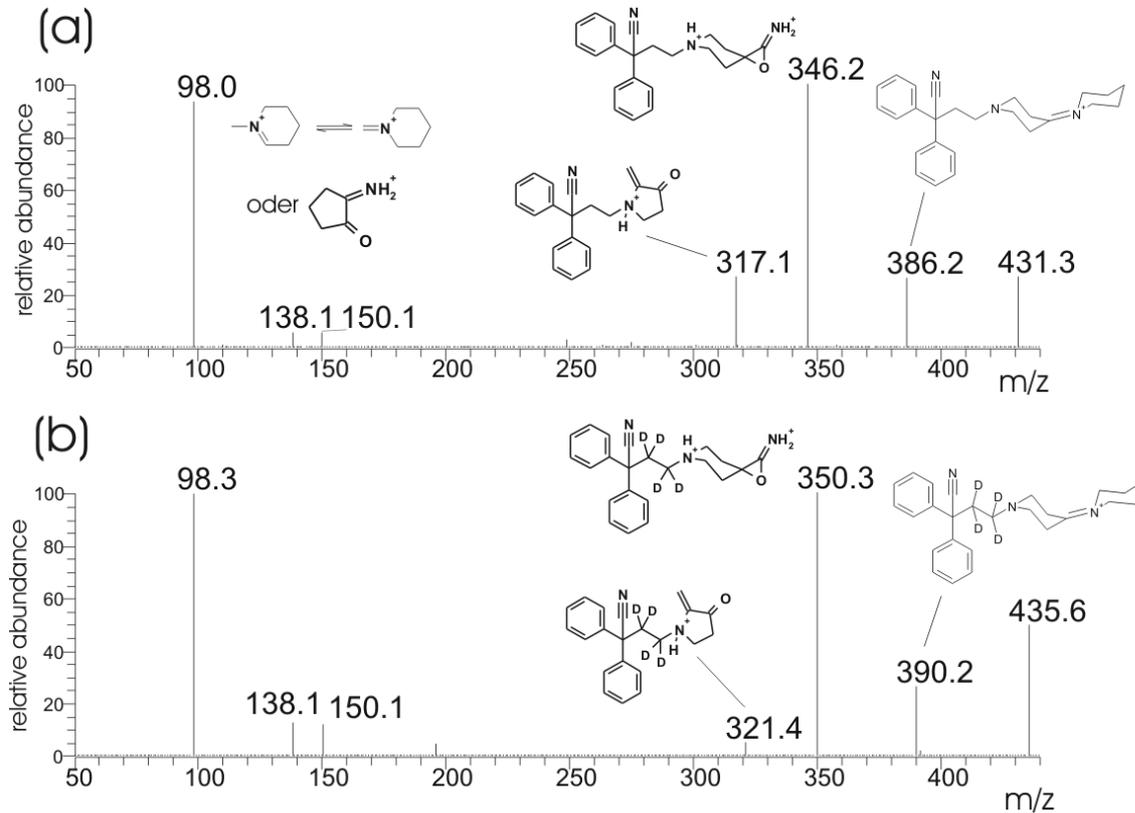


Abb. 3.6: CID-MS/MS Spektren von Piritramid (a) und D4-Piritramid bei 25 V, jeweils mit den postulierten Fragmenten

3.2.5 Methodvalidierung

3.2.5.1 Selektivität, Detektionslimit, Linearität

Off-line-SPE-Methode für Plasma: Die Selektivität des Assays wurde überprüft, indem sechs verschiedene Blankplasmaproben extrahiert und gemessen wurden. Bei keiner der Proben traten zur Retentionszeit von Piritramid bzw. des internen Standards störende Signale auf. Ebenso wurde pre-dose Patientenplasma ohne Zugabe von internem Standard analysiert; auch hier eluieren zum kritischen Zeitpunkt keine weiteren Peaks. Als

Detektionslimit wurde die Konzentration definiert, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mind. bei 3:1 liegt. Dies ist ab 0.05 ng/ml (S/N ca. 5:1) der Fall. Die Methode ist linear im überprüften Bereich von 0.5 bis 100 ng/ml, überprüft durch Dreifachmessung unabhängiger Kalibrierreihen (Kalibrierkonzentrationen: 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 100 ng/ml; Achsenabschnitt: 0.0215; Steigung: 0.2349; R^2 : 0.9988; ermittelt über lineare Regression der kleinsten Abweichungsquadrate mit einer Messwert-Gewichtung von $1/x$) (Chromatogramme siehe Abb. 3.3).

On-line-SPE-Methode für Plasma: Die selbe analytische Methode wurde für die Bestimmung von Piritramid aus Plasma mittels on-line-SPE-LC-MS/MS eingesetzt, mit dem Ergebnis, dass zwar in der Spur von D4-Piritramid ein weiterer Peak auftritt, der allerdings aufgrund ausreichender chromatographischer Trennung die Messung nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.5). Um welche Verbindung es sich hierbei handelt (z.B. Piritramid-Metabolit oder endogene Substanz), konnte nicht ermittelt werden. Das Detektionslimit wurde hier nicht ermittelt, dürfte aber wie bei der Bestimmung aus Urin bei ca. 0.05 ng/ml liegen. Die Linearität wurde ebenfalls im Bereich 0.5 – 100 ng/ml mit den gleichen Kalibrierkonzentrationen wie bei der off-line-Methode ermittelt (Achsenabschnitt: 0.0153; Steigung: 0.0591; R^2 : 0.9977). Alle gemessenen Standards lagen innerhalb der zulässigen Grenzwerte von ± 20 % Abweichung vom Sollwert für die unterste Konzentration und ± 15 % für alle weiteren Konzentrationen.

On-line-SPE-Methode für Urin: Die Durchführung ist analog zu der bei Piritramid aus Plasma. Hier treten jedoch in der Spur von Piritramid bei Patientenproben ein weiterer, in der Spur von D4-Piritramid bis zu zwei weitere Peaks auf. In beiden Fällen eluieren diese Verbindungen basisliniengetrennt nach dem Zielanalyten, so dass die Methode für Urin ebenfalls ausreichende Selektivität besitzt. Das Detektionslimit mit einem S/N-Verhältnis von ca. 3:1 liegt bei 0.05 ng/ml. Die Methode erwies sich als linear im getesteten Bereich

von 0.5 – 100 ng/ml (Achsenabschnitt: 0.0121; Steigung: 0.0631; R^2 : 0.9992) und erfüllte auch die oben genannten maximal erlaubten Abweichungskriterien.

3.2.5.2 Extraktionsausbeute

Off-line-SPE, Plasma: Die Extraktionsausbeute mittels Oasis MCX-Festphasenextraktionskartuschen aus mit Piritramid gespikten Plasmaproben wurde bei vier verschiedenen Konzentrationen überprüft (10, 25, 50, 100 ng/ml). Diese Proben wurden extrahiert, der Extrakt vor der Analyse mit internem Standard aufgestockt und anschließend gegen Standards in Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (70/30/01) mit den gleichen nominellen Konzentrationen an Piritramid und D4-Piritramid gemessen. Die Ausbeute wurde errechnet als Verhältnis [(Peak-Fläche Piritramid/Peak-Fläche IS) nach Extraktion / (Peak-Fläche Piritramid/Peak-Fläche IS) der Standards] in Prozent. Ergebnis: 90.7 ± 2.4 % (Mittelwert \pm SD) (10 ng/ml), 100.0 ± 1.6 % (25 ng/ml), 99.6 ± 1.6 % (50 ng/ml), 95.3 ± 2.4 % (100 ng/ml).

On-line-SPE, Urin/Plasma: Für on-line-SPE-Verfahren lässt sich die Extraktionsausbeute nicht ohne weiteres bestimmen, da hierfür die Trennung von Extraktionsschritt und eigentlicher Messung notwendig ist (IS wird *nach* Extraktion, aber *vor* der Analyse zugefügt). Diese beiden Schritte sind bei on-line-Assays gekoppelt. Eine Möglichkeit besteht nun darin, Peakflächen von Standards bekannter Konzentration ohne Extraktion mit denen extrahierter Proben der gleichen Konzentration ohne den Einsatz eines IS direkt zu vergleichen [110]. Dies funktioniert allerdings nur dann, wenn der Analyt eine für UV-Detektion bei niedrigen Konzentrationen genügend große Absorption besitzt und der Peak chromatographisch sauber ohne Interferenzen eluiert. Eine andere Möglichkeit ist die Messung der absoluten Radioaktivität vor und nach der on-line-Extraktion [115], was die Verfügbarkeit von radioaktiv markierten Analyten voraussetzt. Beide Voraussetzungen sind in diesem Fall nicht gegeben, eine genaue Bestimmung der Extraktionsausbeute ist somit nicht möglich.

3.2.5.3 Einfluss von Matrixeffekten

Bei LC-MS Messungen, insbesondere wenn es sich bei den Proben um biologische Matrices handelt, besteht prinzipiell immer die Möglichkeit, dass mit dem zu messenden Analyten gleichzeitig Komponenten eluieren, die das Analytsignal verstärken oder aber häufiger durch Ionisationssuppression abschwächen.

Off-line-Methode, Plasma: Um einen solchen signifikanten Effekt (mehr als 15 % Abweichung vom Nominalwert) auszuschließen, wird Blankmatrix (Plasma bzw. Urin) extrahiert und vor der Injektion mit einer bekannten Menge Piritramid und D4-Piritramid versetzt. Diese Proben werden mit direkt injizierten Standards der gleichen Konzentration ohne Probenmatrix verglichen. Folgendes Ergebnis zeigt sich bei den vier gemessenen Konzentrationen (jeweils in Dreifachbestimmung): 94.6 ± 0.6 % (Mittelwert \pm SD) (10 ng/ml), 113.2 ± 0.7 % (25 ng/ml), 99.3 ± 1.3 % (50 ng/ml), 100.6 ± 2.5 % (100 ng/ml). Ein signifikanter Matrixeinfluss kann folglich ausgeschlossen werden.

On-line-Methode, Urin: Für die Ermittlung von Matrixeffekten wurde hier ein anderer Ansatz gewählt, der in seiner Aussagekraft aber vergleichbar ist. Piritramid wird mit einer konstanten Flussrate über ein T-Stück nach der analytischen Säule und vor dem ESI-Interface dem Eluentenstrom zugeführt, so dass bei der Detektion eine angehobene Basislinie resultiert. Eine Blankurinprobe ohne Zusatz von Piritramid oder internem Standard wird nun durch den Autosampler injiziert und wie eine normale Probe analysiert. Die erhöhte Basislinie wird nun zu der Zeit absinken (oder ansteigen), zu der die meisten Matrixbestandteile von der Säule eluieren und das Analytsignal unterdrücken (oder anheben). Wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist, findet diese Ionisationssuppression deutlich vor der Elution von Piritramid bzw. D4-Piritramid statt, so dass eine wesentliche Beeinflussung nicht stattfindet.

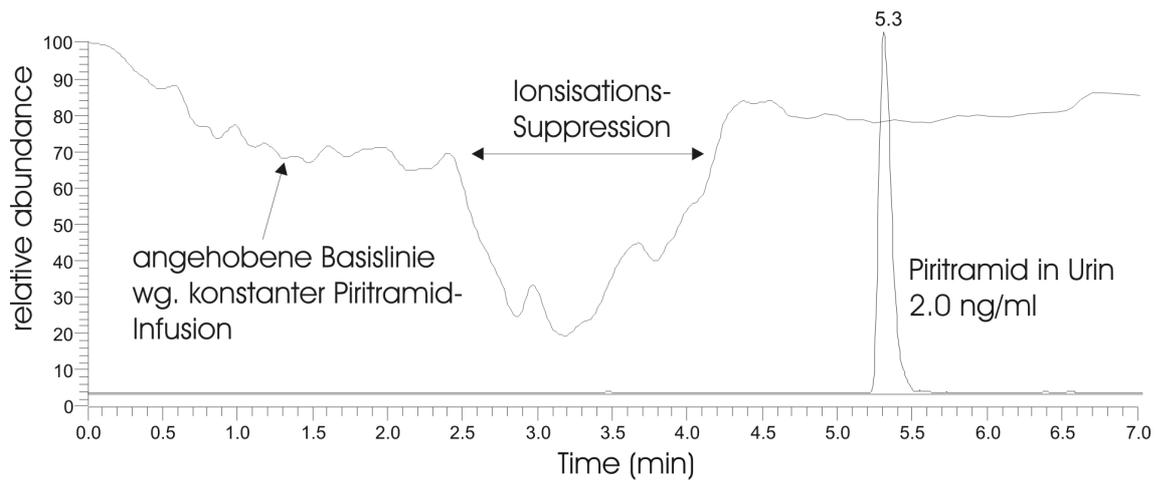


Abb. 3.7: Einfluss von Matrixeffekten bei der Bestimmung von Piritramid aus Urin mittels Nachsäulen-Infusionsexperiment; obere Spur: Ionensuppression der erhöhten Basislinie durch Injektion von Blankurin, untere Spur: Piritramid 2.0 ng/ml

3.2.5.4 Einfrier-/Auftau- und Langzeitstabilität

Piritramid in Plasma: Die Einfrier-/Auftau-Stabilität von Piritramid in Plasma wurde überprüft, indem frisch hergestellte Qualitäts-Kontroll-Proben (QC's) (1.5, 40, 80 ng/ml, jeweils dreifach) über Nacht bei -20°C eingefroren und am Folgetag für 2 h bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Nach dem 3. Zyklus wurden die Proben zusammen mit einer Kalibrierreihe gemessen. Keine der Proben wich vom Sollwert um mehr als -9 bzw. $+2$ % ab. Zur Bestimmung der Langzeitstabilität wurde die gleiche Anzahl an QC-Proben bei -20°C für 13 Monate eingefroren und anschließend mit frisch hergestellten Kalibrierproben analysiert. Alle mittleren Konzentrationen lagen innerhalb der zulässigen Abweichung von ± 15 % (1.5 ng/ml: -13.3 ± 5.9 % (Mittelwert \pm SD), 40 ng/ml: -10.1 ± 5.0 %, 80 ng/ml: -10.7 ± 5.3 %). Obwohl damit über den untersuchten Zeitraum gerade noch ausreichende Stabilität gezeigt werden konnte, ist es zu empfehlen, die Plasmaproben bei -80°C für maximal 6 Monate zu lagern, da der Trend auf eine geringfügige Zersetzung hindeutet.

Piritramid in Urin: Die Stabilität in Urin wurde nach dem gleichen Schema wie für Plasma ermittelt, allerdings über eine Lagerdauer von 6 Monaten. Die maximalen Abweichungen lagen bei -7.6 und $+5.3$ % für die Einfrier-Auftau-Stabilität und -8.2 und $+5.0$ % für die Langzeitstabilität. Unter den spezifizierten Bedingungen ist Piritramid in Urin über eine Dauer von 6 Monaten ausreichend stabil.

3.2.5.5 Präzision und Richtigkeit

Intra- und Interbatch-Präzisions- und Richtigkeitsmessungen sowohl für die off-line-Methode zur Bestimmung aus Plasma als auch für die on-line-Methode zur Bestimmung aus Urin wurden mit QC-Proben dreier Konzentrationen (1.5, 40, 80 ng/ml) an drei separaten Tagen in sechsfach-Wiederholung durchgeführt. Die Präzision wurde als Variationskoeffizient sowohl innerhalb der einzelnen Tage als auch für alle drei Tage gesamt ausgerechnet, die Richtigkeit ergibt sich als prozentuale Abweichung vom Soll $[(\text{gemessene Konz.} - \text{Sollkonz.}) \times 100 / \text{Sollkonz.}]$. Details hierzu stehen in Tabelle 3.2 für Piritramid in Plasma und Tabelle 3.3 für Piritramid in Urin.

Tabelle 3.2: Intra- und Interbatch-Präzision und Richtigkeit für Piritramid aus Plasma

	intraday-variability			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
1.5 ng/ml				
mean	1.40	1.41	1.38	1.40
accuracy [%]	-6.55	-6.16	-7.89	-6.87
SD	0.03	0.03	0.08	0.05
CV [%]	2.27	2.27	6.10	3.80
40 ng/ml				
mean	38.88	37.72	38.06	38.22
accuracy [%]	-2.81	-5.69	-4.85	-4.45
SD	1.26	0.49	1.05	1.05
CV [%]	3.25	1.31	2.75	2.76
80 ng/ml				
mean	76.66	75.86	76.63	76.38
accuracy [%]	-4.17	-5.18	-4.21	-4.52
SD	1.23	1.51	1.41	1.36
CV [%]	1.61	1.99	1.84	1.78

Tabelle 3.3: Intra- und Interbatch-Präzision und Richtigkeit für Piritramid aus Urin

	intraday-variability			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
1.5 ng/ml				
mean	1.39	1.43	1.45	1.42
accuracy [%]	-7.58	-4.34	-3.12	-5.01
SD	0.02	0.01	0.01	0.04
CV [%]	1.68	0.45	3.46	2.94
40 ng/ml				
mean	38.78	39.82	39.43	39.34
accuracy [%]	-3.06	-0.45	-1.43	-1.65
SD	0.97	2.10	0.30	1.34
CV [%]	2.51	5.28	0.75	3.41
80 ng/ml				
mean	80.61	82.13	80.80	81.18
accuracy [%]	0.76	2.66	1.00	1.47
SD	1.32	3.27	5.18	3.47
CV [%]	1.63	3.99	6.41	4.28

3.2.5.6 Einfluss des Urin-pH-Werts

Während der Plasma-pH-Wert nur geringfügigen physiologischen Schwankungen unterliegt und außerdem H_3PO_4 (85 %) vor der Extraktion zugesetzt wird, kann hierfür der pH-Wert als schwankender Parameter ausgeschlossen werden. Anders verhält es sich bei Urinproben, die erstens größere pH-Schwankungen aufweisen können, und zu denen vor der Analyse keine Säure zur pH-Wert-Einstellung hinzugefügt wird. Daher wurden QC-Proben (1.5, 40, 80 ng/ml, n=3 pro Konz.) mit Blankurin hergestellt, der zuvor mit HCl (1 mol/l) bzw. KOH (1 mol/l) auf pH 6, 7 und 8 eingestellt wurde. Diese Proben wurden zusammen mit einer Kalibrierreihe analysiert. Keine der Proben wich um mehr als 15 % vom Sollwert ab (Maximum: +14.6 % bei 80 ng/ml, pH 6). Der pH-Wert innerhalb der getesteten Grenzen scheint somit nur einen geringen Einfluss auf das Messergebnis zu haben.

3.2.6 Vergleich der Plasma- und Urinmethode

Beide Methoden genügen den wesentlichen Anforderungskriterien wie sie für bionalytische Methoden z.B. in der FDA-Guidance for Industry "Bioanalytical Method

Validation" vorgesehen sind und eignen sich aufgrund eines ausreichenden Messbereichs für die Bestimmung von Proben aus Pharmakokinetik-Studien. Die off-line-SPE-LC-MS/MS-Methode zeichnet sich durch etwas kürzere Analysenzeiten aus (4.2 min für die Probenanalyse + 2.0 min für die anschließende Waschinjektion gegenüber 7.0 min + 1.5 min für die on-line-Messung). Dieser kleine Vorteil wird aber bei weitem kompensiert durch den wesentlich höheren Probendurchsatz der on-line-SPE-Methode. Off-line können maximal ca. 40 Proben pro Stunde vorbereitet werden, on-line (hier fällt die Probenvorbereitung praktisch weg) sind es ca. 100 Stück/h.

3.3 Messung der Piritramid-Studienproben

3.3.1 Studiendesign und Probennahme

Die Arbeiten im Rahmen dieser Studie erfolgten in Kooperation mit Frau Eva Dessecker, cand. med, Universitätsklinikum Tübingen. Teile dieser Arbeit wurden in die Dissertation von Frau Dessecker aufgenommen.

An der prospektiven klinischen Verlaufsstudie nahmen insgesamt 27 Patienten beiden Geschlechts im Alter von 6.4 bis 43.6 Monaten teil, deren Eltern nach vorheriger Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme ihrer Kinder an der Studie gegeben hatten. Einschlusskriterien waren zum einen das Alter (min. 6, ursprüngl. max. 36 Monate; Grenzen wurde aber im Verlauf der Studie wegen zu geringer Teilnehmerzahl ausgeweitet) und zum anderen eine geplante operative Korrektur eines kongenital oder neurogen bedingten Klumpfußes unter Standardanästhesie. Die Patienten erhielten im Rahmen der Operation 0.1 mg/kg KG Piritramid als i.v.-Bolusinjektion, Midazolam (1 mg/kg KG) als Prämedikation, Propofol-®Lipuro (10 mg/kg KG) zur Narkose sowie Jonosteril® päd III (6 ml/kg KG) zur Volumensubstitution während der Narkose. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Bupivacain 0.25% (0.5 ml/kg KG) über einen intraoperativ gelegten Kaudalkatheter. Aus einer zweiten Verweilkanüle am

kontralateralen Arm zur Infusionskanüle wurde zu den Zeitpunkten 0 (pre-dose), 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 und 360 min jeweils circa 1 ml Blut entnommen und daraus durch Zentrifugation unter Gerinnungshemmung der Plasmaanteil gewonnen. Während der Operation und bis zu 6 Stunden danach wurde mit einem aufgeklebten Urinbeutel Urin gesammelt. Urin konnte allerdings lediglich von 15 Patienten (darunter kein Mädchen) gesammelt werden, bei allen anderen löste sich der Beutel von der Haut. Plasma- und Urinproben wurden bis zur Analyse für eine maximale Dauer von 4 Monaten bei -80°C gelagert.

3.3.2 Pharmakokinetische Auswertung

Mit Hilfe des entwickelten LC-MS-Verfahrens wurden die Piritramidkonzentrationen im Plasma der Patienten ermittelt und die Plasmaspiegelkurven erstellt. Einen Eindruck über die Zeit-Konzentrations-Verläufe der 25 ausgewerteten Patienten gibt Abb. 3.8. Insgesamt waren 27 Patienten in die Studie eingeschlossen, jedoch wurden von einem (23/01 CK) gar keine Proben gesammelt, und bei einem weiteren (07/02 SW) waren einige der gemessenen Konzentrationen abnorm hoch (>200 ng/ml). Da auch Wiederholungsmessungen in diesem Falle zu extrem hohen und unreproduzierbaren Werten führten, wurden diese Ergebnisse ausgeschlossen. Zu beobachten waren bei den Proben dieses Patienten eine stark verzerrte Peakform sowohl für Piritramid als auch den internen Standard D4-Piritramid. Ursache waren vermutlich Matrixbestandteile oder exogene Substanzen, die sich störend auf die Detektion dieser beiden Verbindungen auswirkten, ohne dass dies weiter aufgeklärt werden konnte. Rückschlüsse auf eine abweichende Pharmakokinetik dieses Individuums sind somit nicht zulässig.

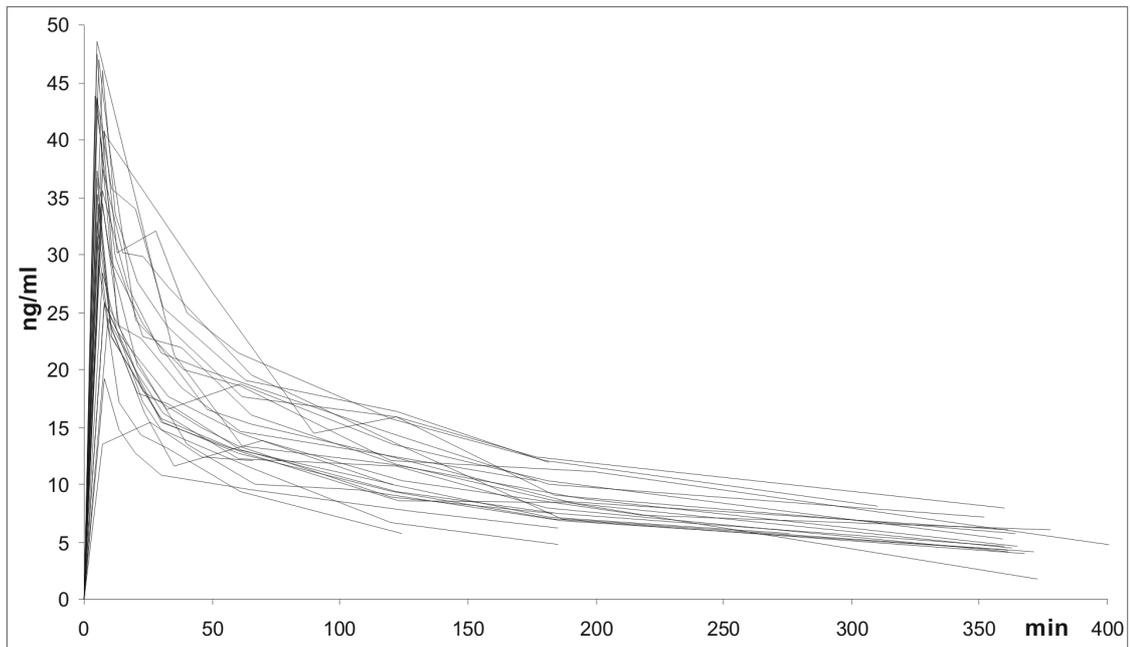


Abb. 3.8: Piritramid-Plasmaspiegelkurven (n=25) bei Kindern nach iv-Bolus von 0.1 mg/kg KG

Die Extremwerte liegen bei minimal 1.8 und maximal 48.6 ng/ml, es befinden sich somit alle ermittelten Werte innerhalb des Kalibrierbereichs von 0.5-100 ng/ml.

Pharmakokinetische Parameter für Piritramid:

Eine Übersicht über die in WinNonLin[®] durch kompartmentfreie Analyse berechneten pharmakokinetischen Parameter von Piritramid in Plasma aller eingeschlossenen Kinder ist in Tabelle 3.4 gegeben.

Tabelle 3.4: Pharmakokinetische Parameter für Piritramid in Plasma nach i.v.-Bolusgabe – berechnet mittels kompartmentfreier Analyse (NCA)

Code	Alter (Monate)	Dosis (mg)	λ_z (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	t_{max} (min)	C_{max} (ng/ml)	V_{ss} (l/kg)	CL (ml/kg/min)	AUC_{0-180} (min*ng/ml)	$AUC_{0-180}/Dosis$ (min/ml)
01/01	9.0	0.80	0.0051	134.7	5.0	47.4	4.97	26.87	2353.8	2.942
02/02	11.2	0.80	0.0028	244.3	7.0	35.5	4.44	13.27	3103.5	3.879
03/01	9.9	1.00	0.0038	181.3	7.0	46.0	4.04	16.26	3270.1	3.270
04/01	7.9	0.80	0.0042	166.8	8.0	40.7	3.76	16.05	3564.4	4.455
05/01	8.0	1.10	0.0024	285.3	7.0	40.9	4.18	11.32	3711.4	3.374
06/01	9.3	0.90	0.0030	229.7	5.0	31.6	6.27	20.83	2197.7	2.442
08/01	10.3	0.90	0.0061	114.2	26.0	15.4	6.29	36.56	1822.1	2.025
09/02	17.1	1.00	0.0034	202.5	7.0	28.4	6.13	22.57	2351.3	2.351
10/02	40.2	1.30	0.0078	88.9	5.0	43.5	3.17	24.06	2825.3	2.173
11/01	10.2	1.10	0.0036	192.1	8.0	19.3	8.06	29.47	1643.3	1.494
12/02	43.6	1.20	0.0038	182.8	5.0	48.6	4.24	18.30	2990.9	2.492
13/01	8.2	1.00	0.0090	77.1	6.0	29.0	5.58	52.01	1580.2	1.580
14/01	9.1	0.76	0.0031	225.6	7.0	34.5	5.17	16.53	2694.6	3.546
15/01	9.5	0.70	0.0047	148.0	8.0	25.9	5.44	25.89	2191.4	3.131
16/01	8.1	0.80	0.0040	175.2	5.0	43.6	3.63	15.20	3565.4	4.457
17/01	6.6	0.70	0.0071	97.1	8.0	25.7	5.36	39.50	1837.4	2.625
18/01	10.3	0.90	0.0034	206.9	6.0	34.5	6.06	22.12	2190.9	2.434
19/01	6.4	0.80	0.0042	164.6	5.0	35.2	5.32	23.11	2378.7	2.973
20/01	8.3	0.90	0.0026	263.9	4.0	43.8	5.44	15.89	2902.8	3.225
21/02	18.8	1.00	0.0031	224.3	5.0	36.6	6.69	22.52	2137.6	2.138
22/01	9.0	0.70	0.0036	193.1	6.0	46.9	3.90	15.58	3085.7	4.408
24/01	8.2	0.88	0.0044	159.1	7.0	37.5	3.95	19.64	3234.1	3.675
25/02	12.2	0.80	0.0020	347.0	9.0	24.4	7.36	15.14	2187.5	2.734
26/02	40.8	1.70	0.0039	176.0	5.0	37.3	4.14	17.06	2927.7	1.722
27/02	29.1	1.30	0.0029	235.0	5.0	32.9	6.03	19.49	2259.3	1.738
Mittelwert			0.0042	188.6	7.0	35.4	5.2	22.2	2600.3	2.851
SD			0.0017	62.4	4.2	8.9	1.2	9.2	617.8	0.887

Anm.: Die für EC, LS und SE berechneten AUC_{0-180} -Werte wurden durch Extrapolation gewonnen, da bei EC nur Proben bis 60 min, bei LS und SE bis 120 min gezogen wurden; $t_{1/2}$ steht hier für die "terminale" Halbwertszeit

Die Parameter wurden nach den folgenden Formeln berechnet [116]:

AUC:

$$AUC(t_0 - t_n) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (c_{i-1} + c_i) \times (t_i - t_{i-1}) \quad (3.1)$$

AUC: Area under the curve

t_0 : Zeitpunkt 0 min

t_n : letzter Messzeitpunkt

c_i : Plasmakonzentration der Probe i

t_i : Zeitpunkt der Probe i

terminale Halbwertszeit:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad (3.2)$$

terminale Eliminationskonstante:

$$\lambda_z = \frac{\ln C_{p1} - \ln C_{p2}}{t_2 - t_1} \quad (3.3)$$

C_{p1} , C_{p2} : Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt 1 bzw. 2

Gesamtplasmaclearance:

$$Cl = \frac{Dosis}{AUC_{0-\infty}} \quad (3.4)$$

Verteilungsvolumen im Steady-State:

$$V_{ss} = Cl \times MRT_{iv} = \frac{Dosis \times AUMC}{AUC^2} \quad (3.5)$$

MRT_{iv}: Mean Residence Time nach i.v.-Applikation
AUMC: Area under the Momentcurve

Ergebnisse der Urinanalytik:

Bei 15 Patienten wurde über einen Zeitraum von maximal 6.2 Stunden Urin gesammelt und dieser mittels LC-MS/MS auf die Piritramid-Konzentration hin analysiert. Bei keinem der Patienten wurde mehr als 1.75 % der i.v. verabreichten Dosis unverändert renal ausgeschieden (Details siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Daten zur renalen Elimination von Piritramid

Patienten-Code	Sammelzeitraum [h]	% der Dosis renal ausgeschieden
01/01	5.8	0.44
02/02	5.8	0.21
03/01	4.3	1.03
05/01	6.2	1.75
06/01	6.0	0.06
07/02	4.3	0.40
09/02	4.7	0.07
11/01	6.0	0.20
13/01	2.3	0.21
14/01	4.9	0.81
16/01	3.0	0.65
18/01	3.7	0.08
19/01	3.3	0.15
20/01	6.5	0.28
27/02	6.1	0.84

3.3.3 Vergleich Altersgruppe 1 und 2

Ziel der Studie war es, die altersabhängige Pharmakokinetik von Piritramid zu untersuchen. Ursprünglich sollten zwei Gruppen mit den Altersklassen 6-8 Monate und 1-3 Jahre gebildet werden. Da die Patientenrekrutierung streng nach diesem Schema nicht möglich war, und die größte Alterslücke zwischen 12 und 17 Monaten lag, wurden die Patienten zur Auswertung in die folgenden zwei Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 (n=19; Median 9.0, SD 1.46, Range 6.4-12.2 Monate) und Gruppe 2 (n=6; Median 34.7, SD 11.7, Range 17.1-43.6 Monate). Diese Populationen wurden hinsichtlich t_{\max} , C_{\max} , AUC_{0-180} und AUC_{0-180}/Dosis verglichen. Entwicklungspharmakologisch sind in dieser Phase keine sprunghaften Veränderungen zu erwarten, vielmehr unterliegen die am Metabolismus beteiligten Systeme sowohl des Phase-I als auch des Phase-II Metabolismus bei Kindern, abgesehen vom Extrem der Neugeborenenphase, einem kontinuierlichen Ausreifungsprozess [117,118]. Eine strikte Trennlinie kann somit kaum gezogen werden, was sich auch darin zeigt, dass in der Literatur für die Phasen vom Neugeborenen bis zum Jugendlichen verschiedene Aufteilungen zu finden sind: z.B. 1 Woche-2 Monate/2-6 Mon./6 Mon.-2 Jahre/2-12 J. [119]; Neugeborene/1 Mon. – 1 J./1-10 J. [117,118]; 0-27 Tage (term newborn infants)/28 Tage-23 Monate (infants+toddlers)/2-11 Jahre (children)/12-16 bzw. 18 J. (adolescents) [120] (gemäß International Conference on Harmonization).

Vergleich von t_{\max} und C_{\max} :

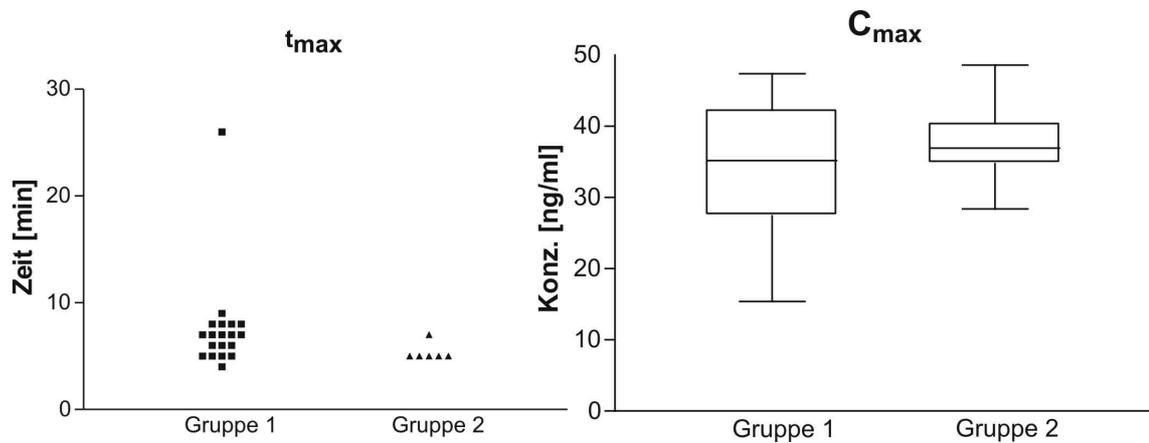


Abb. 3.9: Vergleich von t_{\max} und C_{\max} für Piritramid in Plasma bei Gruppe 1 und 2 (zu C_{\max} : Box=25.-75. Percentile, Whiskers: Minimum-Median-Maximum)

Zwischen den t_{\max} und C_{\max} -Werten der beiden Altersgruppen besteht offensichtlich kein wesentlicher Unterschied. Der Ausreißer bei t_{\max} (Patient 08/01 EC) kommt dadurch zustande, dass zwischen 7 und 26 min keine weiteren Blutproben genommen wurden, so dass höchstwahrscheinlich das tatsächliche Maximum verpasst wurde.

Vergleich von AUC_{0-180} und AUC_{0-180}/Dosis :

Da nur bei 17 von 25 Patienten bis 360 min Proben vorhanden waren, jedoch bei 22 Patienten bis 180 min, wurde das Flächenintegral von 0-180 min alleine bzw. auf die Dosis bezogen für einen Vergleich der beiden Altersgruppen verwendet. Bei den 3 Patienten, die nur Daten bis 60 (1x) bzw. 120 min (2x) aufweisen, wurden die fehlenden Werte per Extrapolation mittels λ_z ermittelt.

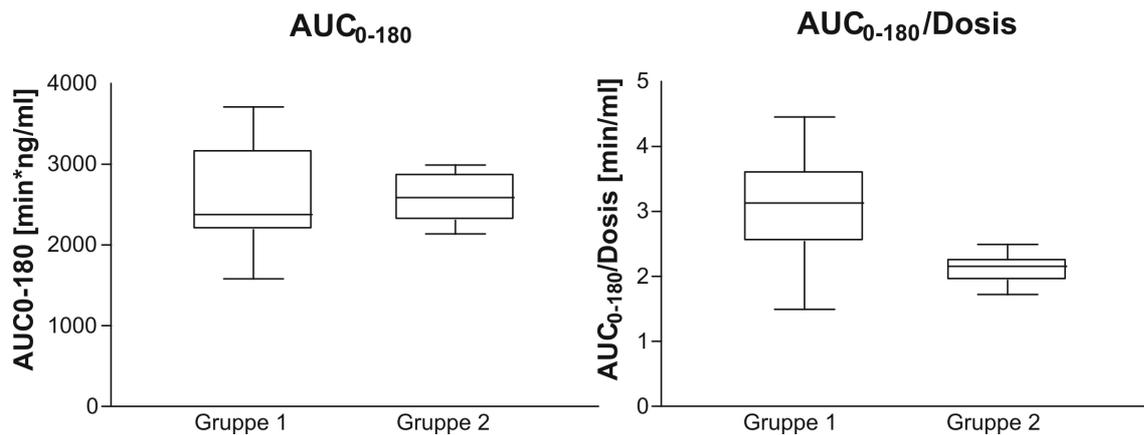


Abb. 3.10: Vergleich von AUC₀₋₁₈₀ und AUC₀₋₁₈₀/Dosis für Piritramid in Plasma bei Gruppe 1 und 2 (Box=25.-75. Percentile, Whiskers: Minimum-Median-Maximum)

Der graphische Vergleich (Abb. 3.10) zeigt für AUC₀₋₁₈₀ keinen erkennbaren Unterschied an, während dieser Wert auf die Dosis bezogen bei den älteren Kindern deutlich niedriger ausfällt. Ein statistischer Vergleich bestätigt diesen Befund: Für die AUC₀₋₁₈₀ ergibt sich kein signifikanter Unterschied (ungepaarter, zweiseitiger t-Test, P=0.9359, CI=95%, F-Test: Varianzen nicht signifikant unterschiedlich), jedoch für die AUC₀₋₁₈₀/Dosis (ungepaarter, zweiseitiger t-Test mit Welch's-Korrektur, P=0.0005, CI=95%, F-Test: Varianzen signifikant unterschiedlich).

3.3.4 Pharmakokinetisches Modell für iv-Bolusgabe

Mit Hilfe pharmakokinetischer Kompartiment-Modellierung wurde ermittelt, mit welchem Modell bzw. welcher mathematischen Funktion sich die Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe am besten beschreiben lassen. Dafür wurde für jeden einzelnen Patienten in WinNonLin[®] (Pharsight Corporation) eine Anpassung an ein 1-, 2-, und 3-Kompartiment-Modell nach iv-Bolusgabe jeweils mit Messwertgewichtung $1/y$ und $1/y^2$ berechnet (Anm.: Kietzmann et al. [91] verwenden a priori $1/y^2$). Es dürfen jeweils nur die verschiedenen Modelle mit gleicher Gewichtung untereinander verglichen werden. Als Entscheidungskriterium für die beste Anpassung dient das Akaike's Information Criterion

(AIC) [121] (Berechnung gemäß Formel (3.6)) – je niedriger der Wert des AIC, desto besser der "Fit" der modellierten Kurve.

$$AIC = N \times \ln R_e + 2p \quad (3.6)$$

N: Anzahl der experimentellen Datenpunkte

p: Anzahl der Parameter des Modells

R_e : Summe der Residuenquadrate

Im Durchschnitt sind die Werte bei $1/y^2$ -Gewichtung gegenüber $1/y$ bei allen drei Modellen niedriger, so dass für den Vergleich erstere herangezogen wird. Da für die Berechnung der Primärparameter im 2-Kompartiment-Modell mind. 5 und im 3-Kompartiment-Modell mind. 7 Messwerte vorhanden sein müssen, sind einige der Patientendaten für diese beiden Anpassungen nicht verwertbar. Das 2-Kompartiment-Modell liefert gegenüber dem 1-Kompartiment-Modell in allen Fällen und gegenüber dem 3-Kompartiment-Modell bis auf wenige Ausnahmen die niedrigeren AIC-Werte und beschreibt damit die Pharmakokinetik von Piritramid bei Kindern nach iv-Gabe am besten (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: AIC-Werte für 1-, 2- und 3-Kompartiment-Modelle von Gruppe 1 und 2

Gruppe 1	1-Komp	2-Komp	3-Komp	Gruppe 2	1-Komp	2-Komp	3-Komp
01/01	32.2	13.0	9.5	09/02	26.4	12.1	3.0
02/02	32.1	23.4	26.2	10/02	17.9	12.0	34.8
03/01	35.6	27.2	28.0	12/02	24.7	8.5	
04/01	30.7	28.1	31.0	21/02	34.3	13.1	14.0
05/01	27.9	21.7		26/02	32.3	21.0	31.7
06/01	30.8	16.2	16.6	27/02	30.6	15.2	0.1
11/01	21.0	-9.3	21.3				
13/01	20.8	1.8					
14/01	29.7	18.4	28.2				
15/01	18.2	7.5					
16/01	32.2	21.2	32.1				
17/01	20.4	10.2	22.0				
18/01	30.0	14.2	5.5				
19/01	30.0	15.8	23.4				
20/01	36.1	24.1	12.8				
22/01	35.0	19.4	27.1				
24/01	29.4	20.2	23.9				
25/02	26.1	21.3	31.8				
Mittelwert	28.8	16.4	22.6	Mittelwert	27.7	13.7	16.7
Median	30.0	18.9	23.9	Median	28.5	12.6	14.0
SD	5.4	9.3	8.2	SD	6.0	4.2	16.0

Die folgende Gleichung liegt dem 2-Kompartiment-Modell mit den Primärparametern K10, K12, K21 und V1 zugrunde:

$$C(t) = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (3.7)$$

C(t): Piritramid-Plasmakonzentration zum Zeitpunkt t

A, B: Y-Achsenabschnitte der Regressionsgeraden für Phase 1 bzw. 2

α , β : Eliminationskonstanten der Distributions- bzw. Eliminationsphase

Entsprechend diesem Modell ergeben sich für die pharmakokinetischen Primärparameter und die Sekundärparameter C_{\max} , CL, $t_{1/2\alpha}$ und $t_{1/2\beta}$ die folgenden Werte:

Tabelle 3.7: Aus dem 2-Kompartiment-Modell berechnete Pharmakokinetik-Primär- und Sekundärparameter

Code	V1 (l/kg)	Vss (l/kg)	K10 (1/min)	K12 (1/min)	K21 (1/min)	$t_{1/2\alpha}$ (min)	$t_{1/2\beta}$ (min)	C_{\max} (ng/ml)	CL (ml/min/kg)
Gruppe 1									
01/01	1.17	4.51	0.022	0.113	0.040	4.1	131.5	87.29	26.4
02/02	2.20	4.12	0.006	0.026	0.029	11.9	218.7	42.74	13.8
03/01	1.73	3.96	0.009	0.037	0.028	9.8	183.7	57.92	16.2
04/01	0.43	2.94	0.036	0.287	0.049	1.9	144.1	248.34	15.5
05/01	2.11	4.61	0.005	0.013	0.011	25.7	337.0	47.34	10.7
06/01	2.76	6.17	0.008	0.036	0.029	10.0	214.7	36.53	21.3
11/01	2.83	7.69	0.010	0.083	0.048	5.0	201.5	35.31	27.7
13/01	1.63	4.90	0.030	0.126	0.063	3.3	77.9	62.63	48.5
14/01	2.15	4.72	0.008	0.046	0.038	7.8	198.8	46.07	17.3
15/01	2.77	5.65	0.008	0.036	0.034	9.4	191.5	35.56	21.7
16/01	2.01	3.65	0.007	0.023	0.028	12.7	187.1	49.97	14.4
17/01	2.77	5.10	0.014	0.031	0.037	9.3	103.2	36.09	37.8
18/01	2.15	5.65	0.010	0.053	0.033	7.4	188.1	45.46	22.4
19/01	2.23	5.44	0.010	0.060	0.041	6.5	177.7	46.04	22.5
20/01	2.40	5.35	0.007	0.020	0.016	17.1	252.9	43.09	16.3
22/01	1.27	3.80	0.012	0.073	0.037	5.8	180.5	75.81	15.7
24/01	2.61	4.70	0.007	0.006	0.007	41.6	234.3	39.32	18.4
25/02	2.21	6.74	0.007	0.072	0.035	6.2	302.5	45.01	16.2
Mittelwert	2.08	4.98	0.012	0.063	0.034	10.9	195.88	60.03	21.3
SD	0.64	1.16	0.009	0.065	0.013	9.5	62.85	49.05	9.3
Gruppe 2									
09/02	3.48	6.18	0.006	0.012	0.016	22.4	216.8	30.23	22.0
10/02	1.37	3.35	0.018	0.100	0.069	3.8	99.6	71.36	24.9
12/02	1.65	4.53	0.011	0.034	0.019	11.5	198.1	60.70	18.1
21/02	2.40	6.74	0.009	0.037	0.021	10.8	234.4	42.55	22.1
26/02	1.67	4.30	0.010	0.085	0.054	4.8	184.7	57.93	16.9
27/02	2.50	5.67	0.008	0.037	0.029	9.8	208.2	38.22	20.2
Mittelwert	2.18	5.13	0.010	0.051	0.035	10.5	190.3	50.16	20.7
SD	0.78	1.28	0.004	0.034	0.022	6.6	47.5	15.61	2.9

3.3.5 Vergleich zwischen Kindern und Erwachsenen

Um die Pharmakokinetik von Piritramid nach iv-Bolusgabe zwischen Kindern und Erwachsenen vergleichen zu können, wurden die Rohdaten einer früheren Erwachsenen-Studie mit Piritramid [92] für den Zeitraum 0-6 Stunden mittels kompartmentfreier Analyse und Zwei-Kompartiment-Modellierung erneut berechnet. Den Patienten wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 min und nach 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, 36 h, 48 h Plasmaproben abgenommen. Messdaten über den Zeitpunkt 360 min hinaus wurden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt, da ein direkter Vergleich mit den Kinderdaten nur innerhalb dieses Zeitfensters möglich war. Die erwachsenen Patienten (n=29) hatten ein durchschnittliches Alter von 47.8 ± 18.6 (SD) Jahren und ein Gewicht von 72.0 ± 12.3 kg. Alle Patienten erhielten eine Dosis von 0.2 mg/kg KG Piritramid als iv-Bolus.

Wie zuvor bei den Kindern wurde zum einen eine kompartmentfreie pharmakokinetische Auswertung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 detailliert dargestellt. Zum anderen wurde auch eine Modell-Anpassung an ein Ein-, Zwei- und Drei-Kompartiment-Modell vorgenommen. Die Ergebnisse wurden anhand des Akaike's Information Criterion (AIC) verglichen. Das Ein-Kompartiment-Modell liefert dabei durchgehend höhere (=ungünstigere) Werte als die anderen beiden Optionen. Für den Zeitraum 0-48 h nach Applikation konnte die Kinetik am besten mit einem Drei-Kompartiment-Modell beschrieben werden [91], was für den Abschnitt 0-6 h nur noch bei 18 von 29 Patienten zutrifft. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich aber, dass in den meisten Fällen das Drei-Kompartiment-Modell nur geringfügig bessere AIC-Werte besitzt als das Zwei-Kompartiment-Modell und außerdem bei der Berechnung mit dem Drei-Kompartiment-Modell in vielen Fällen völlig unplausible pharmakokinetische Parameter resultieren, wie z.B. ein C_{\max} von mehreren Milligramm pro Milliliter oder terminale Halbwertszeiten von mehreren Tagen. Aus diesem Grund und wegen der besseren Vergleichbarkeit mit den

Kinderdaten wurde das Zwei-Kompartiment-Modell für die Modell-basierte Ermittlung der PK-Parameter herangezogen. Das Ergebnis zeigt ebenfalls Tabelle 3.8. Die Daten von Erwachsenen sind hier direkt denen der Kinder gegenübergestellt. Da sich bei dem Vergleich der beiden Kinder-Altersgruppen kein wesentlicher Unterschied zeigte, wurden hier alle Kinder in eine Gruppe zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Kompartimentfreie- (NCA) und 2-Kompartiment-Modell-Analyse für Piritramid als iv-Bolus bei Kindern und Erwachsenen für den Zeitraum 0-6 h

1) NCA-Vergleich

		Alter	Gewicht (kg)	Dosis/ Gew. (mg/kg)	λ_z (1/min)	t_{max} (min)	$t_{1/2}$ (min)	C_{max} (ng/ml)	CL (ml/kg/min)	AUC ₀₋₁₈₀ (min*ng/ml)	AUC ₀₋₁₈₀ / Dosis (min/ml)	V_{ss} (l/kg)
Kinder	mean	14.5 Mon.	9.5	0.1	0.0042	7.0	188.6	35.4	22.2	2600.3	2.9	5.2
	SD	11.2	2.5		0.0017	4.2	62.4	8.9	9.2	617.8	0.9	1.2
Erwachs.	mean	47.8 Jahre	72.0	0.2	0.0025	3.5	320.9	138.2	11.0	7326.2	0.5	4.4
	SD	18.6	12.3		0.0007	1.4	197.9	55.0	3.0	1562.8	0.1	1.2

2) 2-Kompartiment Modell

		K10 (1/min)	K12 (1/min)	K21 (1/min)	α (1/min)	β (1/min)	$t_{1/2\alpha}$ (min)	$t_{1/2\beta}$ (min)	C_{max} (ng/ml)	CL (ml/min/kg)	V1 (l/kg)	V2 (l/kg)	V_{ss} (l/kg)
Kinder	mean	0.012	0.060	0.034	0.102	0.0040	10.8	194.5	57.6	21.1	2.1	2.9	5.0
	SD	0.008	0.058	0.015	0.075	0.0016	8.7	58.4	43.0	8.1	0.7	0.8	1.2
Erwachs.	mean	0.013	0.095	0.039	0.144	0.0027	7.2	267.5	230.0	11.7	1.4	2.7	4.1
	SD	0.018	0.083	0.031	0.109	0.0007	4.6	63.2	341.2	3.1	0.6	0.8	1.0

Innerhalb der Gruppen entsprechen die Werte der kompartimentfreien Auswertung (NCA) im Wesentlichen denen der Kompartiment-Analyse. Der markanteste Unterschied zwischen Erwachsenen und Kindern ist wohl die Differenz der "terminalen" Halbwertszeiten: 189 min (Kinder) gegenüber 321 min (Erwachsene) (NCA) bzw. 195 min gegenüber 268 min (2-Komp.-Modell). Dieser Unterschied spiegelt sich auch in einer doppelt so hohen Gesamtkörperclearance bei den Kindern wider. Den Verlauf der berechneten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven veranschaulicht Abb. 3.11.

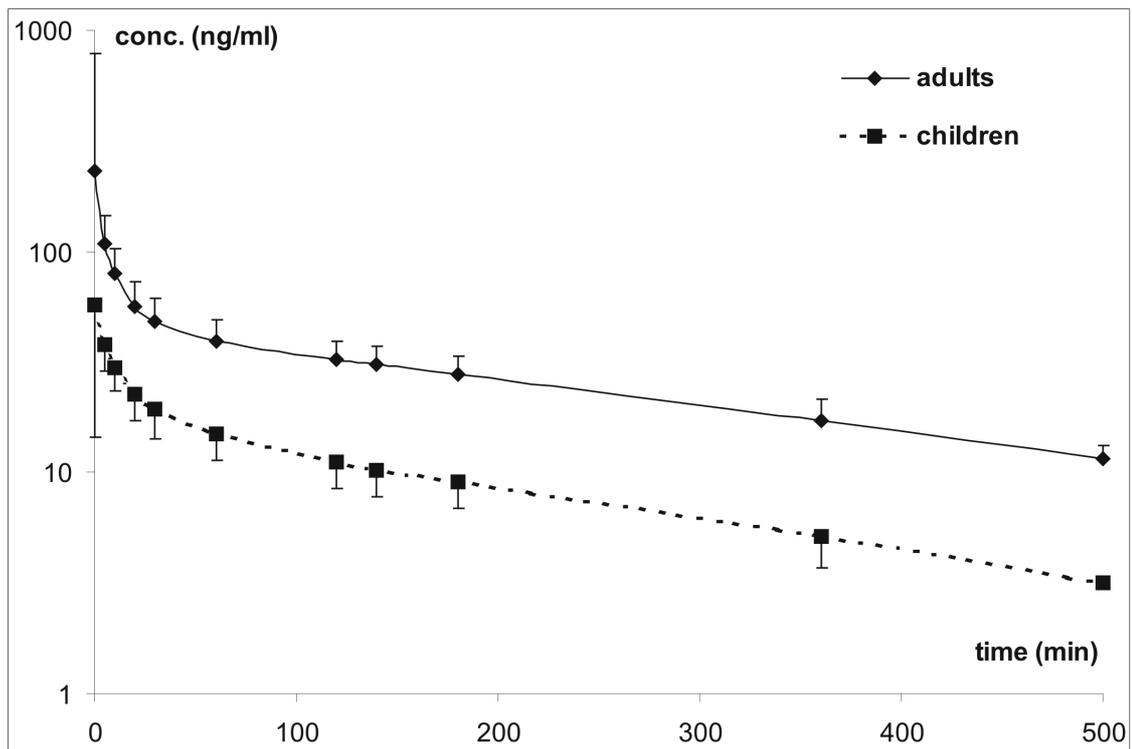


Abb. 3.11: Piritramid Plasma-Konzentration-Kurven bei Erwachsenen (n=29) und Kindern (n=24) nach einem iv-Bolus von 0.2 bzw. 0.1 mg/kg; die Linien zeigen die anhand des 2-Komp.-Modells berechneten mittleren Werte (vertikale Linien: Standardabweichung)

3.3.6 Diskussion

Die Pharmakokinetik von Piritramid nach einmaliger Gabe von 0.1 mg/kg KG als iv-Bolus scheint sich bei den beiden Altersgruppen hinsichtlich C_{max} , t_{max} und AUC_{0-180} nicht zu unterscheiden. Zwar ergibt sich bei Betrachtung der dosisbezogenen AUC_{0-180} -Werte ein statistisch signifikanter Unterschied, der sich aber dadurch erklärt, dass ältere Kinder auch dem Gewicht entsprechend eine höhere Dosis verabreicht bekommen. Die Tatsache, dass sich dennoch C_{max} , der absolute Wert für AUC_{0-180} und die Clearance kaum unterscheiden, deutet darauf hin, dass der Unterschied bei $AUC_{0-180}/Dosis$ durch das Verteilungsvolumen bedingt ist. Da C_{max} direkt vom Verteilungsvolumen abhängt und ältere Kinder i. d. R. größer sind (größere "Verteilungskompartimente" haben), ergeben sich folgerichtig trotz höherer Dosis etwa gleiche Maximalplasmakonzentrationen. Bei keinem der Patienten

deutet die AUC oder $t_{1/2}$ auf eine außergewöhnliche Pharmakokinetik hin (Stichwort: Poor Metaboliser). Um solche Besonderheiten aufzudecken, sind jedoch wesentlich größere Fallzahlen und Genotypisierungen (hier nicht durchgeführt) vonnöten.

Die Plasmaspiegel bei den untersuchten Kindern lassen sich am besten mit einem 2-Kompartiment-Modell beschreiben. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zur 3-Kompartiment-Pharmakokinetik bei Erwachsenen [91]. Allerdings wurden in der betreffenden Erwachsenen-Studie die Plasmakonzentrationen bis zu 48 h nach Dosisverabreichung gemessen. Vermutlich ist nach 6 h die terminale Eliminationsphase noch gar nicht erreicht. Dies würde erklären, warum zum einen im Falle der Kinder das 2-Kompartiment-Modell eine bessere Anpassung liefert und zum anderen warum die Halbwertszeiten bei Kindern deutlich niedriger liegen als bei Erwachsenen. Da weitergehende Daten bisher nicht vorliegen, sollten die bei Kindern ermittelten Sekundärparameter Clearance, Verteilungsvolumen im Steady-State und $t_{1/2}$ nur unter Vorbehalt betrachtet werden, da sie sich alle auf die terminale Eliminationsphase beziehen bzw. über $AUC_{0-\infty}$ berechnet werden. Der extrapolierte Anteil $AUC_{last-\infty}$ (Fläche zwischen letztem Messwert und "Unendlich") beträgt aber durchschnittlich noch 30-40 %, was für eine valide Berechnung der genannten Parameter zu hoch ist. Um umfassende Aussagen über die Pharmakokinetik von Piritramid bei Kindern treffen zu können sind somit noch weitere Studien notwendig, die sich über einen Zeitraum von vier bis fünf Halbwertszeiten nach Applikation erstrecken, sofern dies praktisch machbar und ethisch vertretbar ist.

Die Fraktion der renal unverändert ausgeschiedenen Substanz (f_e) entspricht in ihrer Höhe bei den untersuchten Kindern der von Erwachsenen [91], bei denen ein f_e von 1.40 % gemessen wurde. Die von Kietzmann et al. [91] berichtete hohe Plasmaproteinbindung von Piritramid spielt daher sehr wahrscheinlich auch im Falle der hier untersuchten Kinder eine wichtige Rolle, wenn man voraussetzt, dass nur der ungebundene Anteil auch für eine renale glomeruläre Filtration zur Verfügung steht.

Zum Vergleich zwischen Erwachsenen und Kindern:

Die wesentlichen Unterschiede beschränken sich auf die Halbwertszeit und die Verteilungsvolumina. So ist jeweils bei den Kindern $t_{1/2\beta}$ deutlich geringer als bei den Erwachsenen. Dies deutet darauf hin, dass Piritramid bei Kindern schneller ausgeschieden bzw. metabolisiert wird als bei Erwachsenen. Dieses Ergebnis steht durchaus im Einklang mit bestehenden Erkenntnissen über die kindliche Pharmakokinetik/Metabolismus. So wurde von Ginsberg et al. [119] gezeigt, dass die Halbwertszeit für viele Arzneistoffe im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren gleich oder niedriger ist als bei Erwachsenen. Dies scheint auch für andere Opioid-Analgetika zuzutreffen [122].

Das periphere Verteilungsvolumen (V_2) und das steady-state Verteilungsvolumen (V_{ss}) befindet sich bei Kindern und Erwachsenen in einer vergleichbaren Größenordnung. Das zentrale Verteilungsvolumen (V_1) ist bei Kindern allerdings 1.5 mal größer als bei Erwachsenen. Ein Grund hierfür könnte eine veränderte Plasmaproteinbindung oder der Einfluss weiterer leichter zugänglicher Kompartimente (Blut-Hirn-Schranke?) sein. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass der Zeitpunkt der Probennahme gerade im Bereich von C_{max} und damit die resultierende gemessene Spitzenkonzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Berechnung des zentralen Verteilungsraumes besitzt, und sich somit ungünstig gewählte oder zu wenige Zeitpunkte verfälschend auswirken können.

Sämtliche auf Extrapolation bis "Unendlich" beruhende Parameter wie insbesondere V_{ss} und die Clearance sind nur mit großen Vorbehalten und allerhöchstens als Trendwerte zu betrachten. Bei Berechnungen, die auf einer solchen Extrapolation beruhen, sollte streng genommen der Anteil der extrapolierten AUC nicht mehr als 10-15 % betragen. In diesem Fall (von 6 h bis ∞) macht dieser Flächenabschnitt aber noch durchschnittlich 30-40 % aus. Hinzu kommt noch, dass gezeigt werden konnte, dass sich bei Erwachsenen innerhalb der ersten sechs Stunden nach Dosisverabreichung das 2-Kompartiment-Modell sinnvoller

anwenden lässt, für den Zeitraum 0-48 h aber das 3-Kompartiment-Modell eindeutig besser ist – also nach sechs Stunden die dritte Phase noch nicht erreicht ist. Daher macht ein Vergleich aller auf der terminalen Eliminationsphase basierenden pharmakokinetischen Parameter nur eingeschränkt Sinn. Dennoch lässt sich schlussfolgernd feststellen, dass es keine Hinweise darauf gibt, dass Piritramid bei Kindern langsamer ausgeschieden wird und damit bei wiederholter Applikation die Gefahr der Akkumulation nicht größer sein sollte als bei Erwachsenen.

3.4 Metabolismus von Piritramid

3.4.1 LC-MS-Metaboliten-Screening in Human- und Rattenlebermikrosomenproben, Humanplasma und –urin

Die Suche nach Metaboliten von Piritramid wurde durchgeführt, indem Urin-, Plasma- und Mikrosomenproben auf eine jeweils geeignete Weise aufbereitet wurden und anschließend mittels HPLC-MS im Full-Scan- und Single-Ion-Monitoring-Modus nach in Frage kommenden Massensignalen gesucht wurde. Im Mittelpunkt der Suche standen Mono- (+ m/z 16) und Dihydroxylierungen (+ m/z 32), Dehydratisierung (- m/z 2), Hydrolyse (+ m/z 18), Glucuronidierung (+ m/z 176 bzw. 192) und Sulfatierung (+ m/z 96 bzw. 114) von hydroxyliertem und nicht-hydroxyliertem Piritramid sowie Konjugation mit Glutathion (+ m/z 305). Als Probenmaterial standen gepoolter Erwachsenenurin von sechs Intensivstationspatienten im Alter von 58-88 Jahren, Urin und Plasma der in der Studie eingeschlossenen Kinder, Human- und Rattenlebermikrosomeninkubate zur Verfügung.

Es konnten sowohl im Kinder- als auch im Erwachsenenurin und in den Mikrosomenproben Peaks mit der Masse monohydroxylierten Piritramids ($M_r=446.2$) gefunden werden (Abb. 3.12). Im Erwachsenenurin sind eindeutig vier Peaks mit der entsprechenden Masse zu erkennen, der zweite davon ist in den Lebermikrosomenproben in geringen Mengen (in

Relation zu den restlichen Peaks), in der Kinderurinprobe jedoch praktisch nicht vorhanden. Eine quantitative Aussage lässt sich anhand dieses LC-MS-Ergebnisses jedoch nicht machen, da unterschiedliche Probenmengen aufbereitet wurden und synthetische Standards zur Quantifizierung nicht verfügbar waren.

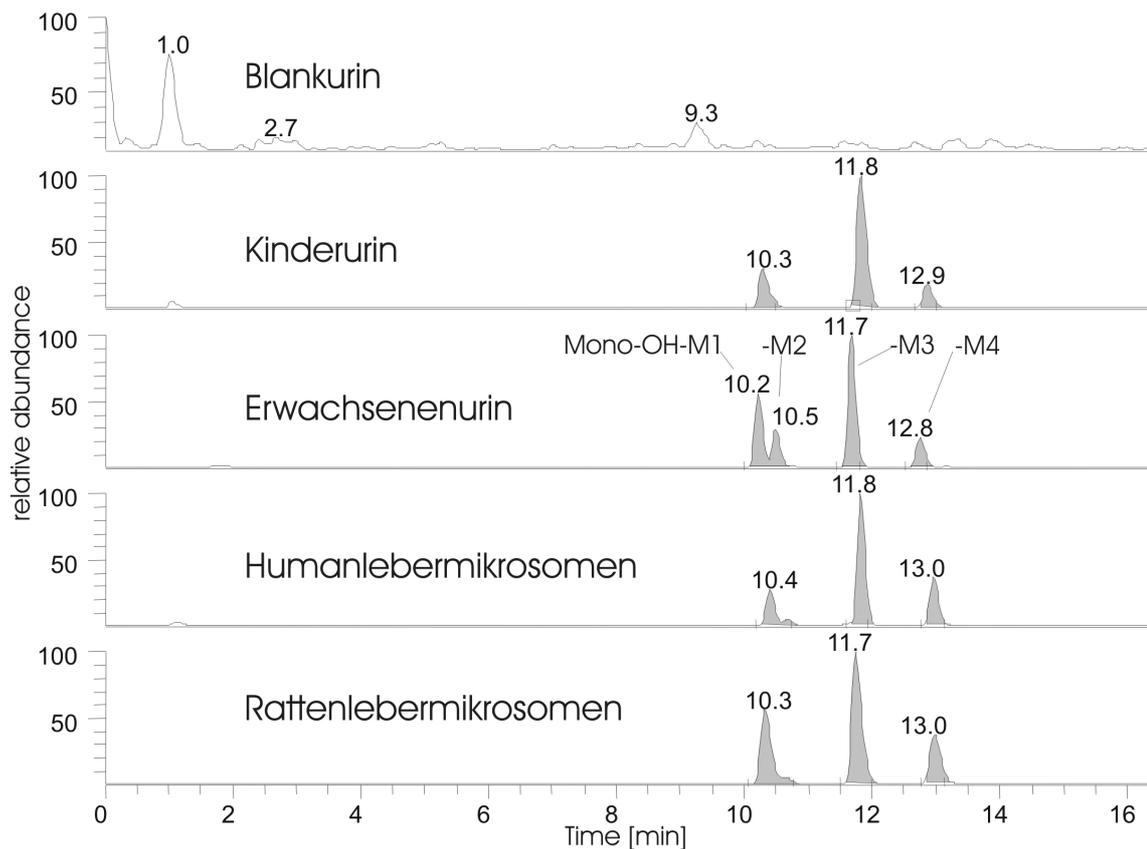


Abb. 3.12: Monohydroxy-Piritramid-Metabolite – Extracted Ion Chromatogramme von m/z 447.2

Das Screening-Ergebnis für Dihydroxy-Metabolite liefert ein wesentlich heterogeneres Bild (Abb. 3.13). Peaks mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis von 463.2 kommen zwar in allen Proben außer Plasma vor, allerdings stimmen nicht alle in der Retentionszeit überein. Der erste Peak taucht bei Kinderurin, Erwachsenenurin und Rattenlebermikrosomen auf, jedoch nicht in der Humanlebermikrosomenprobe. Zwei weitere Peaks finden sich nur in den beiden Mikrosomenproben, nur einer davon eluiert bei beiden Proben zur gleichen Retentionszeit (RT: 11.7 min).

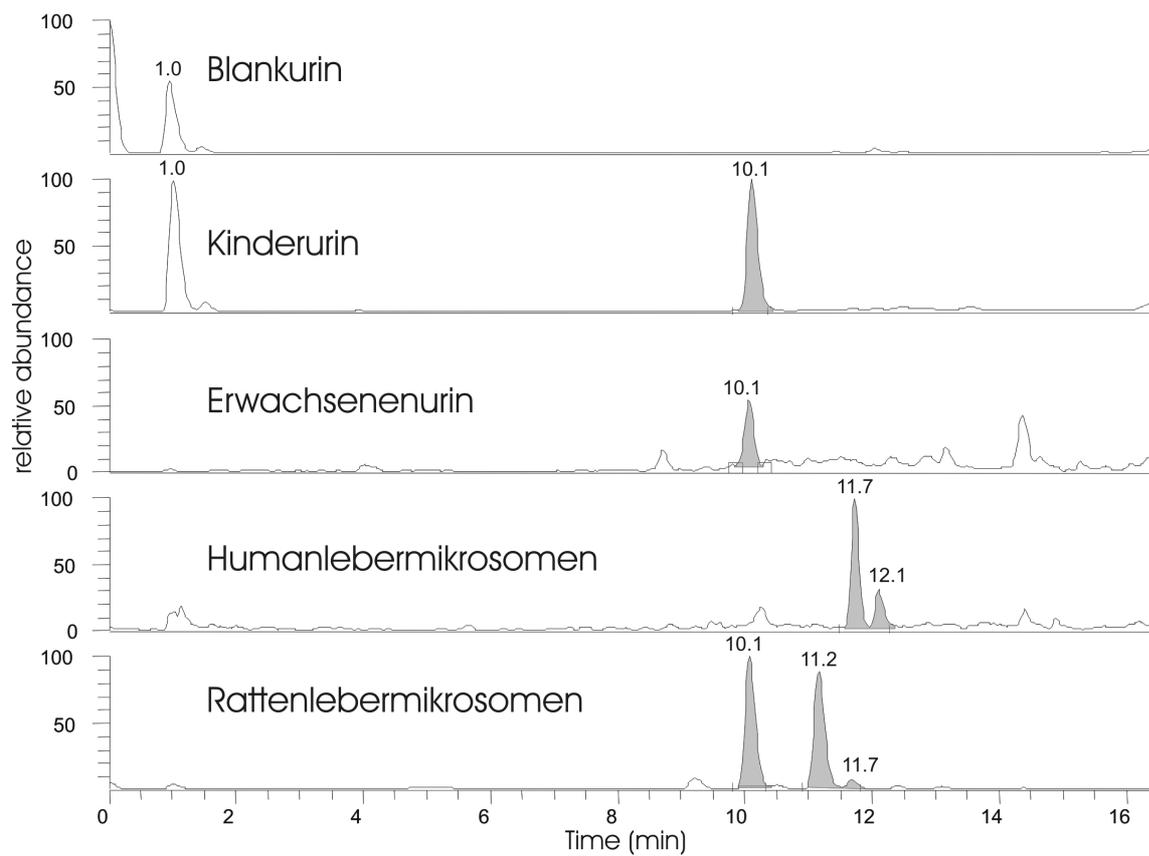


Abb. 3.13: Dihydroxy-Piritramid-Metabolite – Extracted Ion Chromatogramme von m/z 463.2

Das Signal für die dem dehydrogenierten Piritramid entsprechende Masse ($M_r=428.2$) wurde ebenfalls in allen untersuchten Proben außer Plasma detektiert (Abb. 3.14). Die Peaks stimmen unter Berücksichtigung matrixbedingter leichter Verschiebung in der Retentionszeit praktisch überein, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um die gleiche Verbindung handelt.

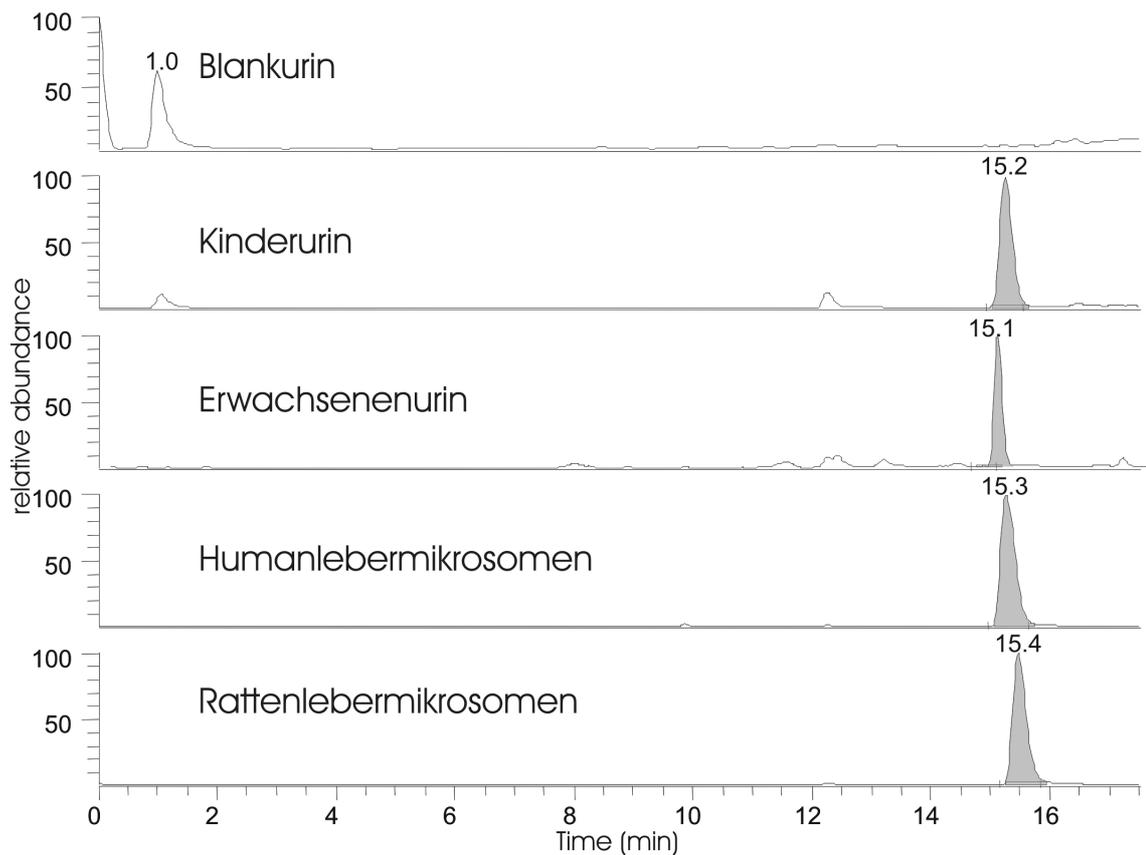


Abb. 3.14: Dehydro-Piritramid-Metabolite – Extracted Ion Chromatogramme von m/z 429.2

Die Suche nach den weiteren oben genannten metabolischen Modifizierungen führte bei keiner der Proben zu eindeutigen Signalen, die den Massen der betroffenen Strukturen zugeordnet werden könnten. In den Mikrosomenpräparaten war die Bildung von Phase-II-Metaboliten a priori nicht zu erwarten; in den Urinproben konnten solche Konjugate ebenfalls nicht gefunden werden. Da eher lipophile Xenobiotika renal meist als Konjugate mit hydrophilen Verbindungen wie Glucuronsäure, Glycin oder Sulfat ausgeschieden werden, wären solche Konjugate von Piritramid in Urin theoretisch auch zu erwarten gewesen. Allerdings ist es auch möglich, dass die Konzentration der Konjugate im Urinextrakt für die Detektion zu gering war oder die Verbindungen die Ionisierung nicht überstanden damit nicht detektiert werden konnten. Um diese Frage letztlich zu beantworten, müsste eine größere Menge Urin chemischer oder enzymatischer Hydrolyse unterzogen werden und die unkonjugierten Metabolite mit und ohne Hydrolyse quantifiziert werden. Steigt die Menge nach Hydrolyse an, so ist dies ein eindeutiger Hinweis auf die

Existenz entsprechender Konjugate. Dieses Problem wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt.

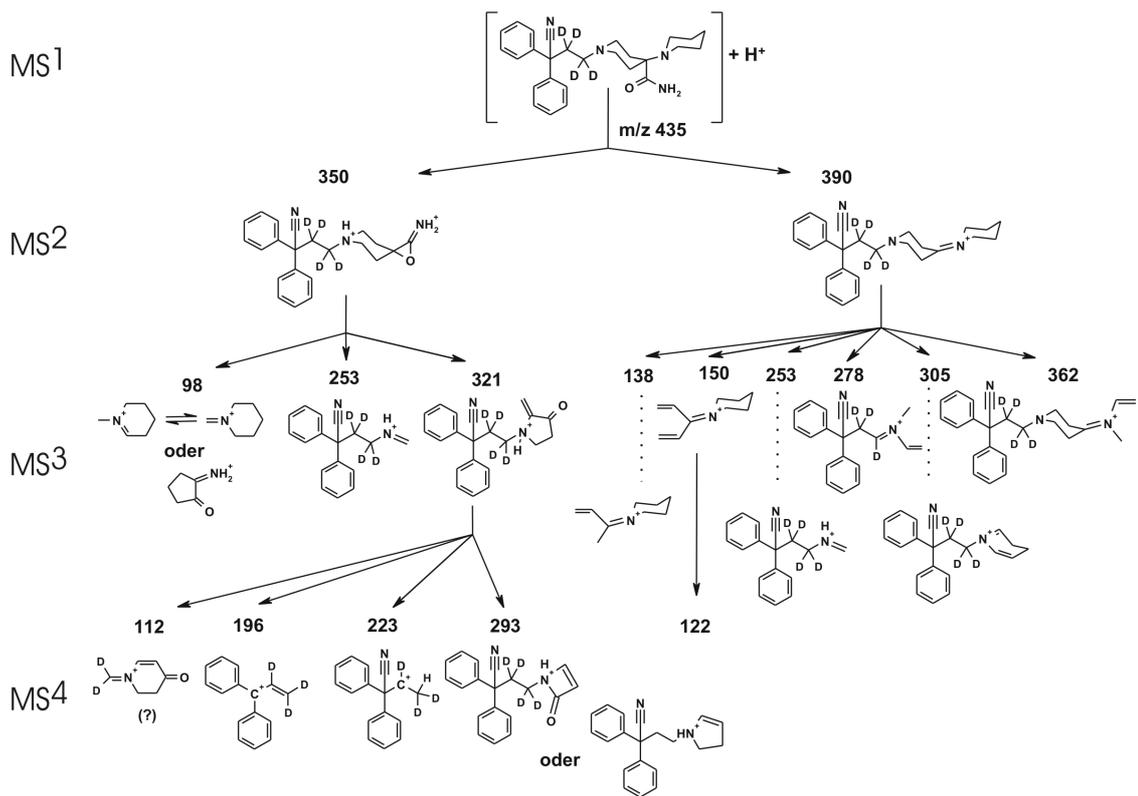
Sechs stichprobenartig ausgewählten Plasmaproben von Patienten der Kinder-Pharmakokinetikstudie (drei Proben der jüngeren sowie drei der älteren Gruppe) wurden auf Metabolite hin untersucht. Hierzu wurden Proben genommen, die zwischen drei und sechs Stunden nach Piritramid-Verabreichung gezogen wurden, da hier eine höhere Konzentration zu erwarten war. Bei keiner der Plasmaproben konnte die Masse von eines der potentiellen Metaboliten nachgewiesen werden. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass sich deren Konzentration unter der Nachweisgrenze befindet. Dieses Hindernis ließe sich relativ einfach durch die Aufarbeitung einer größeren Probenmenge und einer angemessenen Aufkonzentrierung beseitigen. Da aber von jedem Patienten nur knapp 1 ml Plasma pro Zeitpunkt gesammelt wurde, davon bereits 0.5 ml für die Piritramid-Konzentrationsbestimmungen verbraucht wurde und die Konzentration der Metabolite vermutlich erst in den später gezogenen Proben ansteigt, war für eine weitere, eingehendere Untersuchung nicht mehr ausreichend Probenmaterial vorhanden. Um dieses Problem zu umgehen, könnte als nächster Schritt erst einmal Plasma von erwachsenen Patienten untersucht werden, da hier sowohl pro Blutentnahme mehrere Milliliter Plasma gewonnen werden können und eine Einwilligung wesentlich leichter zu erhalten ist als bei Patienten im Kindesalter.

3.4.2 Strukturaufklärung mittels ESI-MS

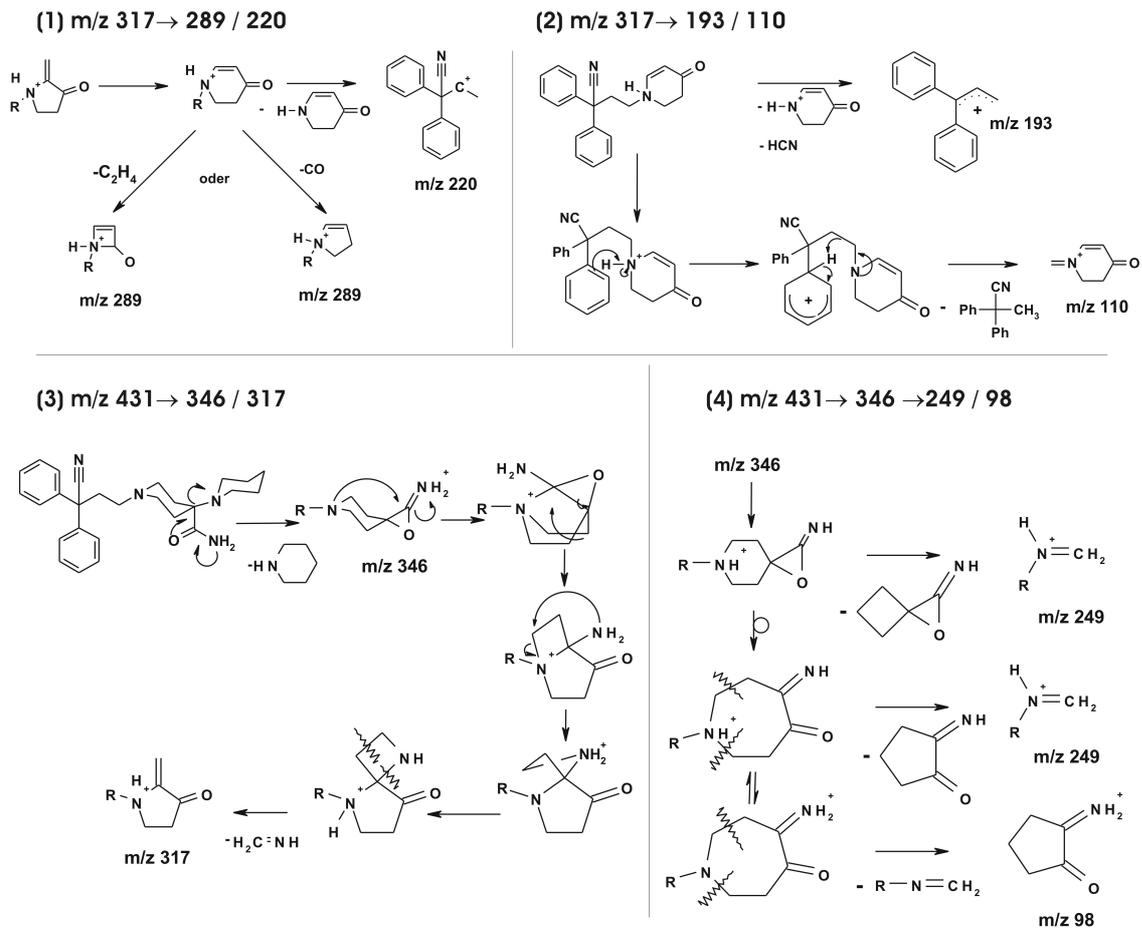
3.4.2.1 Fragmentierungsmuster von Piritramid

Durch Spritzenpumpeninfusion einer reinen Piritramid-Lösung (10 µg/ml in H₂O/Acetonitril/Ameisensäure – 70/30/0.1) wurden Ionenfallen MS-Spektren bis MS⁴ zur Aufklärung des Fragmentierungsweges aufgenommen. Anders als bei der Electron-Impact-MS sind für die ESI-collision-induced-MS bisher kaum allgemein anwendbare Fragmentierungsregeln

publiziert [123], was die Spektrenauswertung deutlich erschwert. Die Interpretation der Spektren erfolgte analog zu den aus der organischen Chemie bekannten Fragmentierungs- und Umlagerungsreaktionen. Durch eingehende Untersuchungen von Fenn et al. konnte gezeigt werden, dass unter den in einem Quadrupolfeld vorgegebenen Stabilitätsbedingungen Gasphasenreaktionen – insbes. Fragmentierungsreaktionen – möglich sind, die über die selben Intermediate aus vergleichbaren organischen Reaktionen verlaufen. Der für Piritramid aufgestellte Fragmentierungsbaum wurde zusätzlich durch die MSⁿ-Analyse von D4-Piritramid überprüft (Durchführung wie bei Piritramid), um abzuklären, ob die Fragmente, die die Deuterierung noch enthalten müssten, auch tatsächlich um die entsprechenden Masseneinheiten größer sind. Die so ermittelten Fragmentierungen zeigt für Piritramid Schema 3.1 und für D4-Piritramid Schema 3.2. Die postulierten Mechanismen, die zu den jeweiligen Hauptfragmenten führen, sind in Schema 3.3 dargestellt.



Schema 3.2: Ionenfallen-Fragmentierung von D4-Piritramid mit postulierten Strukturen; Zahlen: gerundete m/z Werte



Schema 3.3: Postulierte Fragmentierungsmechanismen für die Piritramid-Fragmente m/z 346, 317, 289, 249, 220, 193, 110 und 98

3.4.2.2 Semipräparative Aufreinigung von Rattenlebermikrosomeninkubat

Zur Strukturaufklärung der Piritramidmetabolite wurde die Umsetzung von Piritramid durch Rattenlebermikrosomen im Halbmakro-Ansatz (100 ml) gewählt, um so größere Mengen der Verbindungen zu generieren, die auch für die geplante NMR-Charakterisierung verwendet werden sollen (NMR-Ergebnisse zum Abschluss der Dissertation noch nicht verfügbar). Die Isolierung der Metabolite aus Patientenurin in der erforderlichen Menge und Reinheit war nicht möglich, da der Urin von Intensivpatienten stammte, die noch eine Vielzahl weiterer Medikamente erhielten, die bzw. deren Metabolite sich durch flüssigflüssig Probenextraktion und HPLC nicht abtrennen ließen. Die Beschaffung von

Rattenlebermikrosomen ist aus verständlichen Gründen in größerem Umfang wesentlich unkomplizierter und preiswerter als die von Humanlebermikrosomen, und da ein Großteil der Metabolite bei beiden Spezies identisch zu sein scheint, wurde diese Methode gewählt. Das Rattenlebermikrosomeninkubat wurde nach der Inkubation zur Abtrennung von Salzen und Proteinen einer Festphasenextraktion und anschließend in zwei Stufen einer semipräparativen HPLC-Aufreinigung unterzogen. In der ersten Stufe wurde der Inkubationsextrakt in drei Fraktionen aufgetrennt: 1) Dihydroxy-Metabolite, 2) Monohydroxy-Metabolite, 3) Dehydro-Metabolit. Die zweite Stufe diente der Auftrennung der Verbindungen in den einzelnen Fraktionen der ersten Stufe. Es resultierten für die erste Fraktion drei Verbindungen (Di-OH-M1 bis M3), für die zweite Fraktion vier Verbindungen (Mono-OH-M1 bis M4) und für die dritte Fraktion eine Verbindung (Dehydro-M1). Das Schema der semipräparativen HPLC-Reinigung mit repräsentativen Chromatogrammen ist in Abb. 3.15 gezeigt. Wie anhand der Chromatogramme zu erkennen ist, sind die Verbindungen Di-OH-M2 und Mono-OH-M2 nur in sehr geringer Konzentration enthalten. Die weitergehende MS-Charakterisierung, insbesondere von Mono-OH-M2, war daher nur beschränkt möglich.

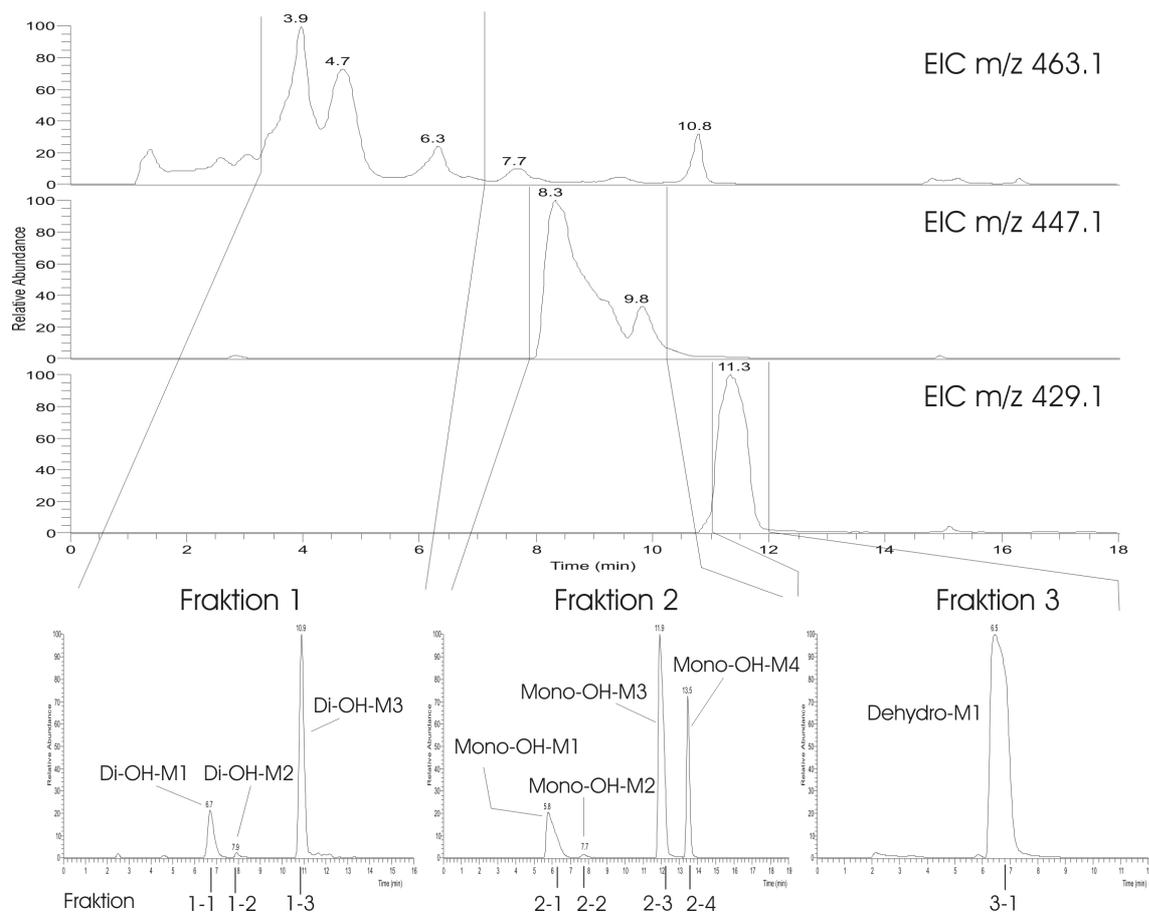


Abb. 3.15: Schema der zweidimensionalen Semi-präp-HPLC-Trennung von Piritramid-Metaboliten in Rattenlebermikrosomeninkubat

3.4.2.3 Fragmentierungswege der Metabolite

Prinzipiell läuft die massenspektrometrische Analyse einer Verbindung mittels Ionenfallen-MS nach dem folgenden Schema ab: Die Analyten im HPLC-Eluentenstrom werden im Interface bei Atmosphärendruck durch Elektrospray- oder Atmospheric Pressure Chemical Ionisation als Ionen in die Gasphase überführt und ins MS geleitet, wo zu Beginn des Zyklus alle Ionen des gewählten Massenbereichs in der Ionenfalle auf stabilen Bahnen gehalten werden. Nun wird eine einzelne Masse ausgewählt, alle anderen werden entweder aus der Ionenfalle herausgescannt bzw. durch Destabilisierung der Bahnen entfernt (=MS¹). Durch Erhöhung der kinetischen Energie der noch gespeicherten Ionen und Kollision mit einem Inertgas kommt es zur Fragmentierung des Ausgangsions (=MS²). Von den

entstandenen Fragmenten kann wiederum eines selektiert und fragmentiert werden (=MS³) und so fort (=MSⁿ). Der Zyklus 'Ionenfalle füllen – selektieren – fragmentieren – selektieren – fragmentieren – etc. – Ionenfalle füllen' wiederholt sich im Bereich von Millisekunden. So lässt sich schrittweise untersuchen, aus welchen Teilstrukturen welche Fragmente entstehen und ein Fragmentierungsbaum aufstellen, wie dies in Schema 3.1 und Schema 3.2 für Piritramid und D4-Piritramid veranschaulicht ist.

Diese stufenweise Fragmentierung lässt nun die Untersuchung von Strukturmodifikationen zu. Zuerst wird die Masse der Ausgangsverbindung mit der des Metaboliten auf der MS¹-Stufe verglichen – somit wird die Massendifferenz festgestellt, im Falle der Monohydroxy-Metabolite ist $\Delta=16$, also die Masse von Sauerstoff. Durch Vergleich der Fragmentierungsbäume der Ausgangsverbindung mit denen der Metabolite kann nun eingegrenzt werden, wo im Molekül sich die Modifikation befindet.

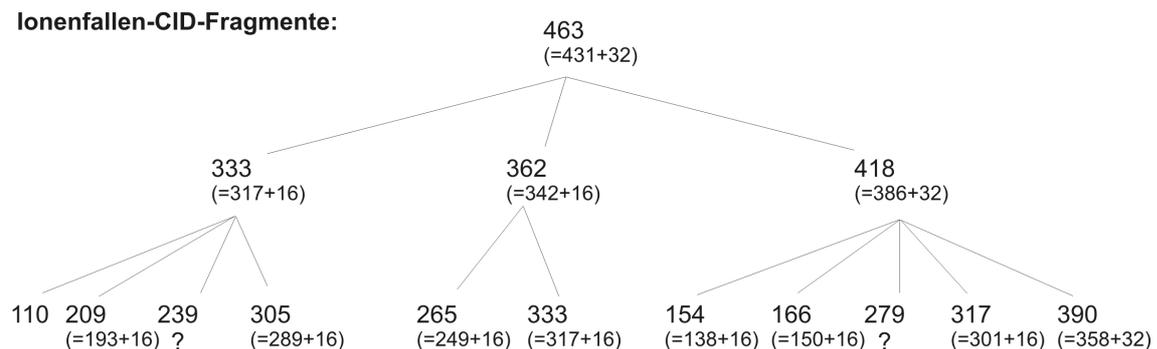
Veranschaulicht sei dies am Beispiel des Piritramid-Metaboliten Mono-OH-M1 und -M2 (Schema 3.7):

Alle Fragmente der ersten Fragmentierungsstufe (MS²) weisen gegenüber Piritramid einen Massenzuwachs von 16 Einheiten auf, d.h. die Hydroxylierung kann sich weder im endständigen Piperidinring noch in der Amidgruppe befinden, da beide bei einer der beiden möglichen Fragmentierungen abgespalten werden. Die Fragmente m/z 138 und 150 von m/z 402 (=MS³) zeigen gegenüber den entsprechenden Fragmenten von Piritramid keinen Unterschied, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass sich die Modifikation nicht im endständigen Piperidinring befinden kann. Anders ist dies bei Mono-OH-M3 und -M4, wo die Fragmente 154 (=138+16) und 166 (=150+16) auftauchen (Schema 3.8). Hier sitzt die Hydroxylierung folglich höchstwahrscheinlich im besagten Heterozyklus. Für Mono-OH-M1 und -M2 liefert die Fragmentierung von m/z 447→362→333→209 und 305 (=MS⁴) weitere Hinweise: m/z 209 und 305 entsprechen jeweils den Piritramid-Fragmenten 193 bzw. 289 plus 16 Einheiten. Da das Piritramid-Fragment 193 mit großer Wahrscheinlichkeit

keine Bestandteile des inneren Piperidinrings mehr enthält, kann die Hydroxylierung nur noch an der Ethylenbrücke oder an einem der beiden Phenylreste hängen. Die definitive Position der Hydroxygruppe lässt sich auf diesem Wege allerdings nicht feststellen, da die Fragmente mit abnehmender Masse und zunehmender Fragmentierungsstufe unspezifischer werden.

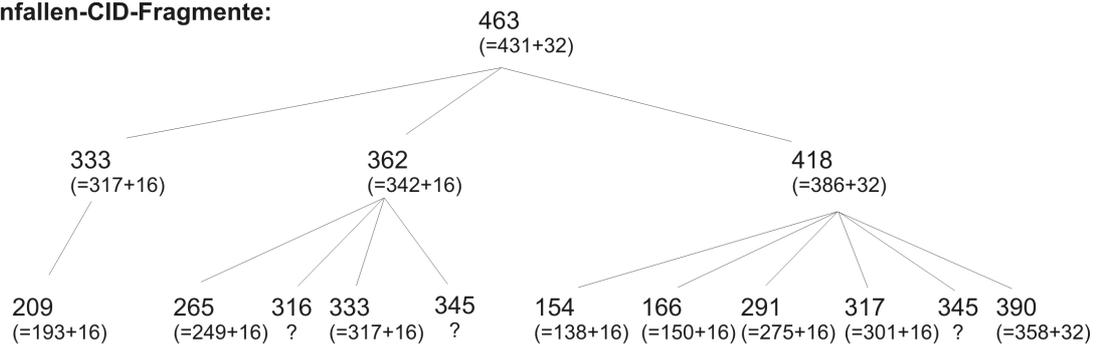
Entsprechend wird auch bei den dihydroxylierten und dem dehydro-Metaboliten vorgegangen.

Die Untersuchung der einzelnen Rattenlebermikrosomen-Fraktionen mittels Triple-Quadrupol- und Ionenfallen-MS führte zu den in Schema 3.4 bis Schema 3.9 aufgeführten Fragmentierungsabläufen:



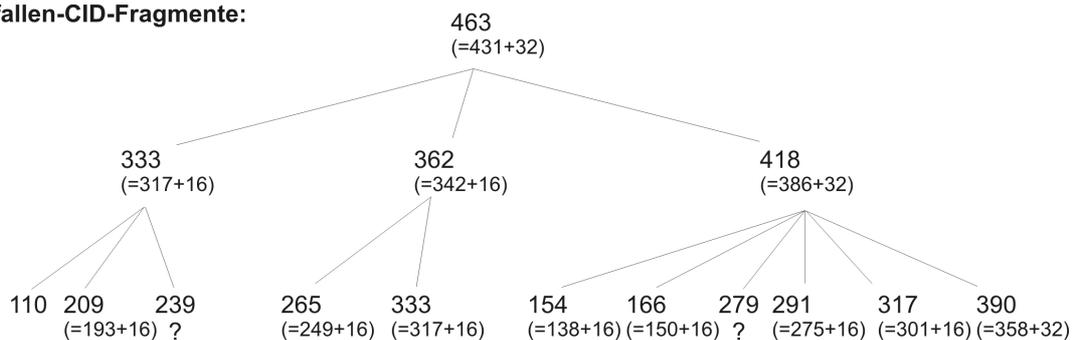
Triple-Quadrupol-CID-Fragmente: 463 - 418 - 362 - 333 - 232 - 166 - 154 - 98

Schema 3.4: Fragmentierung von Di-OH-M1 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 1)
(Die Werte in Klammern geben zum Vergleich die Masse des entsprechenden Piritramid-Fragments plus dem ermittelten Inkrement an.)

Ionenfallen-CID-Fragmente:

Triple-Quadrupol-CID-Fragmente: 463 - 418 - 362 - 265 - 222 - 110 - 98

Schema 3.5: Fragmentierung von Di-OH-M2 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 2)

Ionenfallen-CID-Fragmente:

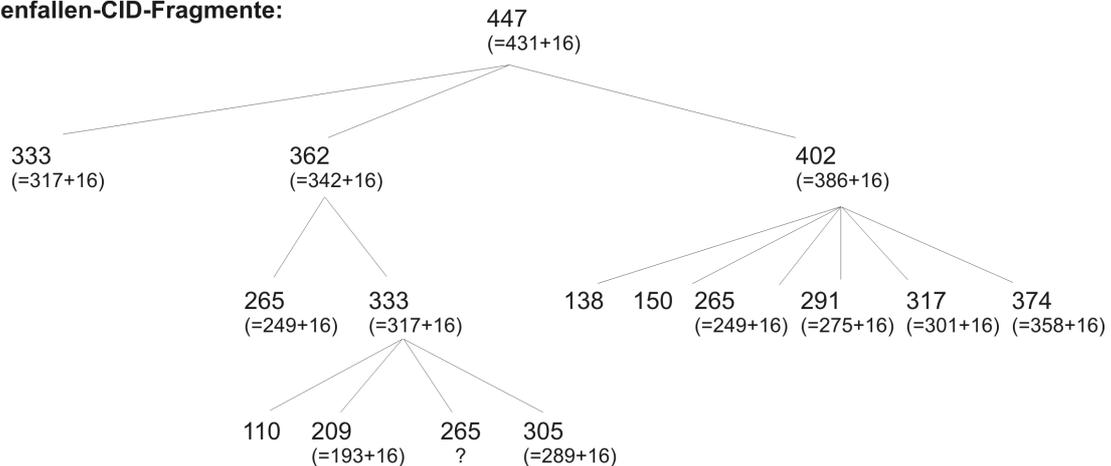
Triple-Quadrupol-CID-Fragmente: 463 - 418 - 362 - 333 - 166 - 154 - 98

Schema 3.6: Fragmentierung von Di-OH-M3 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 3)

Durch Vergleich der Fragmentierung von Piritramid und D4-Piritramid kann man darauf schließen, dass sich bei allen drei dihydroxylierten Piritramid-Metaboliten die Hydroxylierung sowohl im endständigen Piperidin-Ring als auch in der anderen Molekülhälfte befindet (Abb. 3.16). Dies geht zum einen aus den Fragmenten m/z 154 und 166 hervor, die zum endständigen Piperidin-Ring gehören und bei allen drei Verbindungen vorhanden sind. Am wahrscheinlichsten ist eine Hydroxylierung in α -Position zum Stickstoff-Atom oder eine N-Oxid-Bildung. Zum anderen weisen die Fragmente, die den Piperidin-Rest abgespalten haben, ebenfalls ein Inkrement von 16 Masseneinheiten auf.

Möglich wäre eine Hydroxylierung an zwei verschiedenen Positionen der Aromaten. Dies lässt sich allein massenspektrometrisch jedoch nicht eindeutig feststellen.

Ionenfallen-CID-Fragmente:



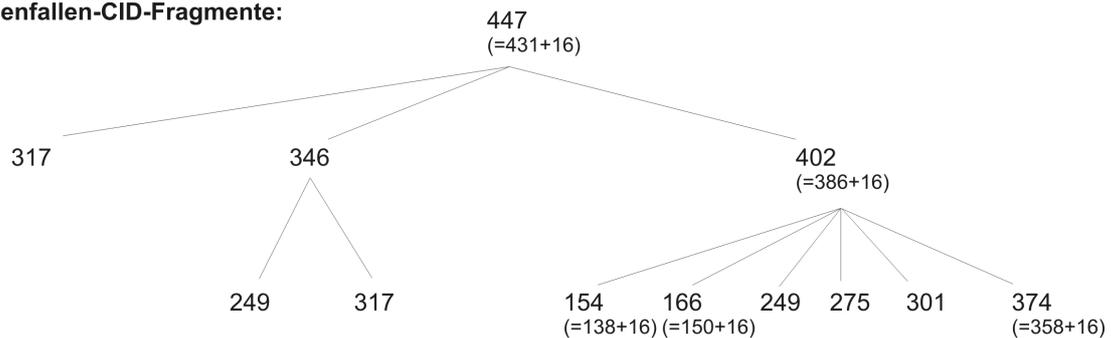
Triple-Quadrupol-CID-Fragmente

Mono-OH-M1: 447 - 402 - 362 - 333 - 150 - 138 - 98

Mono-OH-M2: 447 - 402 - 362 - 333 - 305 - 265 - 150 - 138 - 98

Schema 3.7: Fragmentierung von Mono-OH-M1 und -M2

Ionenfallen-CID-Fragmente:



Triple-Quadrupol-CID-Fragmente

Mono-OH-M3: 447 - 402 - 346 - 317 - 275 - 265 - 228 - 183 - 166 - 154 - 126 - 98

Mono-OH-M4: 447 - 402 - 346 - 317 - 249 - 166 - 154 - 98

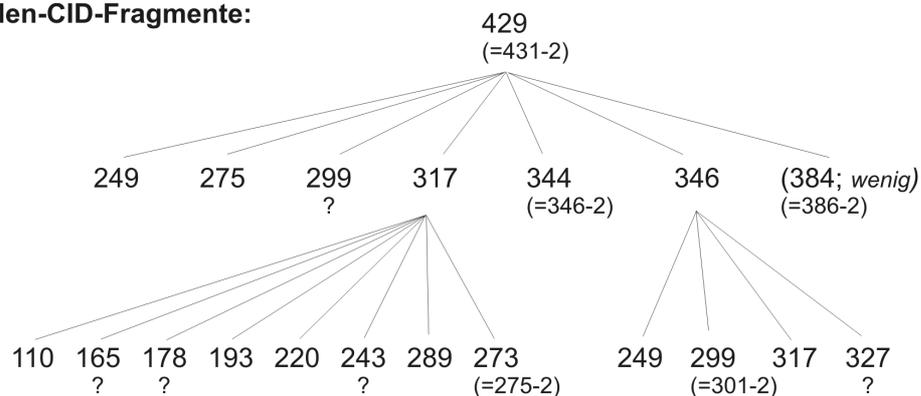
Schema 3.8: Fragmentierung von Mono-OH-M3 und -M4

Die Ionenfallen-Spektren von Mono-OH-M1 und -M2 sowie Mono-OH-M3 und -M4 sind jeweils praktisch identisch, mit geringen Unterschieden innerhalb des Triple-Quadrupol-

CID-Spektrums. Bei Mono-OH-M1 und -M2 muss es sich um modifiziertes Piritramid handeln, das eine Hydroxylierung im "linken" Molekülteil aufweist (Abb. 3.16), da hier die Fragmente 138 und 150 mit den entsprechenden Piritramid-Fragmenten übereinstimmen, während m/z 362 und 333 jeweils um die Masse von Sauerstoff größer ist als die korrespondierenden Bruchstücke der Ausgangssubstanz (m/z 342 und 317). Anhand der Fragmentierung lässt sich die Hydroxylierungsposition mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Aromaten und die Ethyl-Brücke einschränken.

Folgerichtig muss bei Mono-OH-M3 und -M4 die Hydroxylierung im endständigen Piperidin-Ring ("rechte" Molekülhälfte; Abb. 3.16) zu finden sein. Es könnte sich um ein N-Oxid und um in α -Position zum Stickstoff innerhalb des Rings hydroxyliertes Piritramid handeln.

Ionenfallen-CID-Fragmente:



Triple-Quadrupol-CID-Fragmente: 429 - 346 - 317 - 299 - 275 - 249 - 153 - 110 - 98

Schema 3.9: Fragmentierung von Dehydro-Piritramid

Als letzter Metabolit bleibt noch Dehydro-Piritramid, dessen Fragmentierung nicht vollständig analog zu den hydroxylierten Verbindungen abläuft. So fehlt das zu erwartende Fragment m/z 384 beinahe völlig, ebenso wie die zu den Fragmenten 138 und 150 korrespondierenden Bruchstücke. Dennoch kann die Modifizierung mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den endständigen Piperidin-Ring eingegrenzt werden, da sonst u.a. die Fragmente 317, 275 und 249 nicht auftreten dürften (Abb. 3.16). Dass es sich

tatsächlich um Dehydro-Piritramid handelt, konnte durch Ermittlung der genauen Summenformel mittels FT-ICR-MS nachgewiesen werden (exaktes m/z : 429.2648950 \equiv $C_{27}H_{33}N_4O$; theoret. m/z : 429.2648881; Fehler: $6.882 \cdot 10^{-6}$).

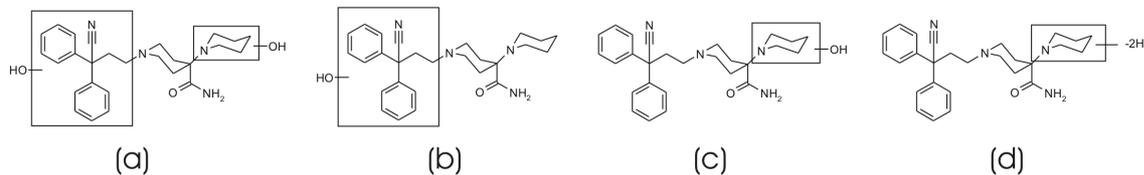


Abb. 3.16: Piritramid-Metabolit-Strukturen mit modifizierten Molekülregionen; (a) Di-OH-M1 bis M3, (b) Mono-OH-M1 und -M2, (c) Mono-OH-M3 und -M4, (d) Dehydro-Piritramid

3.4.3 Diskussion

Es konnten acht Piritramid-Metabolite aus Rattenlebermikrosomeninkubat massenspektrometrisch identifiziert werden, von denen sechs auch bei Humanproben (Urin und Mikrosomen) zu finden sind: Di-OH-M1, Mono-OH-M1, -M2, -M3, -M4 und Dehydro-Piritramid. Zwar läßt sich anhand der ESI-Ionenfallen- und -Triple-Quadrupol-MS-Spektren feststellen, in welcher Molekülregion sich die Modifizierung befindet, jedoch ist eine eindeutige Strukturaufklärung allein mit dieser Methodik nicht möglich. Als weitere Vorgehensweise bietet sich die NMR-Charakterisierung der aus biologischen Proben isolierten Metabolite oder die Synthese der vermuteten Strukturen und anschließender Vergleich der Retentionszeiten und MS-Spektren an.

Von Interesse ist ferner die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Piritramid-Metabolite. Da es durchaus möglich ist, dass die Metabolite pharmakologisch aktiv sind – wie z.B. bei Morphin das Glucuronid – kann es für die Therapie von Bedeutung sein, in welchem Maß und mit welcher Geschwindigkeit die Metabolite gebildet und wieder ausgeschieden werden. Dies gilt insbesondere sobald man weiß, über welche

Enzymsysteme Piritramid metabolisiert wird und Patienten mit entsprechender Enzymdefizienz behandelt werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Determination of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma by enantioselective liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry

Published in: Rapid Communications in Mass Spectrometry 2004;18(4):458-64.

Keywords: Phenprocoumon - chiral separation – enantioselective LC-MS/MS

ABSTRACT

Phenprocoumon is a commonly used oral anticoagulant of the coumarin type and has found extensive clinical use in the treatment of thrombophlebitis, pulmonary embolism and atrial fibrillation. In the course of a clinical study to investigate the influence of genetic polymorphisms of the CYP2C9 enzyme on phenprocoumon metabolism, we developed a new enantioselective LC-MS/MS-method to quantify (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma. HPLC separation of the enantiomers was achieved via a Chira-Grom-2 column under isocratic conditions using a water/acetonitrile/formic acid eluent. For detection and quantification, a triple-stage quadrupole-MS system (TSQ Quantum, ThermoFinnigan; San Jose, USA) in the selected reaction monitoring (SRM) scan mode was used. As an internal standard the structural homologous compound warfarin was chosen. The detector response was linear with a correlation coefficient of 0.988 to 0.999 for (R)-phenprocoumon and 0.989 to 0.999 for (S)-phenprocoumon in the investigated concentration range between 62,5 - 1000 ng/ml (per enantiomer). The limit of detection (LOD) is 12.5 ng/ml. This is the first enantioselective LC-MS/MS-method reported for phenprocoumon using a reversed-phase system with a chiral polymer as stationary phase.

INTRODUCTION

Phenprocoumon is an oral coumarin anticoagulant which is widely used throughout most of Europe. Among its side effects are heavy and life-threatening bleedings which are due to its long half life and narrow therapeutic margin. Phenprocoumon is a chiral drug which is applied clinically as a racemate. The enantiomers of phenprocoumon significantly differ in their interaction with serum albumin ¹, tissue distribution ², pharmacokinetic and pharmacodynamic properties ^{3,4}.

CYP2C9 catalyzes biotransformation of the vitamin K antagonist S-warfarin and acenocoumarol ⁵; individuals homozygous for *CYP2C9**3 are at high risk for bleeding complications ⁶. In vitro studies indicated that the related S-phenprocoumon may be a CYP2C9 substrate as well ⁷. In a clinical study we analysed (R)- and (S)-phenprocoumon plasma concentrations after a single-dose of 12 mg racemic phenprocoumon in healthy volunteers selected according to their *CYP2C9* genotype ⁸ to investigate the influence of genetic polymorphisms of the CYP2C9 enzyme to phenprocoumon metabolism. For this reason we developed a new enantioselective LC-MS/MS-method to quantify (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma.

A few analytical methods for quantification of racemic phenprocoumon and warfarin in human plasma and urine have been published. These were based on GC and GC-EI-MS-coupling ⁹⁻¹⁴, HPLC with UV or fluorescence detection ¹⁵⁻²², Thermospray and particle beam LC-MS ²³ and LC-Ion Trap MS coupling ²⁴.

Enantioselective analytical methods for determination of (R)- and (S)-phenprocoumon were described using chiral HPLC ²⁵⁻²⁷ and CE ²⁸⁻³⁰.

For chiral HPLC, different chromatographic systems were used: De Vries and Völker applied a Nucleosil-Chiral 2[®] as a chiral stationary phase under normal-phase conditions ²⁵, Rentsch et al. used a S,S-Whelk-01 column for stereospecific determination of acenocoumarol and phenprocoumon in human plasma by HPLC ²⁶ and in a second approach De Vries et al. utilised a α_1 -acid glycoprotein as a chiral stationary phase ²⁷.

In a recent publication the enantioseparation of phenprocoumon was achieved by capillary electrophoresis with UV and LIF (laser-induced fluorescence) detection with various CDs (Cyclodextrins) as chiral selectors ²⁸. Method development strategies for the enantioseparation of drugs by capillary electrophoresis containing anionic and/or uncharged cyclodextrin derivatives, also applicable to enantioseparation of phenprocoumon, was described by Fillet et al. ²⁹. Complex maltooligosaccharide mixtures as stereoselective

electrolyte modifiers were used for chiral separation of coumarin anticoagulant drugs by capillary electrophoresis in a work of D`Hulst et al.³⁰.

This paper details the development, validation and application of a new analytical method involving a solid-phase extraction (SPE) as clean-up procedure, enantioselective HPLC with a chiral polymer as stationary phase under reversed-phase conditions and electrospray ionization with a triple-stage quadrupole MS system in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Thereby we combined the advantages of some analytical methods described before: 1) Chiral separation of enantiomers with a robust stationary phase for multiple-runs, 2) Utilisation of a typical reversed-phase solvent system consisting of water/acetonitrile/formic acid (48/52/0.5), ensured good ionization of analyte molecules in the electrospray-ionization mode, 3) Good sensitivity, selectivity and large dynamic range due to SRM mode of triple-stage quadrupole MS system.

In this paper, we present a fully validated enantioselective LC-MS/MS-method for stereospecific quantification of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma.

To the author`s best knowledge, this is the first published enantioselective LC-MS/MS assay for the quantification of phenprocoumon enantiomers in human plasma.

EXPERIMENTAL

Chemicals and materials

Phenprocoumon was obtained from Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany), warfarin (WF) was purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), (R)- and (S)-phenprocoumon enantiomers were a kind donation of Hofmann-La Roche AG, Basel. Acetonitrile, methanol were of HPLC-gradient-grade, formic acid of analytical reagent grade (all from Merck; Darmstadt, Germany). Double-distilled water from an in-house distillation-system was used for chromatography and preparation of solutions. Human blank plasma was kindly supplied by the Blood-Donation-Centre, University Hospital Tübingen. (EDTA-) Plasma samples were collected from volunteers given a single dose of 12 mg phenprocoumon p.o..

C-18 SPE-cartridges (SepPak, 100mg, 1ml) were supplied by Waters (Eschborn, Germany).

Instrumentation

The LC-equipment consisted of a Surveyor HPLC-system (ThermoFinnigan; San Jose, USA) comprising a vacuum-degasser, a quaternary pump, a thermostatted autosampler and

column-oven. For chiral separation of phenprocoumon and warfarin a Chira-Grom-2 column (250x1mm, 8 μ m; Grom Analytik GmbH, Herrenberg, Germany) with a 10x1 mm guard-column filled with the same material was used. All HPLC-tubing was of PEEK-material. The analytes were detected by a ThermoFinnigan TSQ Quantum triple-stage-quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray (ESI) source. The system was controlled and the data were collected and analysed by the ThermoFinnigan Xcalibur software package, revision 1.3.

Preparation of stock and working solutions

Stock solutions of racemic phenprocoumon and the IS were prepared in methanol (1.0 mg/ml racemate) and stored protected from light at 4°C for a maximum period of 6 months. Working solutions of phenprocoumon were prepared by diluting a small portion of stock solution with the required volume of a 1:1 mixture of methanol/water. WF stock solution was successively diluted with methanol/water and finally with water only to give a solution of 5 μ g/ml used for spiking of samples.

Calibration samples

The stock solution of phenprocoumon was diluted with methanol/water to give concentrations of 10, 20, 40, 60, 80 and 160 μ g/ml. For each level 500 μ l of working solution was added to 40 ml blank non-pooled human plasma, which was then mixed and portioned into aliquots of 1.0 ml. The final concentrations of calibration samples thus were: 62.5, 125, 250, 375, 500 and 1000 ng/ml for each phenprocoumon enantiomer.

Quality control samples

Quality control samples were prepared analogically from drug free human plasma at four concentration levels (100, 300, 600 and 900 ng/ml of phenprocoumon enantiomer). A sufficient number of 1.0 ml samples were portioned and frozen at -25°C until analysis.

Stability of calibration and quality control samples under these conditions were determined as described below.

Sample preparation

Sample purification was accomplished according to a slightly modified method of McAleer et al. 31:

To 1.0 ml plasma 50 μ l IS (warfarin 5 μ g/ml) was added and the pH was adjusted to ca. 3 by addition of 50 μ l H₃PO₄ (85%). Samples were then mixed and centrifuged (19800g, 5min, 18°C).

The SPE columns were coupled to a vacuum manifold, conditioned with 2 ml of methanol and equilibrated with 2 ml of methanol 1%, pH 2.8 (adjusted with 10 N HCl). 1.0 ml of sample supernatant was transferred onto the column and slowly drawn through the cartridge (ca. 0.5 ml/min) which was subsequently washed with 3 x 1 ml methanol 1%, pH 2.8 and 1 ml water. After drying under full vacuum for 10 min, the analytes were eluted with 1.0 ml methanol by centrifugation. The eluate was injected into the HPLC-system without further treatment.

Chromatographic conditions and MS detector settings

From the extracted sample, 25 μ l were injected into a 20 μ l sample loop. Baseline separation of the enantiomers of phenprocoumon and the IS was achieved by isocratic elution with an eluent consisting of water/acetonitrile/formic acid (48/52/0.5) at a flow rate of 100 μ l/min. Column oven temperature was set to 30°C, the autosampler temperature to 15°C. Each run was stopped after 13 min.

The mass spectrometric parameters were tuned for optimization of the sensitivity in positive electrospray mode. This was done by direct infusion of a phenprocoumon- and WF-standard solution with a syringe pump at 10 μ l/min for tuning the collision gas pressure (Argon) and collision energy. Optimization of the spray voltage, ion transfer capillary temperature and sheath gas pressure was performed by loop injection (5 μ l) into the eluent stream at the conditions described above. The optimized parameters for the ESI were as follows: sprayer needle in 90° position to orifice, spray voltage: 4 kV, sheath gas (nitrogen): 27 (arbitrary units, initial nitrogen pressure: 7.5 bar), aux gas: off, capillary heater temperature: 300°C. For MS/MS-analysis the collision cell was filled with argon at a pressure of 1.33x10⁻⁶ bar. The instrument was run in the selected reaction monitoring (SRM) mode and the following transitions were detected for quantification in intervals of 0.5 sec: Phenprocoumon m/z 281.1→203.1 at 22 V and 281.1→175.0 at 32 V; IS m/z 309.1→163.0 at 22 V. Scan width was set to 0.7 amu, peak width for the first and third quadrupole to 0.5 amu.

RESULTS AND DISCUSSION

Mass spectrometry

The positive electrospray Q1 mass spectrum and product ion spectrum of phenprocoumon and WF are shown in Fig. 1 and Fig. 2. The protonated molecular ion at m/z 281.1 was used as the precursor ion to obtain a product ion spectrum. The two most intense precursor to fragment transitions m/z 281.1 \rightarrow 203.1 and 281.1 \rightarrow 175.0 were selected for monitoring the compound. The proposed fragment structures are also displayed in Fig. 1 and 2²⁴. Likewise for the Internal Standard warfarin the most abundant fragment ion served as signal for quantification (m/z 309,1 \rightarrow 163,0).

Method development

Phenprocoumon was introduced 1953 and since then has been analysed extensively by both achiral and chiral methods. However non of the tested methods was directly applicable for the chiral analysis of phenprocoumon by LC-ESI-MS/MS mainly due to involatile buffers or organic ESI-incompatible eluents. New copolymeric stationary phases with chiral moieties like Chira-Grom-2 can be run under normal-phase or under reversed-phase conditions and thus are suitable for LC-MS applications. We first tested eluent systems consisting of water/2-propanol, water/methanol and water/acetonitril both with and without addition of 0.1% formic acid finding that only with water/acetonitril/formic acid reasonable separation of phenprocoumon and the structurally similar WF was possible. Significant tailing indicated that the acid concentration was too low and in fact disappeared when the formic acid content was increased to 0.5% (v/v). In our case isocratic elution was clearly superior to gradient elution, because the Chira-Grom-2-phase, particularly at low flow rates like 100 μ l/min, needs markedly more time for reequilibration than normal C18-phases.

(R)- and (S)-phenprocoumon were identified by separate injection of the pure enantiomers. Racemisation during sample pretreatment and analysis did not occur, which was examined by spiking and extracting blank plasma samples with single-enantiomer-standards. The first WF peak, which did not overlap with phenprocoumon served as Internal Standard. WF peaks were not identified stereochemically.

Representative ion-chromatograms obtained from a plasma extract at the LOQ (62,5 ng/ml enantiomer) and at the estimated LOQ (12,5 ng/ml enantiomer) are shown in Fig. 3 and 4.

Selected reaction monitoring was chosen for data acquisition as this is usually the most selective and sensitive mode for quantification using a triple stage mass spectrometer. Although sensitivity was not a critical parameter, the mass spectrometric selectivity payed off in the lower concentration range, where phenprocoumon could not be quantified by UV-detection due to interfering peaks. Apart from that the use of warfarin as IS was only possible with MS-detection since the second WF-enantiomer coelutes with the first

phenprocoumon-enantiomer. WF and phenprocoumon have largely similar chemical properties, however a deuterated internal standard would probably have contributed positively to the method's precision and accuracy.

Evaluation of the analytical method

Selectivity

Several different blank plasma samples (n>6) were extracted and analysed. None of them showed interfering peaks at the retention times of phenprocoumon or the IS.

Determination of matrix-ion-suppression effects

The influence of coextracted plasma substances is measured by extraction of a series of three blank plasma samples. These blank extracts are spiked with three different concentrations of phenprocoumon (62.5, 250, 1000 ng/ml per enantiomer) and the IS and are analysed together with samples containing the same concentrations of phenprocoumon and IS in methanol. To exclude significant ion-suppression effects the average signal response of phenprocoumon in spiked plasma extracts should not deviate from the average response of the standards by more than 15 %. The maximum deviation for our method was 11.8 % at 1000 ng/ml.

Calibration and limits of detection and determination

The linearity of the method was evaluated over the concentration of 62.5 – 1000 ng/ml (per enantiomer). The calibration curve was comprised of 6 points including: 62,5, 125, 250, 375, 500 and 1000 ng/ml. The assay acceptance criterion for each back-calculated standard concentration was 15% deviation from the nominal value except the LOQ which was set at $\pm 20\%$. Peak area ratios (analyte/internal standard) were used for calculation. The standard curve showed best linearity when fitted to a $1/x^2$ weighted quadratic regression. Correlation coefficients for the calibration curves during the validation process ranged from 0.988 to 0.999 for (R)- phenprocoumon and 0.989 to 0.999 for (S)- phenprocoumon.

The estimated LOD with a signal to noise ratio (SNR) of 3:1 was at least 12,5 ng/ml of phenprocoumon enantiomer. Applying the SNR-method for the LLOQ, the lowest quantifiable concentration should have been at around 75 ng/ml with a SNR of 10:1. However, for the study which this method was developed for, the lowest expectable concentrations were calculated to be above 125 ng/ml; therefore validation was not

performed for samples below that point. Eventually, after analysis of pharmacokinetic samples of 26 candidates, the LOQ did not prove to be a problem.

Extraction Recovery

Recovery of (R)- and (S)- phenprocoumon was determined for three different concentrations (200, 1200, 1800 ng/ml racemate). This was done by spiking 950 µl of blank plasma with 50 µl of phenprocoumon-standard to give the required concentration and extracting according to the described procedure (n=3 per level). Prior to analysis IS was added to the extracts. The area ratios of analyte to IS were then compared to the ratio of methanolic samples containing exactly the same amounts of phenprocoumon and IS. For all three concentrations and for both enantiomers extraction efficiency was > 89%.

Intra- and inter-day accuracy and precision

The intra- and inter-day accuracy and precision of the assay were tested by analysis of four QC sample concentrations in replicates of six on three separate days each processed together with new calibration samples. The precision was expressed as the coefficient of variation (CV %). Accuracy is calculated as the mean deviation of QC-samples from the nominal value. The results are summarized in table 1 and 2. The overall precision ranged from – 8.60 to 1.93% for the (R)- and from –9.04 to 3.02 for the (S)-Enantiomer, the overall accuracy ranged from 3.46 to 6.91 for (R)- and from 3.24 to 7.01% for (S)-phenprocoumon.

Long-term stability and stability of samples against freeze-thaw cycles

For determination of the long-term stability, QC samples (n=3 per level) were stored at – 25°C for six months and analysed together with freshly prepared calibration samples. The same was carried out for QC samples that were thawed, stored at room temperature for one hour and again frozen at –25°C for 24 hours three times. No evidence of analyte degradation was observed at concentrations of 200, 600, 1200, 1800 ng/ml (racemate) in human plasma.

Application of the method to patient sample

The practicability of the new LC-MS/MS-method was tested by examination of a steady-state plasma sample from a female patient, aged 46, taking 11 mg Phenprocoumon per week. The sample was pretreated and analysed as described above. As can be seen in Fig. 5 the enantiomeric ratio in this case is next to 1,0.

CONCLUSION

An LC-MS/MS method was validated for the enantioselective and quantitative determination of the coumarin-anticoagulant phenprocoumon in human plasma. Compared to many other chiral applications for this purpose, the described method is robust, easy and comparatively fast. The stationary phase of the Chira-Grom-2-polymer is a very stable chiral selector which can be used over a fairly wide pH range and showed no deterioration of separation after almost 500 injections. Meanwhile several hundred samples from a clinical study have been analysed with this methodology and it could be shown that it has the required sensitivity and calibration range for measuring enantioselectively therapeutic phenprocoumon-plasma levels during steady-state and those within a time-interval of 144 hours after single-dose administration of 12 mg phenprocoumon as necessary for pharmacokinetic studies.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the support of the German Federal Ministry of Research and Education (grant 01 EC 0001) and the AKF program of the Medical Faculty, University of Tübingen (grant AKF 72-0-0).

References

1. Brown NA, Jähnchen E, Müller WE, Schmidt W, Wollert U. *Comp Biochem Physiol.* 1979; 62: 101-105.
2. Schmidt W, Jähnchen E. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 29: 266-271.
3. Jähnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Groth U, Martini A. *Clin Pharmacol Ther.* 1976; 20: 342-349.
4. Herwick DS, Shepard AM. *J Pharm Pharmacol.* 1976; 28: 257-258.
5. Kaminsky L, Zhang Z. *Pharmacol Ther.* 1997; 1: 67-74.
6. Freeman B, et al. *Surgery.* 2000; 128: 281-285.
7. Minxia H, Korzekwa K, Jones J, Rettie A, Trager W. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 372: 16-28.

8. Roots et al. Influence of CYP2C9 amino acid polymorphisms on enantioselective metabolism of R-/S-phenprocoumon. 2002; ASCPT-Kongress.
9. Maurer HH, Arlt JW. *J Chromatogr B*. 1998; 714: 181-195.
10. Roseboom H, Hulshoff A. *J Chromatogr*. 1979; 173: 65-74.
11. De Vries JX, Zimmermann R, Harenberg J. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986; 29: 591-594.
12. De Vries JX, Simon M, Zimmermann R, Harenberg J. *J Chromatogr*. 1985; 338: 325-334.
13. Heimark LD, Trager WF. *Biomed Mass Spectrom*. 1985; 12: 67-71.
14. Brombacher P, Cremers H, Mol M, Muijers P, van der Plas P, Verheesen P. *Clin Chim Acta*. 1977; 75: 443-448.
15. Below E, Burrman M. *J Liq Chromatogr*. 1994; 17: 431-444.
16. Bogusz M, Erkens M. *J Chromatogr A*. 1994; 674: 97-126.
17. Edelbroek P, Van Kempen MJ, Hessing TJ, De Wolff FA. *J Chromatogr*. 1990; 347-358.
18. De Vries JX, Völker U. *J Chromatogr*. 1990; 529: 479-485.
19. Petersen D, Barthels M, Schumann G, Buttner J. *Haemostasis*. 1993; 23: 83-90.
20. Eigendorf H, Moeschwitzer G, Budde R. *Pharmazie*. 1989; 44: 645-646.
21. Kinawi A. *Arzneimittel-Forschung*. 1977; 27: 360-363.
22. De Vries JX, Schmitz-Kummer E. *J Chromatogr B*. 1994; 655: 63-71.
23. De Vries JX, Kymber KA. *J Chromatogr*. 1991; 562: 31-38.
24. Kollroser M, Schober C. *Clin Chem*. 2002; 48: 84-91.
25. De Vries JX, Völker U. *J Chromatogr*. 1989; 493: 149-156.
26. Rentsch KM, Gutteck-Amsler U, Bühler R, Fattinger KE, Vonderschmitt DJ. *J Chromatogr B*. 2000; 742: 131-142.
27. De Vries JX, Schmitz-Kummer E. *J Chromatogr*. 1993; 644: 315-320.
28. Chankvetadze B, Burjandze N, Blaschke G. *Electrophoresis*. 2001; 22: 3281-3285.
29. Fillet M, Hubert P, Crommen J. *Electrophoresis*. 1998; 19: 2834-2840.
30. D'Hulst A, Verbeke N. *Chirality*. 1994; 6: 225-229.
31. McAleer SD, Chrystyn H, Foondun AS. *Chirality*. 1992; 4: 488-493.

Figures:

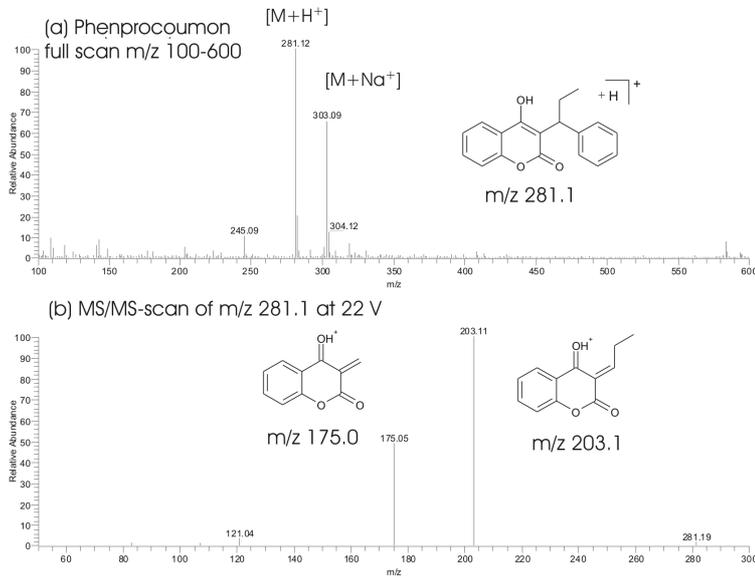


Fig. 1. Phenprocoumon: structure and pos. electrospray-MS spectrum (a); CID-spectrum and proposed fragment-ions – both fragments are used for quantification in SRM mode (b)

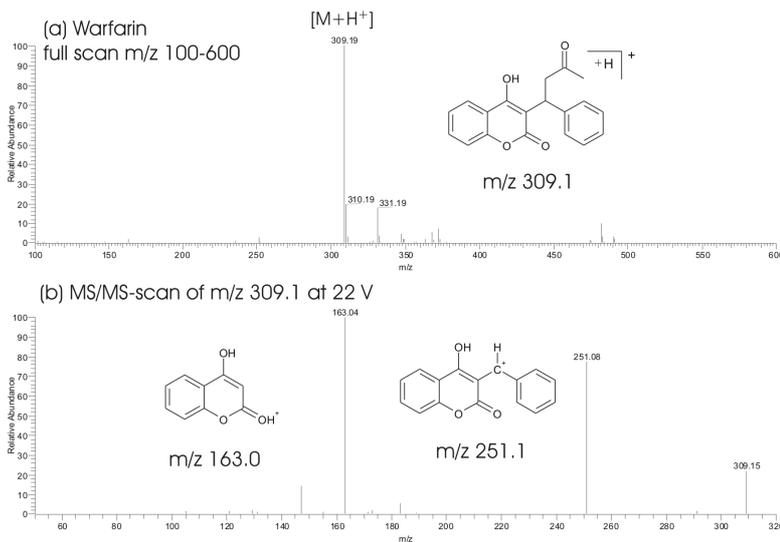


Fig. 2. Warfarin (internal standard): structure and pos. electrospray-MS spectrum (a); CID-spectrum and proposed fragment-ions – only fragment m/z 163.1 is used for quantification in SRM mode (b)

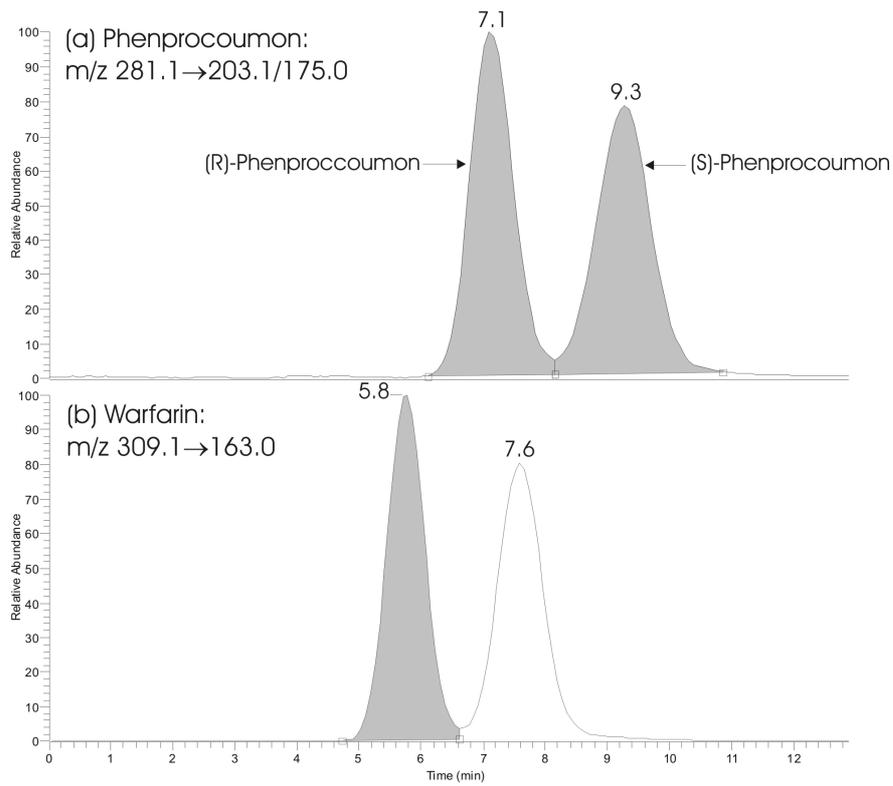


Fig. 3. SRM-chromatograms of (R)- and (S)-Phenprocoumon at the LLOQ (125 ng/ml) (a) and of Warfarin (b) – 1st peak served as internal standard

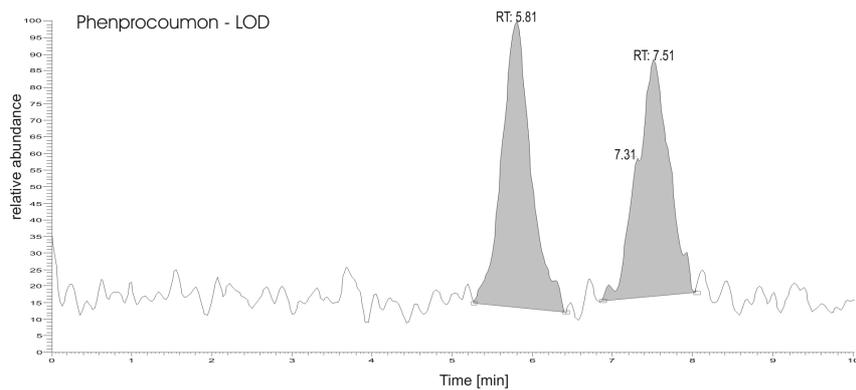


Fig. 4. Plasma spiked at 12.5 ng/ml of each Phenprocoumon-enantiomer (LOD)

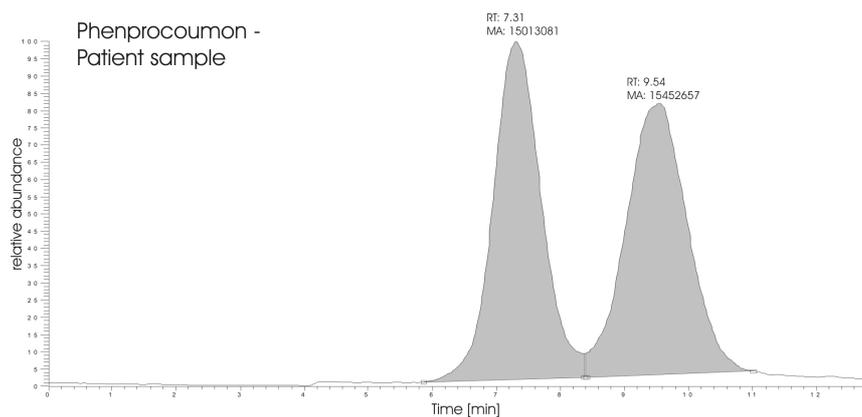


Fig. 5. SRM-chromatogram of a steady-state patient sample

Tables:

table 1

Intra- and inter-day precision and accuracy of (R)-phenprocoumon

nominal enantiomer concentration (ng/ml)	Intra-day accuracy and precision (n=6)			Inter-day accuracy and precision (n=6)
	day 1	day 2	day 3	
100 ng/ml				
mean deviation %	7,85	1,39	-2,81	1,93
CV %	5,58	2,59	1,05	5,55
300 ng/ml				
mean deviation %	9,40	-5,22	-1,06	1,46
CV %	2,30	1,16	1,61	6,91
600 ng/ml				
mean deviation %	-1,16	-10,30	-8,68	-5,71
CV %	4,30	2,55	0,50	5,64
900 ng/ml				
mean deviation %	-6,96	-9,54	-8,41	-8,60
CV %	5,89	2,36	1,97	3,46

table 2

Intra- and inter-day precision and accuracy of (S)-phenprocoumon

nominal enantiomer concentration (ng/ml)	Intra-day accuracy and precision (n=6)			Inter-day accuracy and precision (n=6)
	day 1	day 2	day 3	
100 ng/ml				
mean deviation %	6,19	0,18	-0,92	2,21
CV %	4,89	3,28	0,73	4,52
300 ng/ml				
mean deviation %	11,09	-3,45	-0,19	3,02
CV %	3,05	1,40	2,01	7,01
600 ng/ml				
mean deviation %	-0,61	-9,67	-8,05	-4,93
CV %	4,25	2,40	1,25	5,56
900 ng/ml				
mean deviation %	-7,73	-10,51	-8,07	-9,04
CV %	5,90	1,95	2,33	3,24

4.2 Achiral-chiral LC/LC-MS/MS-coupling for determination of chiral discrimination effects in phenprocoumon metabolism

submitted to Analytical Biochemistry, accepted 07.01.2005

RUNNING TITLE: Chiral discrimination effects determined by LC/LC-MS/MS

ABSTRACT

Many physiological processes show a high degree of stereoselectivity, such as the metabolism of xenobiotics as catalyzed by cytochrome-P450 enzymes. An analysis of these chiral discrimination effects in drug metabolism is essential for an in-depth understanding of metabolic pathways that differ between enantiomers of a given chiral drug or metabolite thereof. Achiral chromatographic separation and structural identification followed by chiral analysis of metabolites from blood specimens usually requires a time-consuming multistage analytical technique.

In an effort to optimize such a complicated analytical scheme, a novel two-dimensional online achiral-chiral LC/LC-MS/MS coupling method was developed by using a peak parking technique in combination with a make-up flow system. Metabolites were separated in the first dimension using a C18-reversed-phase system. A make-up eluent of water/methanol (95/5) was split into the flow before storing the metabolites separately on chiral cartridges. Subsequently the metabolite-enantiomers were eluted backwards onto the analytical chiral column, separated and the ratio of enantiomers was determined. The method was successfully validated with respect to limit of detection, linearity, intra- and inter-day accuracy and precision.

In the course of a human volunteer study investigating the influence of CYP (cytochrome) 2C9 genetic polymorphism on Phenprocoumon (PPC) metabolism, we used this new two-dimensional online analytical technique for the analysis of PPC metabolites in plasma. The enantiomeric forms of 4'-, 6- and 7- hydroxy-PPC metabolites as well as two novel metabolites were identified and the ratio of the enantiomers was calculated. We found that the enantiomeric ratio for the different metabolites in the plasma sample of each measured individual differs markedly with an almost 100 % chiral discrimination for the two new putative metabolites.

This new analytical coupling method possesses general utility in the analysis of chiral discrimination effects, particularly as it relates to pharmacokinetics and dynamics, a scientific field which is rapidly becoming an area of concern and interest.

Keywords: Phenprocoumon - metabolites - chiral separation – achiral-chiral LC/LC-MS/MS coupling – chiral discrimination in drug metabolism

Nonstandard abbreviations: PPC, Phenprocoumon; CYP, cytochrome; SRM, selected reaction monitoring; ESI, electrospray ionisation

INTRODUCTION

Investigations about chiral discrimination effects in the phase I metabolism of chiral drugs, e.g. Phenprocoumon (PPC), are still rare due to absence of enantiospecific analytical methods for the determination of metabolites - monohydroxylated metabolites in the case of PPC. The development of such a methodology has been hindered by various factors, such as the similar polarity of monohydroxylated metabolites and their particular low plasma concentrations in both healthy volunteers and patients. Therefore a technically-demanding analytical approach providing high sensitivity as well as achiral and chiral selectivity was required.

To address these problems only few orthogonal analytical approaches in the literature are described. Most published procedures combine different chromatographic techniques to improve selectivity, working with UV-, fluorescence- or seldom MS-detection. These applications include ion exchange - achiral reversed phase chromatography with MS detection (1-3), turbulent flow chromatography with MS detection (4-6), on-line solid phase extraction - achiral reversed phase chromatography with MS detection (7-12) achiral reversed phase – achiral reversed phase chromatography with MS detection (13-16) achiral reversed phase - chiral normal phase chromatography with UV detection (17,18) achiral reversed phase – chiral reversed phase chromatography with fluorescence detection (19,20) and UV detection (21-24).

The 4-hydroxycoumarin PPC is widely used throughout Europe as an oral anticoagulant in the treatment of thromboembolic disorders (25). Due to its narrow therapeutic index a repeated determination of prothrombin time is required. Despite such pharmacodynamic effect monitoring large interindividual differences of the dose-response relationship frequently give rise to bleeding complications or insufficient anticoagulation (26). These variations are mainly due to pharmacokinetic aspects and further knowledge about

metabolic, genetic, and other risk factors influencing the metabolism of anticoagulants is therefore warranted (25,27).

PPC and other commonly used oral anticoagulants, such as warfarin or acenocoumarol exist in two enantiomeric forms and are administered as racemates. (S)-PPC has an about 1.5 to 2.5-fold higher anticoagulant potency than the (R)-enantiomer (28). The drug has *in vitro* been shown to be a substrate of CYP2C9 (29). Most recently, we have investigated the *in vitro* metabolism of PPC using CYP-specific monoclonal inhibitory antibodies (mAbs) and identified CYP2C9 and CYP3A4 as major enzymes catalysing (S)- and (R)-PPC hydroxylation (30). CYP2C9 appeared quantitatively more important with respect to the hydroxylation of (S)-PPC than (R)-PPC. This is in line with results from a recent *in vivo* study showing a more pronounced effect of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of (S)- compared to (R)-PPC (31).

This paper details the development and application of a new orthogonal achiral/chiral analytical approach involving solid-phase extraction (SPE) as clean-up procedure, achiral and chiral HPLC, both under reversed-phase conditions, and electrospray ionization with a triple-quadrupole MS system in the selected reaction monitoring (SRM) mode. For this purpose we developed a new column switching application based on two motor valve systems using "peak-parking" on chiral cartridges.

Therefore we combined the advantages of some analytical methods described earlier: 1) achiral separation of monohydroxylated metabolites 2) peak accumulation and parking 3) chiral separation of enantiomers with a robust stationary phase for multiple-runs; 4) utilisation of typical reversed-phase solvent systems, consisting of water/acetonitrile/formic acid and methanol/ammonium acetate buffer for both chromatographic systems, ensured good ionization of analyte molecules in the electrospray-ionization; 5) good sensitivity, selectivity and large dynamic range due to the SRM mode of the triple-quadrupole MS system.

It is envisioned that this approach could be adopted as a new technical platform for a wide range of different achiral/chiral LC-LC-analyses to elucidate chiral discrimination effects of drugs and metabolites in general.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Racemic 4'-, 6-, 7- and 8-hydroxyphenprocoumon (4'-, 6-, 7-, 8-OH-PPC; fig. 1) were a kind gift of Prof. W.F. Trager, University of Washington, Seattle. (R)- and (S)-PPC was

kindly provided by Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland). Warfarin (Pestanal[®], analytical standard) was purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Methanol and acetonitrile were of high performance liquid chromatography (HPLC) gradient grade, glacial acetic acid, formic acid, ammonium acetate, ortho-phosphoric acid and potassium phosphate were all of analytical grade (all from Merck; Darmstadt, Germany). Double-distilled water, prepared from demineralized water, was used for all experiments. C-18 SPE-cartridges (SepPak C18, 200mg, 3ml) were supplied by Waters (Eschborn, Germany). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for microsomal incubations was purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, USA).

Plasma samples

Blank human plasma for spiked samples was obtained from the Blood-Donor-Centre, University Hospital of Tuebingen.

Genuine plasma samples were collected from volunteers taking part in a study on the enantiospecific pharmacokinetics of PPC, receiving 12 mg racemic PPC as a single oral dose (31). The applicability of our method was tested by analysis of plasma samples drawn 144 hours after drug administration in healthy volunteers with different CYP2C9 genotypes: Two extensive metabolizers (alleles *1/*1 and *2/*2) and one poor metabolizer (*3/*3).

Preparation of standard plasma samples

All PPC-metabolites were provided as racemates in amounts of only 1-5 mg. Thus stock solutions for 4'-OH-, 6-OH- and 7-OH-PPC were prepared by dissolving ca. 1mg (exactly weighed on a Sartorius Genius ME235S analytical balance – Goettingen, Germany; weighing error: $d=0.01$ mg) metabolite in 1.0 ml methanol. 8-OH-PPC was ignored, for it is not present in the systemic circulation in measurable amounts. From these stock solutions dilutions of 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ and 100 ng/ml in methanol/water (1/1) were obtained. For each concentration level 40 ml blank plasma was spiked with the appropriate dilution of each metabolite, so that all three metabolites were contained in the samples, giving final concentrations of 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 20, 50, 100 and 200 ng/ml . Spiked plasma was then aliquoted to 2 ml and stored at -20°C in darkness.

Extraction of Phenprocoumon-metabolites from human plasma

To 2.0 ml plasma 1.0 ml water for lower sample viscosity and 100 μl H_3PO_4 (85%) were added to adjust the pH to approximately 3. Samples were then mixed and centrifuged (19800g, 5min, 18°C). The SPE columns were coupled to a vacuum manifold, conditioned

with 2 ml of methanol and equilibrated with 2 ml of water/methanol (99/1), pH 2.8 (adjusted with 10 N HCl). 3.0 ml of sample supernatant was transferred onto the column and slowly drawn through the cartridge (ca. 0.5 ml/min), that was subsequently washed with 2 x 1 ml water/methanol (99/1), pH 2.8 and 1 ml water. After drying under full vacuum for 10 min, the analytes were eluted with 1.0 ml methanol by centrifugation. The eluate was evaporated to dryness in a SpeedVac vacuum sample concentrator (Thermo Life Sciences; Holbrook, USA) at 40°C for 2 h. The residue was reconstituted with 125 µl ammonium acetate buffer (5 mM, pH 3.9)/methanol (1/1). After centrifugation 20 µl of the supernatant were injected into the HPLC-system.

Method validation

Limit of detection (LOD) and linearity: A concentration series of plasma standards from 0.05 to 200 ng/ml (see preparation of standards) was extracted and measured by two-dimensional LC-MS/MS three times. The LOD was determined as the lowest concentration giving clearly discernible peaks with a minimum signal to noise ratio of 3:1. Linearity was investigated in order to assure that all measured volunteer samples are within the linear range. For the determination of method linearity each enantiomer was examined separately and the external standard methodology was applied. According to FDA-guidelines the acceptance-criteria for linearity were a maximum deviation from the nominal value of +/- 20 % for the lowest calibration level (= limit of quantification) and +/- 15 % for all other levels.

Intra-/interday-precision and accuracy for 4'-, 6- and 7-OH-PPC: Standard plasma samples (0.5, 5.0 and 50 ng/ml) were processed and analysed by LC-LC-MS/MS coupling in replicates of four on three different days. As the purpose of the method is not to measure absolute concentrations but enantiomer-ratios, the variability was appraised by using the R/S-enantiomer-ratio as parameter for calculation of variability and precision.

Precision of all metabolites: Volunteer plasma samples contain two additional compounds which most likely are also monohydroxylated PPC-metabolites. For these compounds analytical synthetic standards are not available, therefore method-variability for these analytes could not be determined as described for the standard samples containing only the three known metabolites 4'-, 6- and 7-OH-PPC. In order to circumvent this problem and perform a validation also covering the new metabolites, a homogenous plasma sample from a CYP2C9 *1/*2 and a CYP2C9 *2/*3 volunteer was extracted and measured six times. Standard deviation and coefficient of variation for each R/S-enantiomer-ratio was then calculated as a measure of method variability.

Recovery: Other than the validation criteria above, recovery was determined by achiral LC-MS/MS on the C18-column (using the first dimension of the column-coupling-method). In threefold replication plasma standards with concentrations of 50, 100 and 200 ng/ml were extracted, evaporated to dryness and reconstituted with 100 μ l ammoniumacetat-buffer 5mM, pH 3.9, 50 μ l methanol and 50 μ l internal standard (warfarin, 5 μ g/ml in methanol). These samples were analysed against standard dilutions containing the nominal concentration of the extract in pure methanol/buffer (1/1) and the same amount of internal standard. Recovery was calculated as ratio [(peak area analyte/peak area internal standard) after extraction / (peak area analyte/peak area internal standard) of standard without extraction] in percent. Warfarin was detected in the positive SRM mode: m/z 309.1 \rightarrow 163.0 at 22 V. Only for determination of extraction-recovery warfarin as internal standard was used; for all enantiomer-ratio measurements by LC-LC coupling an internal standard was not applicable.

Microsomal incubation of (R)- and (S)-phenprocoumon

Stereochemically pure (R)- and (S)-PPC (1.0 mM) dissolved in methanol was separately incubated with human liver microsomes (1.0 mg/ml) for one hour at 37°C using a KH₂PO₄-buffer (0.05 M, pH 7.40). Incubations were initiated by addition of NADPH (1mM) and terminated by freezing on dry ice. After thawing at 4°C samples were immediately centrifuged for 10 min (10.000g) and the supernatant extracted as described above resulting in an about ten-fold concentration. LC- and LC/LC-MS/MS analysis was performed analogous to plasma samples.

Instrumentation

The achiral separation of PPC-metabolites was achieved on a Surveyor HPLC-system (ThermoFinnigan; San Jose, USA) consisting of a vacuum-degasser, a quaternary pump, a thermostated autosampler and column-oven with a C-18 column (Grom Sil 120 ODS-3 CP, 150x2 mm, 5 μ m plus 10x1 mm Grom Sapphir C18, 5 μ m precolumn - Grom Analytik GmbH; Herrenberg, Germany). A Sykam S1100 solvent delivery system (Sykam GmbH; Fuerstenfeldbruck, Germany) served as pump for the make-up flow. As "parking cartridges" Chira Grom 2 (10x2 mm, 8 μ m) precolumns in separate guard-column holders (Grom Analytik GmbH) were employed. A two-way double-headed Rheodyne motor switch valve (type: 7725) and a 6-way double-headed motor valve (type: 7066-003) (both: Besta-Technik; Wilhelmsfeld, Germany) controlled via the autosampler were the interface between the C-18 column, the parking cartridges and the chiral column.

For chiral separation of PPC-metabolites a Chira Grom 2 column (250x2 mm, 8 μ m; Grom Analytik GmbH) connected to a Spectra Series P100 isocratic pump (Thermo Finnigan) was used. All HPLC-tubing was of PEEK-material.

The analytes were detected by a ThermoFinnigan TSQ Quantum triple-stage-quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionisation (ESI) source. The system was controlled and data were collected and analysed by the Thermo-Finnigan Xcalibur software package, revision 1.3.

MS-detector settings

Analyte detection optimization led to the following conditions: The sprayer needle within the ESI-Interface was adjusted in the 90° position towards the orifice, spray voltage 4000 V in positive ion mode, capillary temperature 320°C, sheath gas 35 (arbitrary) units, auxiliary gas 15 units, collision gas (Argon) 1.0 mTorr. The best signal to noise ratio and best selectivity were obtained in the SRM mode.

RESULTS

MS/MS-spectra of Phenprocoumon-metabolites

Standard solutions of 4'-, 6-, 7-, 8-OH-PPC (1 μ g/ml) in ammonium acetate buffer/methanol (1/1) were infused into the ESI-source at a flow rate of 10 μ l/min to examine the positive ESI fragmentation pattern (sheath gas: 20 units, auxiliary gas off, all other MS conditions as described above). MS/MS-spectra and the proposed fragment structures are shown in fig. 2. 4'-OH-PPC with its main product ions m/z 203 and 175 can be clearly distinguished from the other three metabolites, which exhibit essentially the same fragmentation characteristics.

For SRM detection of 4'-OH-PPC the two most abundant ion transitions m/z 297.2 \rightarrow 175.0 (at 34 V collision energy) / 203.2 (at 20 V) and for 6-, 7-, 8-OH-PH the transitions m/z 297.2 \rightarrow 191.2 (at 32 V) / 219.1 (at 22 V) were chosen.

Detection was also tested in negative ionisation mode, however the signal to noise ratio there is not significantly better compared to positive ionisation. The main reason why we chose the positive mode is that fragmentation of metabolites is markedly different in negative mode and makes it difficult to separate the ion chromatogram traces of 4'-OH-PPC, new metabolite 1 and new metabolite 2 on the one hand and 6-OH-PPC and 7-OH-PPC on the other hand. In positive ion mode the overlap of 6-OH-PPC and new metabolite 2 is unproblematic as they produce different fragments and can therefore be separated mass

spectrometrically by selecting only specific ion traces in the chromatogram report. This is not possible when negative ionisation is used.

Chiral chromatographic analysis

To determine the chromatographic behaviour of each metabolite on the chiral Chira Grom 2 column, separate LC-runs for each metabolite under different conditions were started. From earlier studies on quantitative chiral LC-MS-analysis of PPC with a similar column (32) (Chira Grom 2, 250x1 mm) we knew that baseline separation of the PPC-enantiomers can be achieved with water/acetonitrile/formic acid (48/52/0.5) as eluent. Starting from this we tested the eluent with varying acetonitrile concentrations and found that water/acetonitrile/formic acid (50/50/0.5) at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ delivers the best chromatographic resolution (fig. 3). Unfortunately all metabolite peaks overlap to a certain extent and apart from 4'-OH-PPC cannot be distinguished by mass spectrometry so that a chiral analysis of a sample containing all metabolites on a single column is not feasible.

Achiral chromatographic analysis

The chromatographic problem described above led to the consideration that an achiral separation of the metabolites prior to chiral analysis could eliminate the lack of inter-substance resolution. Eluents consisting of acetonitrile – methanol – tetrahydrofuran - acetic acid (33), acetonitrile – water - acetic acid (34), ammonium acetate buffer - methanol (35) and methanol - 0.5% acetic acid (36) are described in the literature for the separation of PPC-metabolites and PPC on C-18 columns. Tests with some of these mixtures revealed that with our equipment gradient elution using ammonium acetate buffer (5 mM, pH 3.9) (solvent A) and methanol (solvent B) produces the most satisfying results. The gradient was programmed as follows: Start at 45 % A, 45% A linear to 40% in 10 min, 40 % A linear to 30% A within next 5 min, back to 45 % A at 15.1 with reequilibration until 18 min at a flow rate of 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. A chromatogram of metabolite-standards is depicted in fig. 4. Identity of the peaks was confirmed by injection of the single metabolites and comparison of respective retention times.

Combination of achiral and chiral separation

The next logical step would have been a combination of both separation techniques via direct column-coupling as described e.g. by McAleer (37) by switching the eluent flow from the C-18 column to the chiral column before the first and back after the last peak and then change to water/acetonitrile/formic acid for the chiral chromatography. However, for

once the two solvent systems are not compatible with the chiral separation if direct coupling is applied. Since a certain amount of buffer-methanol has to be pumped onto the chiral column before equilibration with water/acetonitrile, a reasonable separation is not possible any longer due to the significantly different behaviour of the analytes under these two eluent conditions. Secondly, in-line coupling of the two relatively long columns leads to extremely high backpressure.

This conflict can be avoided by first separating the metabolites achirally with buffer-methanol on a C-18 column, then excising each peak separately on a small chiral column with a higher retention strength than C-18 material and finally eluting the substance backwards with water/acetonitrile/formic acid onto the analytical chiral column. The principle of this system is described in fig. 5. Although the chiral "parking" cartridges show higher retention for the analytes, a methanol concentration of 50% and above would have partly removed them before the whole peak has left the achiral column. A make-up eluent of water/methanol (95/5) at 200 μ l/min split into the flow after the achiral column and before the "parking" cartridges via a T-piece enhances eluent polarity and thus avoids incomplete trapping of the peaks.

As shown in fig. 5(a) motorvalve no. 1 remains in position 1 throughout the achiral separation, diverting the eluent flow from the C-18 column through the cartridges to the MS-detector. Timed event signals issued by the autosampler induce the stepwise rotation of motor switch valve no. 2 which diverts the flow subsequently onto the chiral cartridges (no. 1: 7.6-9.4 min – no. 2: 9.4-11.3 min – no. 3: 11.3-12.6 min – no. 4: 12.6-14.5 min; for a mixture of 4'-, 6-, 7- and 8-OH-PPC). 16 min after injection motor switch valve no. 1 changes to position 2 and causes the solvent from the isocratic pump (water/acetonitrile/formic acid) to flow through the cartridges and elute the analytes stepwise backwards onto the chiral column, which is now connected to the MS (no. 1: 16-22 min – no. 2: 22-28 min – no. 3: 28-32 min – no. 4: 32-45 min) – see fig. 5(b). The chromatographic result of this column-coupling technique via "peak-parking" for a standard solution of racemic 4'-, 6-, 7- and 8-OH-PPC (50 ng/ml each) is illustrated in fig.6.

The elution order of PPC-metabolite enantiomers was determined by LC/LC-MS/MS-analysis of (R)- and (S)-PPC microsomal incubation extracts. In both cases the chiral chromatography produced only one peak per metabolite which corresponds to a peak of the racemate. The respective first eluting peak of 4'-, 6- and 7-OH-PPC could therefore unambiguously be identified as the (R)-enantiomer and the second as the (S)-enantiomer.

Method validation

Our intention was to determine the relative amounts of enantiomers in plasma, thus validation can be restricted to the important questions of extraction recovery, whether measured concentrations are still within a linear range, how precise and accurate enantiomer-ratios of racemic standards after repeated analysis are, how reproducible repeated analyses of the same volunteer sample with respect to enantiomer-ratios are and whether racemisation occurs during the process of sample preparation and LC-LC-MS/MS analysis.

Limit of detection and linearity: Spiked plasma samples with a nominal concentration of 0.05 ng/ml still resulted in enantiomer peak-pairs for each metabolite with a signal to noise ratio over 10:1. The effective absolute LOD for this method is therefore presumed to approach 10 pg/ml-levels. The LC-LC-MS/MS method was linear within the range of 0.5 to 200 ng/ml (racemate) corresponding to 0.25 to 100 ng/ml for each enantiomer and showed best linearity when fitted to a $1/x$ weighted linear function calculated by linear least squares regression. Calibration curve details and maximum deviations for each metabolite are given in table 1. Concentrations of 4'-, 6- and 7-OH-PPC in all volunteer plasma samples used here were determined before by a different achiral LC-MS method (unpublished data). None of the measured concentrations was beyond the range of 0.5-200 ng/ml.

Intra-/interday precision and accuracy: Standard plasma samples at three concentration levels (0.5, 5.0 and 50 ng/ml) were analysed in sets of four on three different days. Target parameter was the precision and accuracy of the respective enantiomer-ratios for each metabolite, calculated as peak area (R)-enantiomer / peak area (S)-enantiomer. Precision was expressed as the coefficient of variation (CV) for the four measurements on each separate day and for all 12 measurements together. The maximum CV-value was 7.57 % (4'-OH-PPC at 0.5 ng/ml). Accuracy was calculated as mean deviation from the nominal enantiomer-ratio (1.0 for the racemic mixtures). None of the mean deviations exceeded a value of +7.65 % (6-OH-PPC at 0.5 ng/ml). Results are detailed in table 1.

Precision for volunteer samples: As described in *Materials and Methods* replicate analyses (n=6) of two volunteer samples containing also the two new metabolites was performed in order to examine the precision for non-standard-samples. For none of the metabolites and the two volunteers the coefficient of variation of enantiomer-ratios (R/S) exceeded the maximum of 7.0 % (minimum: 2.0 %). The precision of the method applied to actual human plasma samples is thus comparable to that established for spiked standards.

Recovery: The extraction procedure, which was initially used for phenprocoumon with some minor modifications, showed good recoveries for all relevant PPC-metabolites: 4'-

OH-PPC: 97.8 % (at 50 ng/ml), 94.7 % (100 ng/ml), 98.2 % (200 ng/ml); 6-OH-PPC: 92.5 % (50 ng/ml), 91.5 % (100 ng/ml), 92.7 % (200 ng/ml); 7-OH-PPC: 102.6 % (50 ng/ml), 101.0 % (100 ng/ml), 101.9 % (200 ng/ml).

Racemisation: The question whether racemisation would occur either during sample preparation or during LC-LC-MS/MS analysis was approached by using stereochemically pure (R)- and (S)-PPC as surrogate substrate, because the metabolites themselves are not available as pure enantiomers. Plasma samples spiked with either (R)- or (S)-PPC at concentrations of 0.5, 5.0 and 50 ng/ml were extracted and analysed in the same manner as metabolite-spiked or volunteer plasma. For all of the enantiomers at all concentration levels racemisation was not observed. At least in 4'-, 6-, 7-OH-PPC and in the first new metabolite 'unknown 1' the metabolic modification is not in direct proximity of the chiral centre. Thus we can conclude that racemisation is unlikely to occur here, too.

Interferences from endogenous compounds in plasma were excluded by analysis of blank human plasma (see fig. 8).

Application to plasma samples of CYP2C9 genotyped individuals

The method was applied to plasma samples of CYP2C9 genotyped healthy volunteers as described in *Plasma sample* of the Materials and Methods section. Surprisingly, the achiral LC-MS/MS analysis of these plasma extracts revealed two unknown peaks at retention time 8.8 min and 10.6 min between 4'-OH- and 7-OH-PPC, whereas 8-OH-PPC could not be detected in any of the samples (fig 7a). These substances show ion transitions similar to 4'-OH-PPC (see fig. 9). To our knowledge no publication up to now covering identification of PPC-metabolites has reported other metabolites than 4'-, 6-, 7- and 8-OH-PPC and their conjugates (29,33,36,38-44). Chromatographic and mass spectrometric characteristics of the first unknown substance indicate a strong relationship to 4'-OH-PPC, it could thus be a new metabolite of PPC, hydroxylated in 2'- or 3'-position. The second unknown compound produces slightly different fragments, but to most of them a likely fragment structure can be assigned if a hydroxylation in the propyl-side chain is assumed. None of these structures has been reported as metabolites of PPC before. Hypothesized structures and fragments are shown in fig. 9. Di-, tri- or other multiple-hydroxylated PPC-metabolites were not searched for, because their existence has never been discussed, let alone proved in the literature covering PPC-metabolism so far.

With the absence of 8-OH-PPC and two additional metabolites in human plasma samples the column-coupling procedure had to be slightly modified: 4'-OH-PPC and the first new metabolite can be separated on the chiral column so that both can be parked together on the

same parking cartridge. 6-OH-PPC and the second new metabolite also show near co-elution on the C18-column and are stored together on the second chiral parking cartridge. They can be separated both chromatographically on the analytical chiral column and mass spectrometrically due to their different fragmentation so that their co-elution on the achiral column does not present a problem. The only remaining metabolite (7-OH-PPC) is parked on the third cartridge. Consequently the fourth cartridge needed for a mixture containing all four known metabolites is not used any more. Valve switch times were adjusted as follows: achiral separation: no. 1: 7.2-9.1 min; no. 2: 9.1-11.4 min; no. 3: 11.4-14 min; chiral separation: no. 1: 16-22 min; no. 2: 22-32 min; no. 3: 32-45 min.

During our experiments the method worked well without inexplicable faults, and after the first two injections the analysis was run automatically and unattended. We found that after the first two achiral runs of samples from one individual (where retention times in the achiral analysis were monitored and switch times of the motor valves adjusted if necessary) retention times stayed constant. Only if the analysis of samples from a different individual is started, retention times need to be checked during the first two achiral separations again, for a drift of up to 0.2 min can occur (probably due to matrix components). But even if peaks are not "excised" exactly during achiral analysis, an overlap of peaks or even mix-up of peaks in the chiral separation would not occur due to more than sufficient distances between peaks of different metabolites in the chiral chromatogram. As to the ruggedness of LC columns: We have used both columns for several hundred injections and both showed no discernible effects of wear. This can in particular be said for the chiral column, whereas columns filled with different chiral materials (as e.g. proteins or sugars) are often reported to exhibit a relatively short half-life.

Enantiomeric ratio of phenprocoumon-metabolites in human plasma

Analysis of the chromatograms of PPC-metabolites in volunteer plasma samples by achiral-chiral coupling showed that unlike PPC the metabolites appear to differ markedly in their enantiomeric ratios. Results are given in table 3. The question whether these enantiomer-ratio differences between individuals of different CYP2C9 genotypes are statistically significant still has to be checked by increasing the number of individuals investigated and will be addressed elsewhere. For all three known metabolites (4'-, 6-, 7-OH-PPC) that occur in human plasma in detectable amounts baseline separation of their enantiomers was achieved. For the two unknown substances however only a very small second peak – presumably the respective enantiomer - adjacent to the main peak could be seen in routinely processed plasma samples (fig. 7b). The fact that changing the eluent for the chiral

separation from 50% water to 65% water significantly increased their retention times but did not cause the two main unknown main peaks to split up in " doublets " suggests that these substances are stereochemically pure. Under the same conditions chromatographic resolution of the enantiomers is also significantly enhanced for all other metabolites. The LC/LC-MS/MS analysis of microsomal incubation samples of pure (R)- and (S)-PPC, respectively, confirmed these findings. Analysis of the (R)-PPC incubation produced only one peak each for the putative new metabolites at the retention time of the respective main peak (R-unknown 1+2 in fig. 7b), whereas in (S)-PPC-incubation samples only the minor peaks (S-unknown 1+2 in fig. 7b) of the presumed respective enantiomers appeared.

DISCUSSION

Column switching techniques in liquid chromatography have been beneficial for many purposes and extensively been used for online-sample purification/concentration, protein and peptide analysis and for stereoisomeric separations as in this case. Different approaches for achiral-chiral coupling have been illustrated to work for chiral analysis of drugs and metabolites: Direct in-line coupling of two columns (24), coupling via a switching valve (22) or manual sampling of fractions and sequential chiral analysis (45). However, most of these applications have systematic drawbacks, which make them useless for the complex analysis of a mixture of very similar compounds in low concentrations like the PPC-metabolites in plasma. Even techniques which – similar to our method – submit fractions obtained by achiral LC to subsequent chiral separation (46,47) are not applicable for this problem. Either too large a proportion of the analyte is lost during transfer, which results in inadequate sensitivity, or the system is not compatible with MS-detection. However, with concentrations approaching the low ng/ml-range and the need to obtain structural information of metabolites, mass spectrometric detection becomes a crucial part of the analytical procedure.

The combined achiral-peak-parking-chiral methodology for the simultaneous chiral investigation of PPC-metabolites from biological material offers several features which can be useful for the analogous analysis of other compound classes: Several compounds can be analysed in one run; baseline achiral separation provided, the fraction-parking step is independent of the first eluent due to the adjustable make-up flow; chiral analysis on Chira Grom columns can be performed with many different eluents, in normal or reversed-phase mode. Limitations are the relatively complex instrumentation, requiring three HPLC-pumps and four high-pressure switching valves.

The method was validated with respect to the critical parameters with satisfying results and was successfully applied to the chiral analysis of PPC-metabolites and revealed that, independent of the CYP2C9 genotype, the enantiomeric ratios differ from 1:1. This is in contrast to the essentially non-stereoselective plasma AUC data of the parent compound that we have previously determined in the same individuals (31). Whether this is caused by enantioselective hydroxylation or conjugation is not known yet – studies to determine the contribution of each to the stereoselective metabolism of PPC are presently not planned. Two potential new metabolites were found and characterised as far as possible by LC-MS. According to their fragmentation pattern in the LC-MS/MS experiment, we hypothesize a hydroxylation in 2'- or 3'-position for the first eluting new metabolite and a side-chain-hydroxylation for the second one. Further spectroscopic investigations still need to be performed to finally confirm their structure, either by preparatively isolating the substances or by LC-NMR-coupling (further work is in progress).

Although the ratio of (R)- and (S)-PPC in plasma varies only from ca. 0.8 to 1.0 over time, a significant prevalence of one enantiomer for each metabolite can be observed. In the case of the two putative new metabolites one stereoisomer accounts for almost the total quantity found in plasma. The pharmacokinetic data, which will be discussed in more detail in a future report, show that pharmacokinetics and metabolism of PPC – despite its long history as anticoagulant – still need to be examined more closely.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the support of the German Federal Ministry of Research and Education (grant 01 EC 0001) and the AKF program of the Medical Faculty, University of Tübingen (grant AKF 72-0-0).

Dr. M. Ufer is a recipient of a research scholarship provided by the Federal Ministry of Education and Research, Berlin, Germany (FKZ 01 EC 0001) and the German Research Community, Bonn, Germany (Uf 6/1-1).

We thank Prof. W.F. Trager, University of Washington, Seattle for the kind provision of racemic 4'-, 6-, 7- and 8-hydroxyphenprocoumon.

We are grateful to Dr. U. Delabar for her analytical advice and Mrs. B. Proksch from the Department of Clinical Pharmacology, University Hospital Tübingen, for technical assistance.

References

1. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res* 2003;2:43-50.
2. Davis MT, Beierle J, Bures ET, McGinley MD, Mort J, Robinson JH et al. Automated LC-LC-MS-MS platform using binary ion-exchange and gradient reversed-phase chromatography for improved proteomic analyses. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;752:281-91.
3. Opiteck GJ, Lewis KC, Jorgenson JW, Anderegg RJ. Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. *Anal Chem* 1997;69:1518-24.
4. Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:383-90.
5. Takino M, Daishima S, Yamaguchi K, Nakahara T. Quantitative liquid chromatography-mass spectrometry determination of catechins in human plasma by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography. *Analyst* 2003;128:46-50.
6. Lim HK, Chan KW, Sisenwine S, Scatina JA. Simultaneous screen for microsomal stability and metabolite profile by direct injection turbulent-laminar flow LC-LC and automated tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2001;73:2140-6.
7. Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:41-53.
8. Cheng C, Wu SC. Analysis of the enzymatic racemization of D-aspartic acid to L-aspartic acid by the on-line coupling of a solid-phase extraction column and a ligand-exchange high-performance liquid chromatography column. *J Chromatogr A* 2000;896:299-310.
9. Calderoli S, Colombo E, Frigerio E, James CA, Sibum M. LC-MS-MS determination of brostallicin in human plasma following automated on-line SPE. *J Pharm Biomed Anal* 2003;32:601-7.

10. Yritia M, Parra P, Fernandez JM, Barbanoj JM. Piroxicam quantitation in human plasma by high-performance liquid chromatography with on- and off-line solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1999;846:199-205.
11. Raezke KP. Automated on-line solid-phase extraction. *LaborPraxis* 2000;24:52-4.
12. Koal T, Asperger A, Efer J, Engewald W. Simultaneous determination of a wide spectrum of pesticides in water by means of fast on-line SPE-HPLC-MS-MS - a novel approach. *Chromatographia* 2003;57:93-101.
13. Sheldon EM. Development of a LC-LC-MS complete heart-cut approach for the characterization of pharmaceutical compounds using standard instrumentation. *J Pharm Biomed Anal* 2003;31:1153-66.
14. Sancho JV, Pozo OJ, Lopez FJ, Hernandez F. Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:639-45.
15. Poletini A, Marrubini BG, Montagna M. Development of a coupled-column liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the direct determination of betamethasone in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;713:339-52.
16. Hogendoorn EA, van Zoonen P, Poletini A, Marrubini BG, Montagna M. The potential of restricted access media columns as applied in coupled-column LC/LC-TSP/MS/MS for the high-speed determination of target compounds in serum. Application to the direct trace analysis of salbutamol and clenbuterol. *Anal Chem* 1998;70:1362-8.
17. Tan SC, Jackson SH, Swift CG, Hutt AJ. Stereospecific analysis of the major metabolites of ibuprofen in urine by sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;701:53-63.
18. Walters RR, Hsu CY. Chiral assay methods for liofibrol and metabolites in plasma and the observation of unidirectional chiral inversion following administration of the enantiomers to dogs. *Chirality* 1994;6:105-15.
19. Brandsteterova E, Wainer IW. Achiral and chiral high-performance liquid chromatography of verapamil and its metabolites in serum samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;732:395-404.
20. Kim KH, Kim HJ, Kim JH, Shin SD. Determination of terbutaline enantiomers in human urine by coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;751:69-77.

21. Cassiano NM, Cass QB, Degani AL, Wainer IW. Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography. *Chirality* 2002;14:731-5.
22. Zagrobelny J, Matuszewski BK, Kline WF, Vincent SH. Separation of the four stereoisomers of a potent inhibitor (L-694,458) of human leukocyte elastase and its determination in human plasma using achiral/chiral chromatography with column switching. *J Pharm Biomed Anal* 1998;17:1057-64.
23. Ferretti R, Gallinella B, La Torre F, Zanitti L. Direct resolution of a new antifungal agent, voriconazole (UK-109,496) and its potential impurities, by use of coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 1998;47:649-54.
24. Diaz-Perez MJ, Chen JC, Aubry AF, Wainer IW. The direct determination of the enantiomers of ketorolac and parahydroxyketorolac in plasma and urine using enantioselective liquid chromatography on a human serum albumin-based chiral stationary phase. *Chirality* 1994;6:283-5.
25. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 1998;114:445-69.
26. Levine MN, Raskob G, Landefeld S, Kearon C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest* 2001;119:108-21.
27. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
28. Jaehnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Groth U, Martini A. The enantiomers of phenprocoumon: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Clin Pharmacol Ther* 1976;20:342-9.
29. He M, Korzekwa KR, Jones JP, Rettie AE, Trager WF. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9. *Arch Biochem Biophys* 1999;372:16-28.
30. Ufer M, et al. Identification of cytochrome P450 2C9 and 3A4 as major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;in press.

31. Kirchheiner J, Ufer M, Walter EC, Kammerer B, Kahlich R, Meisel C et al. Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers. *pharmacogenetics* 2004;14:19-26.
32. Kammerer B, Kahlich R, Ufer M, Laufer S, Gleiter CH. Determination of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma by enantioselective liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:458-64.
33. Edelbroek P, Van Kempen MJ, Hessing TJ, De Wolff FA. Analysis of phenprocoumon and its hydroxylated and conjugated metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr* 1990;347-58.
34. De Vries JX, Harenberg J, Walter E, Zimmermann R, Simon M. Determination of the anticoagulant phenprocoumon in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1982;231:83-92.
35. De Vries JX, Schmitz-Kummer E. Determination of the coumarin anticoagulant phenprocoumon and metabolites in human plasma, urine and breast milk by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 1994;655:63-71.
36. De Vries JX, Simon M, Zimmermann R, Harenberg J. Identification of phenprocoumon metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1985;338:325-34.
37. McAleer SD, Chrystyn H, Foondun AS. Measurement of the (R)- and (S)-isomers of warfarin in patients undergoing anticoagulant therapy. *Chirality* 1992;4:488-93.
38. De Vries JX, Zimmermann R, Harenberg J. Phenprocoumon Metabolites in Human Plasma; Characterization by HPLC and GC-MS. *Eur J Clin Pharmacol* 1986;29:591-4.
39. De Vries JX, Völker U. Determination of the plasma protein binding of the coumarin anticoagulants phenprocoumon and its metabolites, warfarin and acenocoumarol, by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990;529:479-85.
40. De Vries JX, Kymber KA. Thermospray and particle beam liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of coumarin anticoagulants. *J Chromatogr* 1991;562:31-8.
41. De Vries JX, Schmitz-Kummer E. Direct column liquid chromatographic enantiomer separation of the coumarin anticoagulants phenprocoumon, warfarin, acenocoumarol and

- metabolites on an α 1-acid glycoprotein chiral stationary phase. *J Chromatogr* 1993;644:315-20.
42. Haddock RE, Trager WF. Biotransformation of Phenprocoumon in the Rat. *J Med Chem* 1975;18:519-23.
43. Heimark LD, Trager WF. A stable isotope assay for phenprocoumon and its metabolites. *Biomed Mass Spectrom* 1985;12:67-71.
44. Toon S, Heimark LD, Trager WF, O'Reilly RA. Metabolic Fate of Phenprocoumon in Humans. *J Pharma Sci* 1985;74:1037-40.
45. Iredale J, Wainer IW. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992;573:253-8.
46. Clark BJ, Hamdi A, Berrisford RG, Sabanathan S, Mearns AJ. Reversed-phase and chiral high-performance liquid chromatographic assay of bupivacaine and its enantiomers in clinical samples after continuous extraplural infusion. *J Chromatogr* 1991;553:383-90.
47. Gimenez F, Farinotti R, Thuillier A, Hazebroucq G, Wainer IW. Determination of the enantiomers of mefloquine in plasma and whole blood using a coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatographic system. *J Chromatogr* 1990;529:339-46.

Tables

table 1 validation details: linearity ($y = a + b \cdot x$); range: 0.5 – 200 ng/ml (racemate); max. deviation is calculated as $100\% \times (\text{measured conc.} - \text{nominal conc.}) / \text{nominal conc.}$

	a (axis intercept)	b (slope)	R ²	max. deviation
(R)-4'-OH-PPC	32677	172460	0.9981	-19.8 % (0.5 ng/ml)
(S)-4'-OH-PPC	32444	175061	0.9979	- 19.0 % (0.5 ng/ml)
(R)-6-OH-PPC	20794	81081	0.9968	-18.7 % (0.5 ng/ml)
(S)-6-OH-PPC	22651	81916	0.9969	-18.8 % (0.5 ng/ml)
(R)-7-OH-PPC	14391	114568	0.9989	-15.9 % (0.5 ng/ml)
(S)-7-OH-PPC	15113	114364	0.9987	-16.9 % (0.5 ng/ml)

table 2 intra-/interday-precision and accuracy of enantiomer-ratios of plasma standards (CV: coefficient of variation)

4'-OH-PPC	intraday-variability (n=4 per level)			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
0.5 ng/ml				
mean deviation [%]	3.12	0.86	1.23	1.74
CV [%]	2.10	7.57	3.34	4.61
5.0 ng/ml				
mean deviation [%]	5.21	-2.05	-1.68	2.98
CV [%]	5.76	2.40	1.65	4.77
50 ng/ml				
mean deviation [%]	-0.45	-2.34	1.63	1.48
CV [%]	4.96	4.56	6.91	5.29
6-OH-PPC	intraday-variability (n=4 per level)			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
0.5 ng/ml				
mean deviation [%]	2.02	7.65	5.14	4.94
CV [%]	4.61	1.00	3.75	3.84
5.0 ng/ml				
mean deviation [%]	1.17	-0.52	-0.30	0.66
CV [%]	1.13	2.93	2.04	2.10
50 ng/ml				
mean deviation [%]	-0.05	-0.60	-0.10	0.25

CV [%]	0.59	1.41	1.39	1.05
7-OH-PPC	intraday-variability (n=4 per level)			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
0.5 ng/ml				
mean deviation [%]	-3.21	-4.56	-1.74	3.17
CV [%]	2.57	5.78	4.34	4.21
5.0 ng/ml				
mean deviation [%]	0.74	-1.86	0.88	1.16
CV [%]	2.05	3.51	0.87	2.44
50 ng/ml				
mean deviation [%]	0.44	-0.23	0.24	0.30
CV [%]	0.48	0.45	0.47	0.52

table 3 (R)/(S)-peak area ratio of PPC-metabolite enantiomers in plasma (at 144 hours after administration of 12 mg PPC)

	4'-OH-PH (R / S)	6-OH-PH (R / S)	7-OH-PH (R / S)	Unknown 1 (R / S)	Unknown 2 (R / S)
1*/1* (extensive metaboliser)	1.50 (60 / 40)	5.25 (84 / 16)	2.33 (70 / 30)	24.0 (96 / 4)	49.0 (98 / 2)
2*/2* (intermediate m.)	1.63 (62 / 38)	5.67 (85 / 15)	2.45 (71 / 29)	19.0 (95 / 5)	15.67 (94 / 6)
3*/3* (poor m.)	2.13 (68 / 32)	7.33 (88 / 12)	4.88 (83 / 17)	32.33 (97 / 3)	19.0 (95 / 5)

Figures

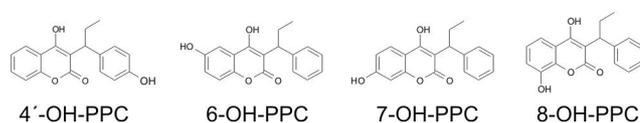


Figure 1. Structures of hydroxylated PPC-metabolites

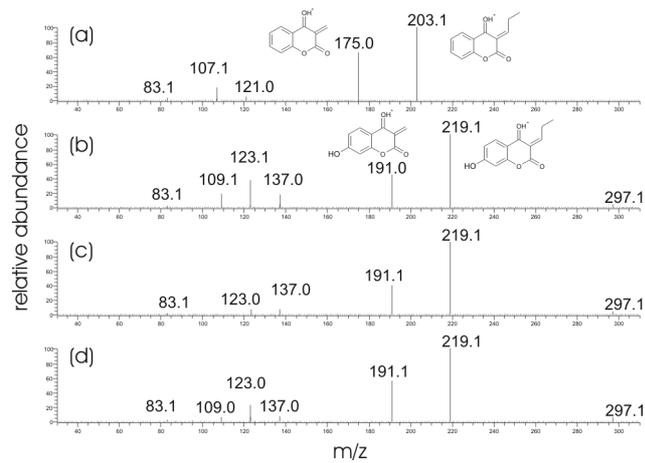


Figure 2. CID-MS/MS spectra of PPC-metabolites at collision energy 25 V: (a) 4'-OH-PPC, (b) 6-OH-PPC, (c) 7-OH-PPC, (d) 8-OH-PPC

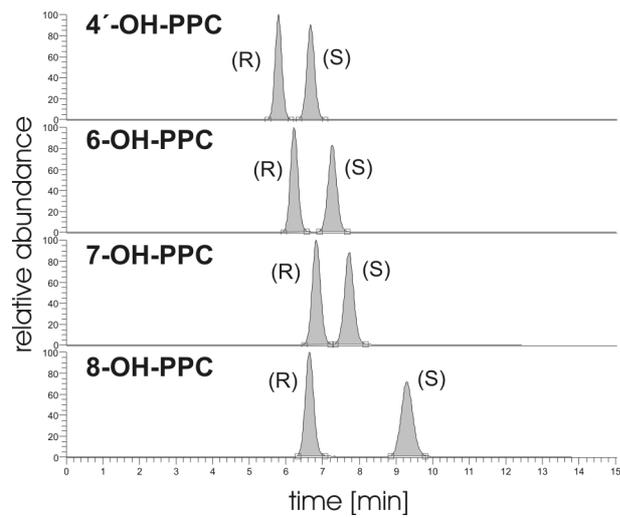


Figure 3. Chiral separation of PPC-metabolites (standard solutions) without column-coupling

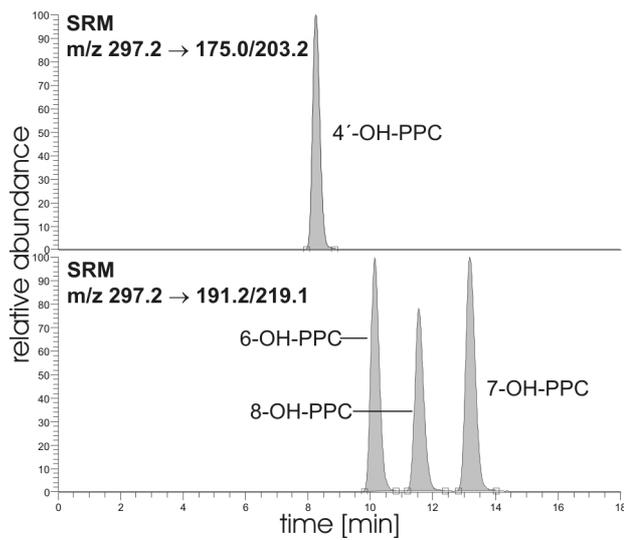


Figure 4. Achiral separation of PPC-metabolites (standard solution)

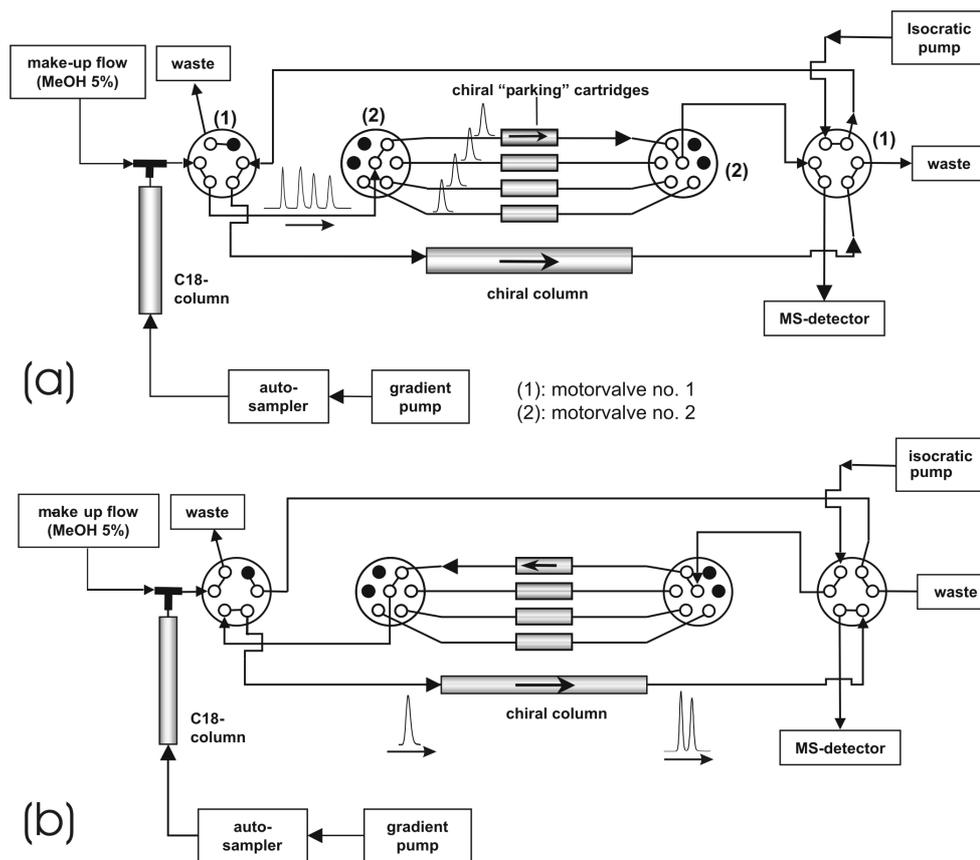


Figure 5. (a) Step 1 of LC-LC-coupling: Achiral separation and peak "parking" on chiral cartridges; (b) Step 2 of LC.LC-coupling: Backelution from parking cartridges and chiral separation

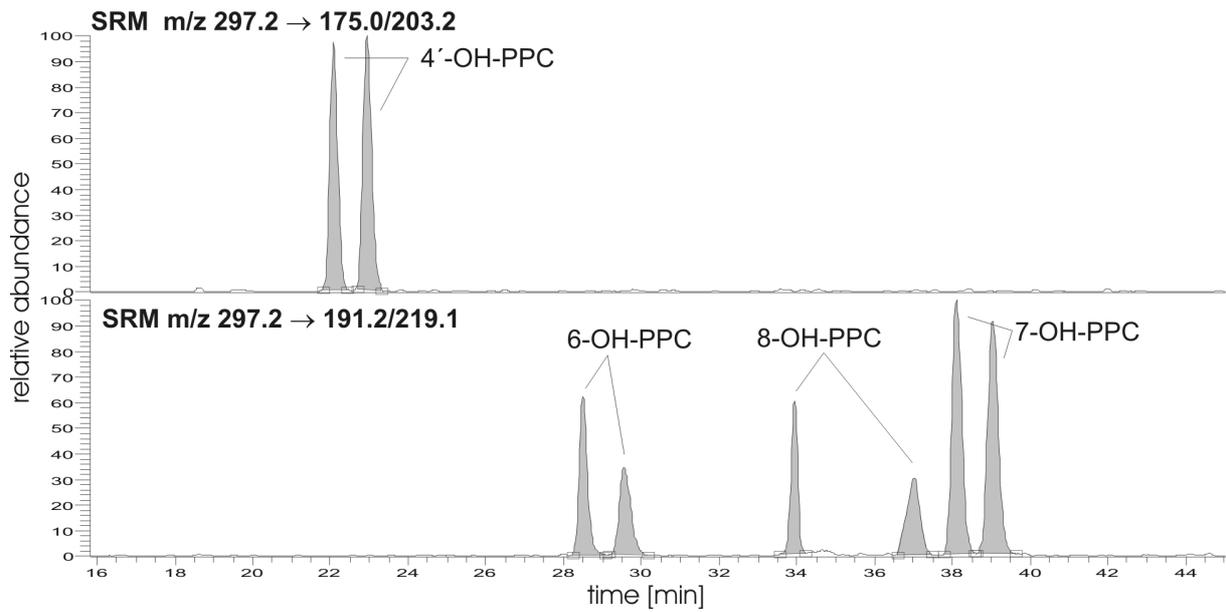


Figure 6. SRM-chromatogram of column-coupling for a standard mixture of PPC-metabolites

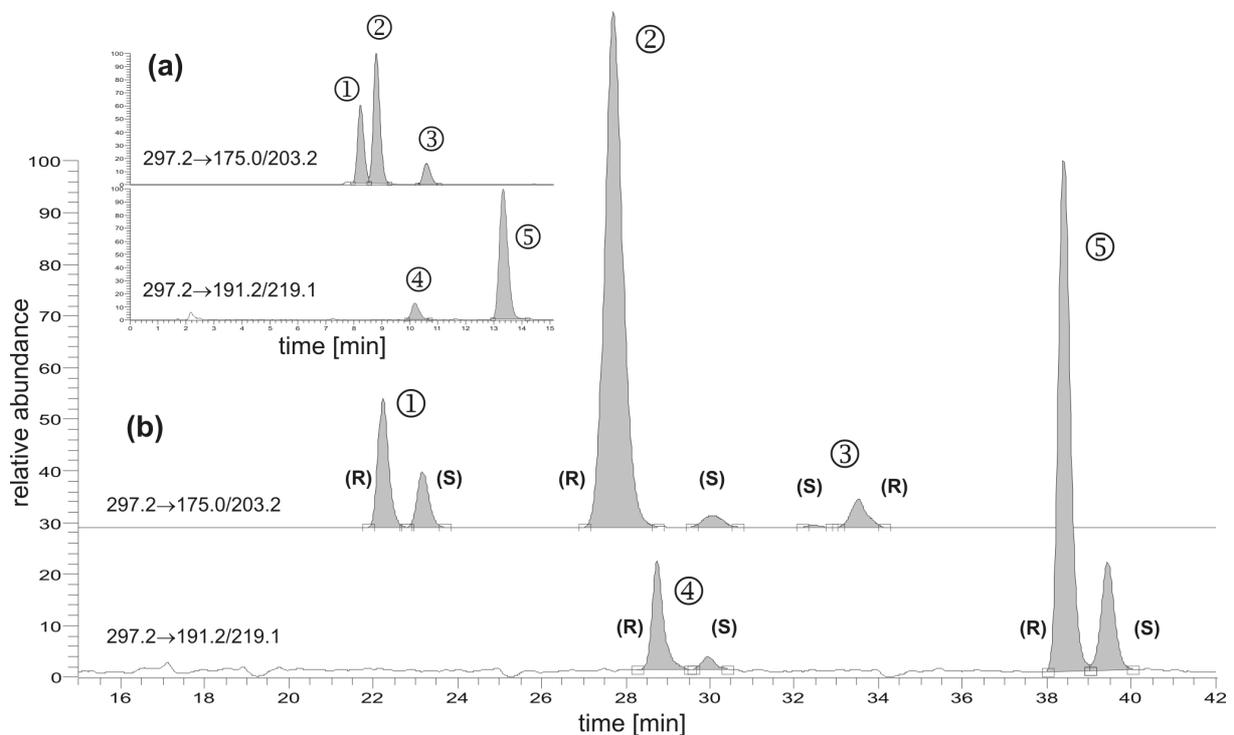


Figure 7. (a) achiral separation: SRM-chromatogram of a plasma sample (poor metaboliser *3/*3) with three known and two unknown peaks; (b) LC-LC-chromatogram of the same sample; (1) 4'-OH-PPC; (2) unknown 1; (3) unknown 2; (4) 6-OH-PPC; (5) 7-OH-PPC

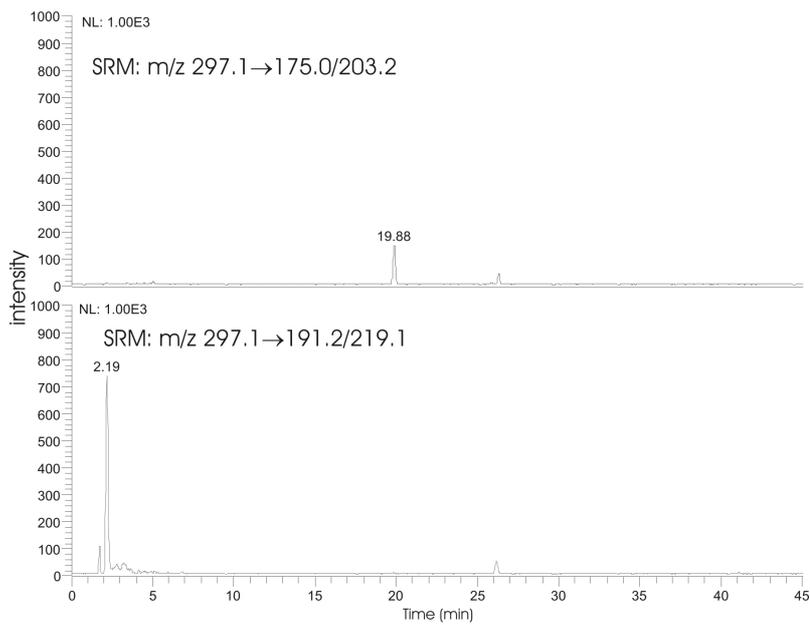


Figure 8. LC-LC-MS/MS-analysis of a blank plasma sample

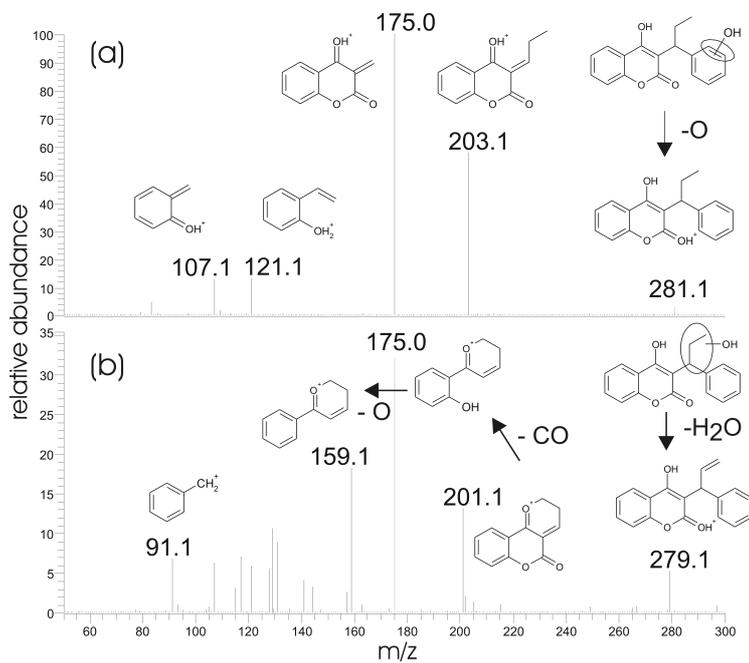


Figure 9. CID-MS/MS spectra of unknown peaks with proposed structures and fragments: (a) spectrum of first unknown peak (no. 2, fig. 7) and (b) of second unknown peak (no. 3, fig. 7)

4.3 Quantitative determination of Piritramide in human plasma and urine by off- and on-line solid phase extraction LC-MS/MS

submitted to Therapeutic Drug Monitoring (07.02.2005)

ABSTRACT

Background: Piritramide is a synthetic μ -opioid receptor agonist which is widely used for postoperative analgesia and analgo-sedation. In the course of a clinical study concerning the pharmacokinetics of Piritramide in children, a new analytical approach for quantification of Piritramide in blood plasma and urine was elaborated.

Methods: A method for the LC-MS/MS quantification of Piritramide in plasma after conventional off-line solid phase extraction and in urine by on-line-SPE-LC-MS/MS in positive electrospray mode was developed and validated. Applicability of the on-line approach for plasma samples was also tested. Deuterated Piritramide served as internal standard. For the off-line-SPE plasma method mixed-cation-exchange SPE-cartridges and a 150x2 mm C18-column with isocratic elution were used. For the on-line-SPE method a Waters Oasis HLB extraction column and the same C18 analytical column in a column-switching set-up with gradient elution were utilised.

Results: All assays were linear within a range of 0.5 – 100 ng/ml with an LOD of 0.05 ng/ml. The intra- and interday coefficients of variation ranged from 1.3 to 6.1 %, respectively for plasma and 0.5 to 6.4 %, respectively for urine. Extraction recovery for the off-line plasma assay was between 90.7 and 100.0 %. Influence of matrix effects, freeze-thaw- and long-term-stability were validated for both approaches, influence of urine pH additionally for quantification in urine.

Conclusion: It could be shown that the fully validated tandem MS assay has the required sensitivity and calibration range for measuring therapeutic Piritramide plasma- and urine-levels as necessary for pharmacokinetic studies.

KEYWORDS: Piritramide, quantification, LC-MS/MS, solid-phase-extraction, on-line purification, off-line-purification

INTRODUCTION

Piritramide, introduced 1960 by Janssen-Pharmaceutica as Dipidolor[®], is a synthetic narcotic analgesic with full μ -receptor agonist activity (1). It is used in parts of Europe (particularly Germany, Belgium, the Netherlands and Eastern Europe) as the analgesic of choice for the management of postoperative pain (2). As isonipecotic acid it belongs to the structurally atypical opioids along with Meperidine and Phenoperidine. Despite its long use little is known about its pharmacokinetics: Kietzmann et al. (3) have published data from a study in healthy male volunteers, Bouillon et al. (4) data from adult surgical patients and Wiesner et al. (5) have investigated the protein binding of Piritramide. This may in part be caused by a former lack of sensitive analytical methods, most of which were only published in the early 90's. The nature of Piritramide metabolites has not been disclosed so far.

Only few assays for Piritramide in plasma or serum applicable for pharmacokinetic or toxicological studies have been developed up to date: The only gas-chromatography method so far applies nitrogen-phosphorus sensitive detection with a linear range of 3.75-2250 ng/ml and a LOD of 1-2 ng/ml (6). The two assays based on HPLC-UV, also published in 1991, feature a range of 3.75-3000 ng/ml (LOD 3 ng/ml) (7) and 0.5-2.5 μ g/ml (8), the latter of which is therefore not sensitive enough for PK-measurements. The most recently developed method – like our assay - also utilizes LC-MS/MS coupling, with an ion-trap instrument as mass sensitive detector, though (linear range: 1-80 ng/ml, LOD 0.3 ng/ml) (9). All of these assays were performed with relatively time-consuming liquid-liquid-extraction. Validated procedures for the quantitative determination of Piritramide in urine are so far not reported at all.

We describe two fully validated fast and sensitive methods for the quantification of Piritramide by reversed-phase liquid chromatography coupled to triple-quadrupole tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with off-line solid phase extraction for plasma as matrix and on-line-SPE-LC-MS/MS for urine samples with a simple centrifugation step prior to injection. Piritramide is reported to require a mean steady state of 12.1 ng/ml (2.9 to 29.8 ng/ml) for a 50 %-effect of maximum analgesia (10), the chosen linear range of 0.5 to 100 ng/ml is therefore expected to easily cover both therapeutic, toxic and low concentrations after several half-lives as necessary in pharmacokinetic studies.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Piritramide was obtained from Janssen-Cilag (Neuss, Germany), deuterated Piritramide (structures see Figure 1) was obtained by Biotrend (Cologne, Germany). Acetonitrile and methanol was of HPLC gradient grade, all other chemicals (formic acid, ortho-phosphoric acid, hydrochloric acid, triethylamine) were of analytical grade (all from VWR; Darmstadt, Germany). For all experiments double-distilled water was used. Oasis MCX single-use cartridges (30 mg, 1ccm) for off-line extraction and Oasis HLB on-line columns (2.1mm x 20 mm, 5 μ m) for on-line extraction were supplied by Waters (Eschborn, Germany).

Preparation of standard and quality control samples

Plasma samples: Stock solutions of Piritramide were obtained by dissolving 5 mg (exactly weighed on a Sartorius Genius ME235S (Goettingen, Germany) analytical balance) in 50 ml methanol. From this stock solution dilutions of 10 μ g/ml, 1.0 μ g/ml and 100 ng/ml in methanol were prepared. The stock solutions and dilutions were kept refrigerated (-20°C) and discarded 1 month after preparation. These dilutions were used to spike 10 ml blank human plasma (Blood Donor Centre, University Hospital Tuebingen) per level to obtain the following concentrations: 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50 and 100 ng/ml. A maximum of 200 μ l Piritramide-dilution was added to 10 ml plasma. Quality control samples with 1.5, 40 and 80 ng/ml were prepared accordingly with a separate stock solution and dilutions thereof. Urine samples: Urine standard and quality control samples were obtained following the procedure described above but with pooled urine from two healthy male adults as sample matrix. Spiked plasma and urine samples were divided into aliquots of 0.5 ml and stored at -20°C in darkness.

Internal standard: A D4-Piritramid stock solution of 100 μ g/ml in methanol was diluted to give a solution of 50 ng/ml in water + 0.1% formic acid for plasma analysis and of 20 ng/ml in acetonitrile for urine analysis.

Extraction procedure and chromatography for off-line analysis

Frozen samples were thawed at room temperature and vortexed for 10 s. After addition of 50 μ l H₃PO₄ (85%) and 50 μ l internal standard (D4-Piritramide, 50 ng/ml) to sample aliquots of 0.5 ml, the mixture was again vortex-mixed and centrifuged at 19.800 g and 18°C for 10 min (Eppendorf centrifuge 5417R; Hamburg, Germany). Waters Oasis MCX (30 mg, 1ccm) cartridges on a 20-fold vacuum station were conditioned with 1 ml methanol and equilibrated with 1 ml water. 0.5 ml sample supernatant was transferred onto the extraction columns and drawn through at ca. 0.5 ml/min. The columns were washed once

with 1 ml 0.1 N HCl/methanol (95/5) and twice with 1 ml methanol before they were dried under full vacuum for 5 min and finally eluted with 1 ml methanol/triethylamine (97.5/2.5). The eluent was evaporated under vacuum in a Speed Vac sample concentrator (Thermo Life Sciences; Holbrook, USA) at 35°C for 2 h to obtain residues that were reconstituted in 0.5 ml mobile phase (water/acetonitrile/formic acid – 70/30/0.1).

20 µl were injected into the HPLC-system consisting of a Surveyor MS-pump with eluent degasser and Surveyor Autosampler with column-oven set at 30°C (ThermoFinnigan; San Jose, USA) and analysed on a Grom Sil 120 ODS-3 CP (150 x 2 mm, 5 µm) octadecyl silane column equipped with a Grom Sapphir C18 precolumn (10 x 1 mm, 5 µm) (both Grom Chromatography; Rottenburg-Hailfingen, Germany). The HPLC pump was operated isocratically at 200 µl/min with an eluent of water/acetonitrile/formic acid (70/30/0.1). In between plasma samples 100 µl pure solvent (methanol/acetonitrile/water/formic acid – 40/40/20/0.1) were injected and eluted for 2 min under the conditions above to minimise analyte carry-over. MS-detection was as described below.

Extraction procedure and chromatography for on-line analysis

For on-line-SPE-LC-MS/MS a fast method was developed following a generic approach as described e.g. by Souverain et al. (11). Thawed sample aliquots of 0.5 ml were merely mixed with 0.5 ml internal standard (D4-Piritramide 20 ng/ml in acetonitrile) and centrifuged at 19.800 g for 10 min to remove precipitations. 100 µl of supernatant was injected for subsequent online-solid-phase-extraction LC-MS/MS analysis. In the first step – the sample purification step – the valve stays in position 1 (Figure 2a) for 1 min, directing the wash solvent (water/acetonitrile/formic acid - 98/2/0.1 at 2.5 ml/min) delivered by a Spectra Series P100 isocratic pump (Thermo Finnigan) through the sample loop onto the Oasis HLB extraction column. During this time the analyte of interest is retained on the extraction column, while endogenous components are removed to waste. After 1 min the valve switches to position 2, whereupon Piritramide is back-flushed onto the analytical column for final separation and quantification (Figure 2b). The following gradient is applied for the analytical column: 0 min: 80 % solvent A (water + 0.1% formic acid) – 20 % solvent B (acetonitrile + 0.1 % formic acid), 200 µl/min; 1 min: 80 % A – 20 % B (200 µl/min); 6 min: 20 % A – 80 % B (200 µl/min); 6.1-7 min: 100 % B (500 µl/min). Like in the off-line analysis after each sample pure solvent is injected to reduce carry-over effects with the following settings: valve: 0-0.5 min: position 2, after 0.5 min back to position 1; wash solvent: 2.5 ml/min constant; gradient pump: 0 min: 100 % B (500 µl/min), 0.5 min: 100 % B (500 µl/min), 0.55-1.5 min: 80 % A – 20 % B (200 µl/min).

MS detector settings

MS-detection for both procedures, off- and on-line extraction, was identical. A Thermo Finnigan TSQ Quantum (Thermo Finnigan; San Jose, USA) triple-stage-quadrupole mass spectrometer was used for analyte detection. Piritramide is a relatively basic compound, consequently electrospray ionisation in positive mode was chosen. The electrospray voltage was set at 3800 V, with the sprayer needle in 90°-position towards the orifice, settings for sheath and auxiliary gas were 35 and 15 (arbitrary) units, respectively. The ion transfer capillary was kept constant at a temperature of 320°C, as was the collision gas (argon) at a pressure of 1.0 mTorr. The electrospray interface and mass spectrometer parameters were optimized to obtain maximum sensitivity at 0.7 unit resolution. The selected reaction monitoring (SRM) experiment was conducted by monitoring the precursor ion to product ion transitions from m/z 431.3 to 346.2 (at 26 V) and 98.1 (at 38 V) for Piritramide and m/z 435.3 to 350.2 (at 26 V) and 98.1 (at 38 V) for the internal standard D4-Piritramide with 0.2 s dwell time.

Method validation

Method validation was performed for both approaches (on- and off-line method) and both matrices (plasma and urine) as far as reasonable with respect to the aspects limit of detection, lower limit of quantification and linearity by analysis of three sets of calibration samples from 0.005 to 100 ng/ml, selectivity, intra- and interday precision and accuracy, freeze-thaw and long-term stability. Extraction recovery and influences of sample matrix could only be investigated in detail for the off-line methodology, for these two procedures require the separation of sample extraction and subsequent LC-MS/MS analysis which is not feasible for online-SPE-LC-MS techniques. One way to circumvent this problem is the exchange of the MS-detector against a UV-detector for recovery experiments in order to directly compare absolute peak areas without the unknown influence of matrix effects ([12](#)), provided that a clean peak can be detected in the UV-trace. Another possible workaround is the use of radiolabeled analytes. Absolute radioactivity after on-line-SPE can thus be compared to absolute radioactivity in the spiked samples before analysis ([13](#)). Both approaches were not applicable in our case due to UV-interferences at the retention time of Piritramide and due to the lack of radiolabeled compound.

RESULTS

Method development

Off-line procedure: Off-line solid phase extraction with subsequent LC-UV or LC-MS coupling for biological samples is a meanwhile well established sample pretreatment technique. Compared to liquid-liquid extraction it has the advantage that it is more time-efficient and easier to handle. For the determination of Piritramide in plasma, which we developed first, this approach was therefore chosen. Several extraction materials were tested, including C18-, copolymer-, mixed-anion-exchange- and mixed-cation-exchange sorbents. Piritramide has two basic nitrogen atoms ($pK_{a1}=5.4$, $pK_{a2}=7.3$ (14)), which makes it particularly suitable for extraction with the latter material. By using Oasis MCX (mixed-cation-exchange) cartridges, positively charged and slightly unpolar substances can be extracted more or less selectively. Triethylamine as additive to the eluent according to a Water's application note (15) facilitates the elution of tertiary-amine analytes, while primary and secondary amines are retained on the column to a greater extent.

On-line procedure: On principle for urine the same off-line methodology could be used. In favour of a less time and material-consuming method we chose to test the on-line-SPE approach. Following a general two-column methodology we checked three different extraction columns, which were available in our laboratory (Merck Chromolith Flash RP-18e, 25 x 4.6mm; Cohesive Cyclone HTLC column, 50 x 1 mm; Waters Oasis HLB, 20 x 2.1 mm). Oasis HLB as copolymer material produced the best results during this initial appraisal and was therefore used for the following method validation. Protein precipitation with acetonitrile as simple step prior to injection was applied to prolong column life-time and to ensure quantitative suspension of protein binding. To demonstrate the applicability also for plasma samples in principle, method linearity and selectivity was tested in the same manner as for urine samples.

In contrast to the off-line-LC-MS/MS method simple isocratic elution on the analytical column after back-flushing of analytes in urine was not suitable, for this leads to significant peak broadening and simultaneous elution with the main part of concomitant substances. Urine contains Piritramide-metabolites in detectable amounts which due to in-source-fragmentation produce interfering peaks even in the SRM traces of Piritramide and the internal standard. A maximum of one additional peak in the trace on Piritramide and two additional peaks in the trace of D4-Piritramide were observed. These metabolites presumably are mono-, dihydroxy- and dehydro-Piritramide (second isotope = 430!). The problem was solved by applying a gradient which delivers sufficient resolution between Piritramide and interfering peaks. In patient plasma samples only one additional peak in the trace of D4-Piritramide occurred and none in that of Piritramide itself. All peaks were baseline-separated. In the chromatograms of off-line SPE pretreated plasma samples the

second peak was not detected, which is easily explicable, because it elutes just after the end of the analysis (at ca. 4.3 min) and before the solvent for the wash run is injected.

MS-detection: Collision-induced dissociation (CID) mass spectra for Piritamide and D4-Piritamide are shown in Figure 3. These data show the protonated molecules at m/z 431 and m/z 435, respectively, as well as their fragmentation behaviour with proposed fragment structures. The two most abundant ion transitions m/z 431 \rightarrow 346 + 98 and 435 \rightarrow 350 + 98 were used for quantification.

Selectivity, limit of detection, linearity

Off-line-method, plasma: The selectivity of the method was checked by extracting and analysing six different blank plasma samples and screening for any interfering peaks. In none of the samples interferences were detected at the retention time of Piritamide. An exemplar blank chromatogram is shown in Figure 4. The limit of detection was defined as the lowest concentration producing a peak signal with a minimum signal to noise ratio of 3:1. This is the case at 0.05 ng/ml (S/N ca. 5:1). The calibration concentrations for the described method ranged from 0.5 to 100 ng/ml (calibration levels: 0.5, 2.0, 5.0, 20, 50, 100 ng/ml). The standard calibration curve was constructed using a $1/x$ weighted linear least squares regression based upon the concentration versus peak area ratio (analyte/internal standard). Calibration function parameters, acquired by triplicate analysis of independent calibration series, were as follows: a (axis intercept): 0.0215, b (slope): 0.2349, R^2 : 0.9988. The minimum acceptance criteria of max. 20 % deviation from the nominal concentration at the limit of quantification (0.5 ng/ml) and 15 % for all other calibration levels were fulfilled for all calibration series measured.

On-line method, plasma: Calibration parameters for the analysis of Piritamide in human plasma by on-line-SPE LC-MS/MS were also determined by triplicate analysis of independent calibration series as described above within the range of 0.5 – 100 ng/ml in order to demonstrate the usability not only for urine but also for plasma. The parameters were: a: 0.0153, b: 0.0591, R^2 : 0.9977, max. deviation: -11 % (at 0.5 ng/ml), min. deviation: +1 % (at 100 ng/ml), weighting: $1/x$. Sample chromatograms are depicted in Figure 5.

On-line method, urine: Interferences in different Piritamid-free urine samples did not occur. However, interferences did occur in patient samples treated with Piritamide (see above). The obvious limit of detection with a minimum S/N-ratio of 3:1 was 0.05 ng/ml and thus comparable to Piritamide in plasma, determined by off-line SPE LC-MS/MS. The method proved to be linear within the calibration range of 0.5 – 100 ng/ml; a: 0.0121, b:

0.0631, R^2 : 0.9992, max. deviation: -19.7 % (at 0.5 ng/ml), min. deviation: -0.1 % (at 100 ng/ml), weighting: 1/x. For blank, LOD-, LOQ- and patient-chromatograms see Figure 6.

Recovery

Off-line method, plasma: The extraction recoveries of Piritramide from fortified human plasma were determined at the concentrations 10, 25, 50 and 100 ng/ml in three replicates. These samples were extracted, spiked with internal standard (IS) after extraction and prior to analysis and measured against standards in water/acetonitrile/formic acid (70/30/0.1) containing the same concentrations of Piritramide and internal standard. Recovery was calculated as ratio [(peak area Piritramide/peak area IS) after extraction / (peak area Piritramide/peak area IS) standard] in percent. The determined extraction recoveries were 90.7 ± 2.4 % (mean \pm standard deviation) (10 ng/ml), 100.0 ± 1.6 % (25 ng/ml), 99.6 ± 1.6 % (50 ng/ml), 95.3 ± 2.4 % (100 ng/ml).

On-line method: For the on-line SPE method extraction recoveries were not determined due to the obstacles discussed in *Method validation*. Direct comparison of analyte peak areas without consideration of the IS between urine and plasma samples and pure standards at least suggest that the loss caused by the protein precipitation step amounts to less than 10 %.

Influence of matrix effects

Off-line method, plasma: The extent of matrix effects was tested by analysis of extracted blank plasma fortified with Piritramide at three different concentrations and IS prior to injection which were compared to directly injected standards at the same concentrations (10, 25, 50, 100 ng/ml; triplicate repetition per level). None of the spiked matrix samples deviated by more than 13.2 % from the standard (max. allowed: 15 %). Significant matrix effects can therefore be excluded.

On-line-method, urine: A post-column infusion-experiment was chosen in order to evaluate matrix-caused ionisation suppression or amplification. Piritramide (10 μ g/ml in water/acetonitrile/formic acid – 50/50/0.1) is infused at a constant rate of 10 μ l/min into the eluent stream via a T-piece between the analytical column and the ESI-interface to produce a constant higher signal. 100 μ l of blank urine pre-treated like all other samples are then injected by the autosampler, analysed by online-SPE-LC-MS/MS and the depression of the elevated baseline is monitored. As can be seen in Figure 7, the main ionisation suppression appears between 2.5 and 4.0 min and does not markedly affect detection at the time when Piritramide elutes.

Freeze-thaw and long-term stability

Off-line method, plasma: Freeze-thaw stability was verified by freezing freshly prepared quality control samples (1.5, 40, 80 ng/ml; n=3 per level) overnight at -20°C and exposing them to room temperature for 2 hours. After the third freeze-thaw cycle the samples were analysed together with a calibration sample series. None of the quality control samples exceeded a deviation from the nominal concentration of more than -9 to $+2$ %. For long-term stability testing a set of quality control samples as used in the freeze-thaw experiment was stored at -20°C for 13 months and then analysed together with freshly prepared calibration samples. All mean concentrations were within the accepted range of ± 15 % (1.5 ng/ml: -13.3 ± 5.9 % (mean \pm SD), 40 ng/ml: -10.1 ± 5.0 %, 80 ng/ml: -10.7 ± 5.3 %). Although stability was demonstrated over this period it is advisable to store plasma samples at -80°C for a maximum period of 6 months, for the measured concentrations indicate a slight substance degradation.

On-line method, urine: Freeze-thaw and long-term stability of Piritramide in urine was tested according to the same scheme as for plasma samples, duration of storage was 6 months for urine, though. Maximum deviations were -7.6 and $+5.3$ % for freeze-thaw samples and -8.2 and $+5.0$ % for long-term stability samples. Thus in both cases stability was proven under the specified conditions.

Intra-/interday accuracy and precision

The assay precision and accuracy for both the off-line and on-line LC-MS/MS method were determined at three QC levels (1.5, 40, 80 ng/ml) in six fold replicates each on three separate days. All values met the acceptance criterion of less than 15 % for mean deviation from the nominal concentration and coefficient of variation (CV). Accuracy was calculated as percent error [(measured concentration-spiked concentration) \times 100 / spiked concentration], precision was quantitated by calculating intra- and interday CV-values. Details are given in table 1 for plasma and table 2 for urine.

Influence of pH in urine

Urine pH-value can be subject to physiological fluctuations which could potentially affect the analytical result. For plasma this parameter is less important, because firstly plasma-pH is much more constant and secondly the addition of phosphoric acid before extraction ensures approximately identical pH-conditions for all samples. In order to exclude detrimental effects by varying pH-values in urine, blank urine (which already had a pH of 7) was adjusted to pH 6 and 8 with HCl (1 mol/l) and KOH (1 mol/l) and was spiked with

Piritramide as described for quality control samples. Three samples per level with pH 6, 7, and 8 were analysed together with a calibration series. All values were within the range of $\pm 15\%$ (max. +14.6 % at 80 ng/ml, pH 6). The influence of pH on the analytical result seems not to be significant.

Clinical application

Both methods were applied for the analysis of Piritramide in human plasma and urine within a patient-pharmacokinetic study. For the determination of Piritramide in plasma the method worked well without unexpected events (example chromatogram see Figure 4), whereas in patient urine additional peaks were detected which required the use of a gradient system instead of isocratic elution as for plasma (chromatogram see Figure 6).

CONCLUSION

Two approaches for the LC-MS/MS analysis of Piritramide applying conventional off-line solid phase extraction for human plasma as well as automated on-line solid phase extraction for human urine have been developed and validated. Both methods fulfilled all critical validation criteria satisfactorily. Applicability of the on-line method was also tested for the analysis of Piritramide in plasma with regard to linearity and showed good comparability with the off-line method. Compared with the one LC-MS assay for Piritramide in plasma (9) previously reported, our method features more time-saving solid phase extraction (ca. 40 samples per hour) and a wider linear range (0.5-100 ng/ml). The simple protein-precipitation step for sample preparation prior to on-line SPE-LC-MS/MS allows an even higher sample-throughput of ca. 100 samples per hour and could be easily downscaled to a minimum required sample volume of 50 μ l. Both methods are efficient with regard to total LC run times of 6.2 min (4.2 min for sample + 2.0 min for wash injection) for off-line SPE-LC-MS/MS and 8.5 min (7.0 min + 1.5 min) for on-line SPE-LC-MS/MS. The latter method was the first validated analytical assay for Piritramide in human urine, both were successfully applied to the determination of plasma and urine concentrations in a pharmacokinetic study.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Prof. F.-J. Kretz and E. Dessecker for kindly providing blood and urine samples of patients from Olga Hospital Stuttgart, Germany.

References

1. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, eds. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Ed. 7. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996:485-488
2. Kumar N, Rowbotham DJ. Piritramide (editorial). *Br J Anaesth* 1999;82(1): 3-5
3. Kietzmann D, Briede I, Bouillon T, Gundert-Remy U, Kettler D. Pharmacokinetics of piritramide after an intravenous bolus in surgical patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996;41: 898-903
4. Bouillon T, Kietzmann D, Port R, Meinecke I, Hoeft A. Population pharmacokinetics of piritramide in surgical patients. *Anaesthesiology* 1999;90: 7-15
5. Wiesner G, Gruber M, Wild K, Hoerauf K, Taeger K. Protein binding of piritramide: influence of various protein concentrations and the postoperative acute phase response. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;54: 843-845
6. Michaelis HC, Kietzmann D, Neurath H, Jongepier U, Schilling B. Sensitive determination of piritramide in human plasma by gas chromatography. *J Chromatogr* 1991;571: 257-262
7. Michaelis HC, Kietzmann D, Kahl GF. Sensitive determination of piritramide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 1991;14(18): 3439-3445
8. Misztal G. Piritramide determination in serum by high-performance liquid chromatography. *Acta Pol Pharm* 1991;48(5-6): 1-2
9. Martens-Lobenhoffer J, Romhild W. Quantitative determination of piritramide in human serum applying liquid chromatography-two-stage mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;783(1): 53-59
10. Kietzmann D, Bouillon T, Hamm C, Schwabe K, Schenk H, Gundert-Remy U et al. Pharmacokinetic modelling of the analgesic effects of piritramide in postoperative patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41: 888-894
11. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Use of monolithic supports for fast analysis of drugs and metabolites in plasma by direct injection. *Chromatographia* 2003;57(9/10): 569-575

12. Schellen A, Ooms B, van de Lagemaat D, Vreeken R, van Dongen WD. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J Chromatogr B* 2003;788(2): 251-259
13. Zhang JY, Fast DM, Breau AP. Determination of valdecoxib and its metabolites in human urine by automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;785(1): 123-134
14. von Bruchhausen F, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, eds. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Vol. 5: Stoffe L-Z. Ed. 5.* Berlin, Heidelberg: Springer, 1999:254-255
15. Waters corporation. Oasis MCX Product and Generic Method Information. In: *Oasis Applications Notebook (pdf-file)*, 2003;720000609EN: 18 (www.waters.com - accessed December 2004)

TABLES

table 1. Intra- and interday accuracy and precision results for Piritramide in plasma

	intraday-variability			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
1.5 ng/ml				
mean	1.40	1.41	1.38	1.40
accuracy [%]	-6.55	-6.16	-7.89	-6.87
SD	0.03	0.03	0.08	0.05
CV [%]	2.27	2.27	6.10	3.80
40 ng/ml				
mean	38.88	37.72	38.06	38.22
accuracy [%]	-2.81	-5.69	-4.85	-4.45
SD	1.26	0.49	1.05	1.05
CV [%]	3.25	1.31	2.75	2.76
80 ng/ml				
mean	76.66	75.86	76.63	76.38
accuracy [%]	-4.17	-5.18	-4.21	-4.52
SD	1.23	1.51	1.41	1.36
CV [%]	1.61	1.99	1.84	1.78

table 2. Intra- and interday accuracy and precision results for Piritramide in urine

	intraday-variability			interday-variability
	day 1	day 2	day 3	day 1+2+3
1.5 ng/ml				
mean	1.39	1.43	1.45	1.42
accuracy [%]	-7.58	-4.34	-3.12	-5.01
SD	0.02	0.01	0.01	0.04
CV [%]	1.68	0.45	3.46	2.94
40 ng/ml				
mean	38.78	39.82	39.43	39.34
accuracy [%]	-3.06	-0.45	-1.43	-1.65
SD	0.97	2.10	0.30	1.34
CV [%]	2.51	5.28	0.75	3.41
80 ng/ml				
mean	80.61	82.13	80.80	81.18
accuracy [%]	0.76	2.66	1.00	1.47
SD	1.32	3.27	5.18	3.47
CV [%]	1.63	3.99	6.41	4.28

Figures

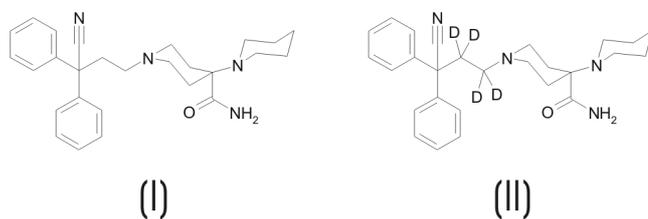


Figure 1. Chemical structures of Piritramide (I) and D4-Piritramide (II)

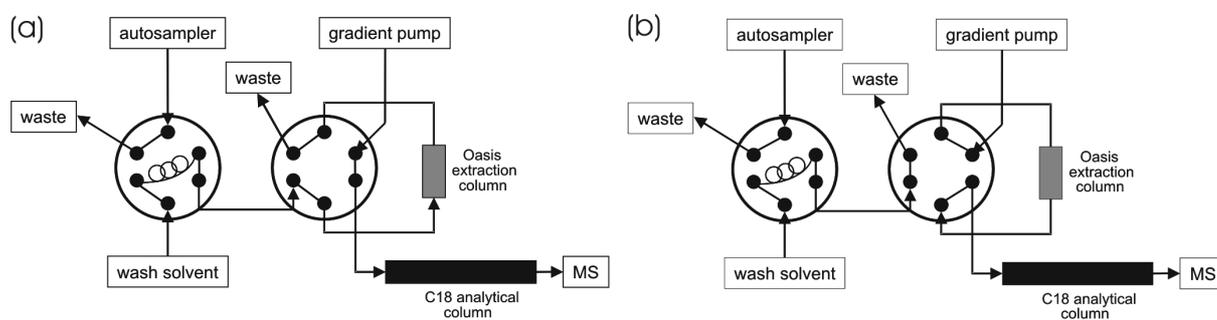


Figure 2. On-line extraction column switching scheme. (a) Sample is loaded onto the SPE column for removal of unwanted concomitant compounds. (b) Sample is desorbed from SPE column in back-flush mode and carried onto the analytical column for quantification.

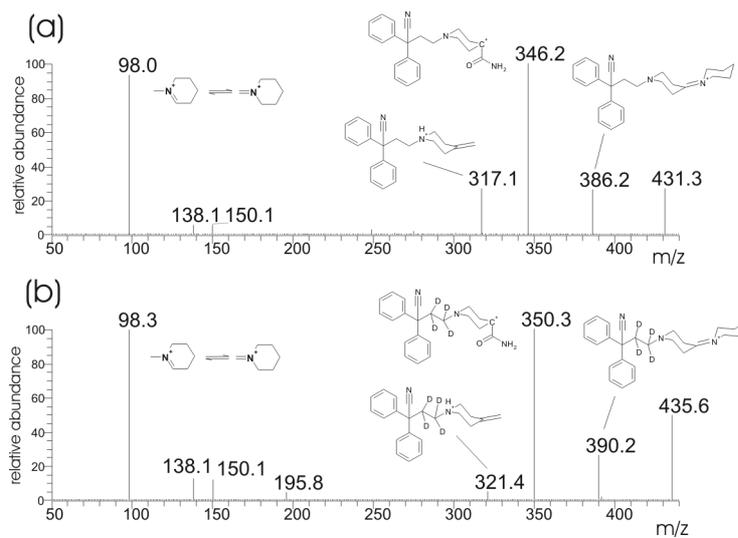


Figure 3. Collision-induced fragmentation spectra at collision energy 25 V of (a) Pir tramide and (b) D4-Pir tramide with proposed fragment structures

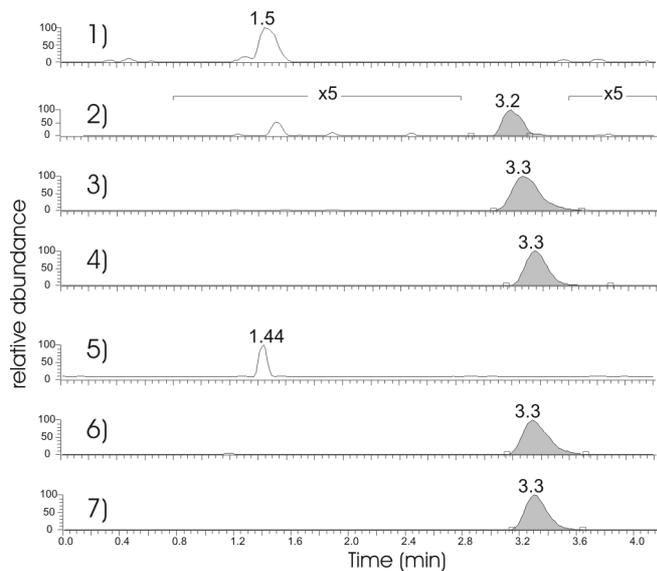


Figure 4. Pir tramide in plasma: Representative LC-SRM chromatograms of Pir tramide (m/z 431→346+98): 1) blank plasma, 2) Pir tramide at the LOD, 3) Pir tramide at the LOQ, 4) patient plasma sample - and D4-Pir tramide (m/z 435→350+98): 5) blank plasma, 6) blank plasma + IS, 7) patient plasma sample + IS

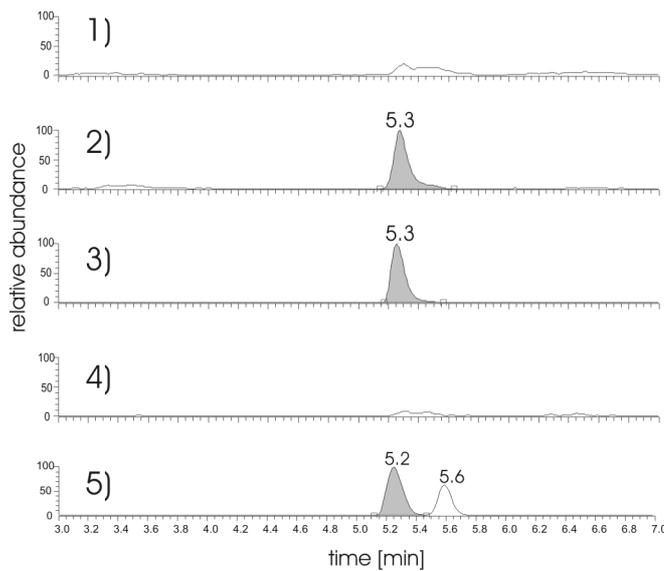


Figure 5. Pir tramide in plasma measured by on-line-SPE-LC-MS/MS: Representative chromatograms of Pir tramide (m/z 431→346+98): 1) blank plasma, 2) LOQ, 3) patient sample – and D4-Pir tramide (m/z 435→350+98): 4) blank plasma, 5) patient plasma sample + IS

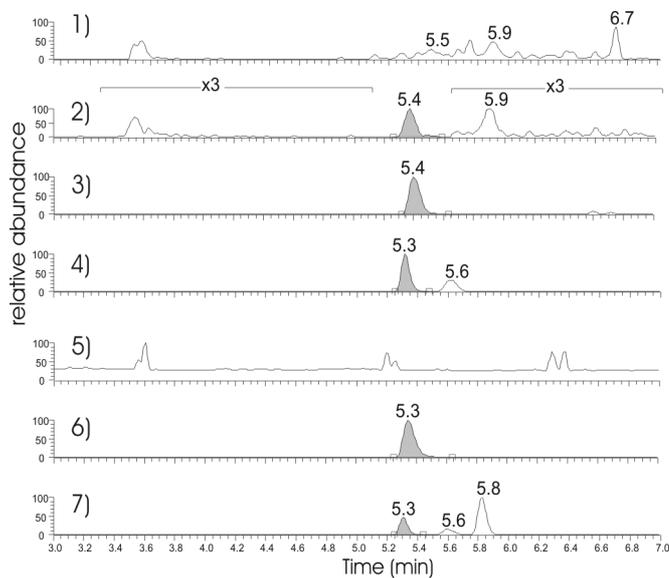


Figure 6. Pir tramide in urine: Representative LC-SRM chromatograms of Pir tramide (m/z 431→346+98): 1) blank urine, 2) Pir tramide at the LOD, 3) Pir tramide at the LOQ, 4) patient urine sample - and D4-Pir tramide (m/z 435→350+98): 5) blank urine, 6) blank urine + IS, 7) patient urine sample + IS

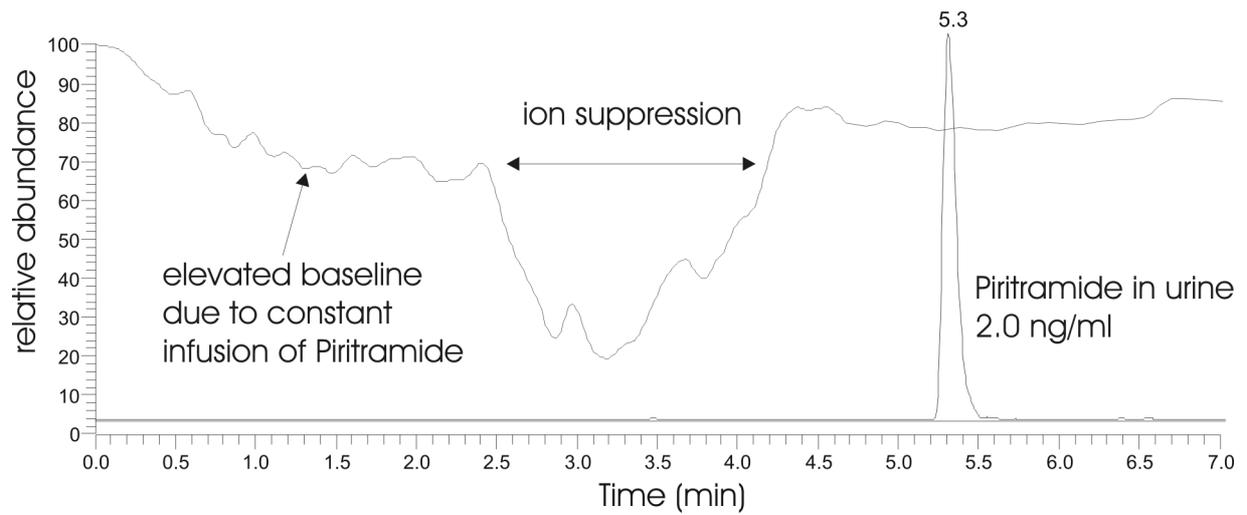


Figure 7. Post-column infusion experiment for detection of urine matrix-related ionisation suppression effects; upper trace: ion suppression caused by injection of blank urine – lower trace: Piritramid 2.0 ng/ml in urine

4.4 Piritramid: Metabolitenidentifizierung

4.4.1 Chemikalien, Materialien, Geräte und Proben

4.4.1.1 Chemikalien

Für HPLC-Zwecke wurden durchgehend Lösungsmittel der Reinheit "gradient grade" von VWR (Darmstadt) eingesetzt. Sämtliche anderen Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel hatten mind. p.a. Qualität und stammten entweder von VWR oder Sigma (München).

4.4.1.2 Materialien zur Probenvorbereitung

Waters Oasis[®] MCX SPE-Kartuschen 30 mg/1 ccm und 60 mg/3 ccm

Vakuumentziehstation Vac Elut 20, Varian (Darmstadt)

Vakuumentziehstation SpeedVac, Thermo Life Sciences (Holbrooke, USA)

Zentrifuge 5417R, Eppendorf (Hamburg)

Schüttelwasserbad ShakeTemp SW 22, Julabo (Seelbach)

4.4.1.3 HPLC-Säulen

Grom Sil 120 ODS 3-CP, 150x2 mm, 5 µm

Grom Sil 120 ODS 3-CP, 125x4 mm, 5µm

4.4.1.4 Geräte

HPLC-UV-MS (triple-Quadrupol): Surveyor MS-Pump, Surveyor Autosampler, Surveyor PDA-Detektor, TSQ Quantum Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, Thermo Electron (San José, USA)

HPLC-UV-MS (Ionenfalle): Chemstation 1100 (Hochdruckgradientenpumpe, Degaser, Autosampler, PDA-Detektor), Agilent (Waldbronn) + HCT-Ion-Trap, Bruker (Bremen)

FT-MS: Apex II, Bruker Daltonics (Bremen)

4.4.1.5 Proben

Erwachsenenurin: gepoolter Urin von 6 Intensivstationspatienten (Klinikum Tübingen) (81 Jahre ♀, 80 J. ♀, 58 J. ♀, 88 J. ♀, 59 J. ♂, 70 J. ♂), insges. ca. 3 Liter, gelagert bei -25°C für max. 3 Monate

Kinderurin: Einzelurinproben von Patienten aus dem Olgahospital (Teilnehmer der Piritramid-Kinetikstudie), Volumen: ca. 5-40 ml

Kinderplasma: Einzelplasmaproben von Patienten aus dem Olgahospital (Teilnehmer der Piritramid-Kinetikstudie), Volumen: max. ca. 1.2 ml

Humanlebermikrosomen: Probe der Fa. Merckle (Blaubeuren), Kennzeichnung 'Steffan 190700', Proteingehalt ca. 20 mg/ml

Rattenlebermikrosomen: selbst hergestellte Mikrosomenproben von erwachsenen, männlichen Sprague-Dawley Ratten, die im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Oswald, für Untersuchungen der Nierenfunktion eingesetzt wurden. Im Rahmen der Operation an den Nieren, für die die Tiere eingeschläfert wurden, wurden die Lebern von 20 Ratten herauspräpariert, in 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und bei -80°C eingefroren. Die Ratten bekamen zuvor normale Diät.

4.4.2 Rattenlebermikrosomenpräparation

Die Durchführung erfolgte gemäß einer modifizierten Praktikumsanleitung für den Biochemie-Toxikologie-Kurs der Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Werringloer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen ("Präparation von Zellfraktionen"). Alle Arbeitsschritte wurden unter Kühlung auf Eis bzw. in vorgekühlten Zentrifugen vollzogen. 10 eingefrorene Lebern (durchschnittl. Gewicht 13.7 g) von ausgewachsenen Ratten (Gewicht je ca. 300 g) wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert und Homogenisationsmedium (Na₂-Edetat 1 mM/Saccharose 250 mM – 4 ml/g Leber) hinzugefügt. Diese Suspension wurde in einem 50 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator durch 10maliges Auf- und Ab-Bewegen des Kolbens homogenisiert. Diese Prozedur kann für jeweils 2 Lebern gleichzeitig durchgeführt werden. Es folgte die Grobzentrifugation zur Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellkernen und Mitochondrien bei 4°C und 6000 g für 10 min und 12000 g für 20 min. Der Überstand ohne den Fettfilm wurde in Ultrazentrifugenröhrchen transferiert und 60 min lang bei 4°C und 100000 g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das rotbraune Mikrosomenpellet von dem darunter liegenden gelatineähnlichen Glycogenpellet abgetrennt. Die Mikrosomen wurden mit KCl-Lösung (150 mM – 50 ml/g Pellet) suspendiert und zur weiteren Reinigung nochmals für 60 min bei 4°C und 100000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, die gereinigten Pellets mit je ca. 2 ml Saccharose-Lösung (250 mM) aufgenommen und vereinigt.

Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte mit dem Bradford-Test [124] (Test-Kit von Bio-Rad, München; BSA als Standard); Kalibrierstandards: 0 – 10 – 30 – 50 – 80 – 100 – 150 – 200 µg/ml BSA in H₂O, Probenverdünnung: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 in H₂O. 100 µl Probe bzw. Standard wurden mit 900 µl 6fach verdünntem Bradford-Reagenz gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 630 nm gemessen. Ergebnis: R² der Kalibrierung: 0.998; gemessene Konzentrationen:

97.1 µg/ml für 1:500 und 56,9 µg/ml für 1:1000. Es ergibt sich folglich ein durchschnittlicher umgerechneter Proteingehalt von 52.7 mg/ml.

Die Mikrosomensuspension wurde bei diesem Proteingehalt belassen, zu jeweils 2 ml aliquotiert und bei –80°C eingefroren. Bei dieser Lagerung sind die Proben hinsichtlich der Cytochrom P450-Aktivität über mehrere Monate stabil [125]. Insgesamt wurden aus 137.4 g Rattenleber 13.8 g Mikrosomenpellet gewonnen, was einer Ausbeute von rund 10 % entspricht.

4.4.3 Mikrosomeninkubation

4.4.3.1 Humanlebermikrosomen

(durchgeführt von Fr. Annemarie Maier, Merckle GmbH - Wirkstoffforschung, Blaubeuren)

Reagenz	Volumen	Konzentration
NADP	50 µl	1 mM
Glucose-6-phosphat	50 µl	5 mM
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	4 µl	0.85 U
Humanlebermikrosomen (190700 Steffan)	50 µl	20 mg Protein/ml
Puffer	800 µl	0.05 M KH ₂ PO ₄ + 1 mM EDTA + 3 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O ad pH 7.4 mit KOH 20 %
Piritramid	45 µl	11.1 µM

Die Lösungen wurden 10 s am Vortex-Mischer gemischt, bei 37°C 5 min vorinkubiert, bevor die Piritramid-Lösung zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über 2 h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Methanol gestoppt, ausgefälltes Protein bei 4°C und 12000 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand anschließend abpipettiert und bei –80°C bis zur Probenaufarbeitung eingefroren.

4.4.3.2 Rattenlebermikrosomen

Standardansatz (Vorschrift der Fa. Merckle zur Durchführung von in-vitro Metabolismus Untersuchungen)

Reagenz	Volumen	Konzentration
Tris-HCl-Puffer	800 µl	0.1 M: 1.144 g Tris-HCl + 0.332 g Tris-Base ad 100 ml H ₂ O (pH ca. 7.8 bei Raumtemp.)
MgCl ₂	50 µl	80 mM in H ₂ O
β-NADP	50 µl	20 mM in H ₂ O
Glucose-6-phosphat	50 µl	100 mM in H ₂ O
Piritramid	10 µl	1 mM in Methanol (ergibt 100 µM im Ansatz)
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	10 µl	100 U/ml in 0.1 M Tris-HCl-Puffer
Vorinkubation 37°C, 5 min		
Mikrosomen	50 µl	50 mg Protein/ml
10 s vortex-mischen, Inkubation bei 37°C für max. 1 h im Schüttelwasserbad		

Für analytische Zwecke wurde der Versuch im 1 ml-Maßstab durchgeführt. Die Reaktion wurde hier durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Methanol gestoppt, das Präzipitat abzentrifugiert, der Überstand im SpeedVac Probenkonzentrierer bei 40°C für 2 h unter Vakuum zur Trockene eingedampft und anschließend in 100 µl Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (70/30/0.1) rekonstituiert.

Für semi-präparative Zwecke (100 ml) wurden die obigen Volumina mit dem Faktor 100 multipliziert. Die Reaktion wurde durch Eiskühlung ohne Zusatz von Lösungsmitteln gestoppt. Es erfolgte umgehend die Aufreinigung mittels Festphasenextraktion.

4.4.4 Probenvorbereitung

4.4.4.1 Plasma

SPE mit Waters Oasis MCX (30 mg, 1 ccm)

Konditionieren: 1 ml Methanol

Äquilibrieren: 1 ml H₂O

Probe: 0.5 ml Plasma + 50 µl H₃PO₄ (85%) (vortexen, zentrifugieren, Überstand auftragen)

Waschen 1: 1 ml MeOH 5% in 0.1 N HCl
Waschen 2: 2x1 ml Methanol
Trocknen: 5 min unter vollem Vakuum
Elution: 1 ml Methanol + 2.5 % Triethylamin
Eindampfen: SpeedVac, 2 h, 40°C, Vakuum-Einstellung "aqueous"
Rekonstitution: 100 µl Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (90/10/0.1)

4.4.4.2 Urin

Methode 1 (für kleine Volumina) – SPE mit Waters Oasis[®] MCX (60 mg, 3 ccm)

Konditionieren: 1 ml Methanol
Äquilibrieren: 1 ml H₂O
Probe: 3 ml Urin + 60 µl H₃PO₄ (85 %) (vortexen, zentrifugieren, Überstand auftragen)
Waschen 1: 1 ml Methanol 5 % in 0.1 N HCl
Waschen 2: 1 ml Methanol
Waschen 3: 1 ml Methanol/NH₃ 5 % (70/30)
Trocknen: 5 min, volles Vakuum
Elution: 1 ml Methanol/NH₃ 25 % (95/5)
Eindampfen: SpeedVac, 2 h, 40°C, Vakuum-Einstellung "aqueous"
Rekonstitution: 200 µl Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (90/10/0.1)

Methode 2 (für große Volumina) – Flüssig-Flüssig-Extraktion

Probe: 1000 ml Erwachsenenurin konzentriert zu ca. 500 ml; der Urin wird hierzu wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut (3x) - es bilden sich zwei Schichten, die obere davon (substanz- und salzarm) wird vorsichtig abpipettiert und verworfen (Methode modifiziert nach [126]); weitere Extraktion:

- Einstellung des Urins auf ca. pH 2 mit 10 N HCl
- Extraktion mit 2x 150 ml CH₂Cl₂, organische Phase verwerfen
- H₂O-Phase mit NH₃/NH₄AcO-Puffer (1 M, pH 9) auf ca. pH 9 einstellen

- Extraktion der H₂O-Phase mit 3x 200 ml Diethylether, H₂O-Phase verwerfen
- Etherphasen vereinigen, über Na₂SO₄ trocknen, abfiltrieren und einrotieren
- Rückstand in 2 ml Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (90/10/0.1) aufnehmen, bei 19800 g zentrifugieren und Überstand für die Analytik verwenden

4.4.4.3 Mikrosomeninkubat

Der semi-präparative Rattenlebermikrosomeninkubations-Ansatz (100 ml) wurde wie folgt aufgearbeitet: Festphasenextraktion mit Waters SepPak® C18 (500 mg/3 ccm) zur Entfernung von Proteinen und Salzen

Konditionieren: 3 ml Methanol

Äquilibrieren: 3 ml H₂O

Probe: 100 ml wässriges Rattenlebermikrosomeninkubat, ohne weitere Vorbehandlung, gleichmäßig verteilt auf 12 SPE-Säulen

Waschen: 2 x 1 ml H₂O - 1 x 1 ml NH₃ 1 %/Methanol (95/5) – 2 x 1 ml H₂O

Trocknen: 10 min, volles Vakuum

Elution: 2 ml Methanol

Eindampfen: methanolisches Eluat vereinigen, am Rotationsverdampfer zur Trockene einengen (37°C, ca. 150 mbar)

Rekonstitution: 2 ml Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (70/30/0.1)

4.4.5 HPLC-triple-quadrupol-MS-Analytik

4.4.5.1 HPLC: analytischer Maßstab (Surveyor-HPLC)

Laufmittel: (A) H₂O+0.1% Ameisensäure, (B) Acetonitril+0.1 % Ameisensäure

Gradient für die Chromatographie von Urin-, Plasma- und Mikrosomenproben:

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [µl/min]
1	0.0	88	12	300
2	5.0	88	12	300
3	10.0	70	30	300
4	14.0	67	33	300
5	17.0	0	100	300
6	19.0	0	100	300

Gradient für die nachfolgende Spülinjektion:

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	0.0	0	100	300
2	0.5	0	100	300
3	0.6	88	12	300
4	4.0	88	12	300

Säule: Grom Sil 120 ODS 3-CP, 150x2 mm, 5 μm

injiziertes Probenvolumen: 20 μl

4.4.5.2 HPLC: semi-präparativer Maßstab (Surveyor-HPLC)

1. Dimension: Auftrennung des Rattenlebermikrosomeninkubats in 3 Vorfraktionen (1: Dihydroxy-Metabolite, 2: Monohydroxy-Metabolite, 3: Dehydro-Piritramid)

Laufmittel: (A) Ammoniumacetat-Puffer (5mM, pH 4.0), (B) Methanol

Gradient für die Auftrennung in drei Vorfraktionen

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	0.0	60	40	800
2	4.0	60	40	800
3	12.0	50	50	800
4	13.0	50	50	800
5	13.1	0	100	800
6	15.0	0	100	800
7	15.1	60	40	800
8	18.0	60	40	800

2. Dimension: Auftrennung der einzelnen Fraktionen

Laufmittel: (A) $\text{H}_2\text{O}+0.1\%$ Ameisensäure, (B) Acetonitril+0.1 % Ameisensäure

Gradient für die Trennung der 1. Fraktion (Dihydroxy-Verbindungen, m/z 463.2):

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	0.0	82	18	1000
2	7.0	82	18	1000
3	12.0	70	30	1000
4	13.0	70	30	1000
5	13.1	0	100	1000
6	14.0	0	100	1000
7	14.1	82	18	1000
8	16.0	82	18	1000

Gradient für die Trennung der 2. Fraktion (Monohydroxy-Verbindungen, m/z 447.2):

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	0.0	80	20	800
2	8.0	80	20	800
3	15.0	55	45	800
4	15.1	0	100	1000
5	16.0	0	100	1000
6	16.1	80	20	800
7	19.0	80	20	800

Gradient für die Trennung der 3. Fraktion (Dehydro-Verbindung, m/z 429.2):

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [$\mu\text{l}/\text{min}$]
1	0.0	70	30	800
2	3.0	70	30	800
3	8.0	50	50	800
4	8.1	0	100	800
5	10.0	0	100	800
6	10.1	70	30	800
7	12.0	70	30	800

Eine nachfolgende Spülinjektion erfolgt nicht. 95 % des Eluenten wird zum Sammeln der Fraktionen über ein T-Stück nach der Säule abgezweigt, 5 % gelangt zur Kontrolle der Retentionszeiten zum MS.

Säule: Grom Sil 120 ODS 3-CP, 125x4 mm, 5 μm

injiziertes Probenvolumen: 100 μl

4.4.5.3 MS-Detektor-Einstellungen (TSQ Quantum)

Detektionsmodus	positiver Elektrospray
Elektrospray-Spannung	3800 V
Stellung des Sprühkopfes zum Orifice	90°
Sheath gas	35 (willkürliche, gerätetyp. Einheiten)
Auxiliary gas	15
Ionentransferkapillaren-Temperatur	320°C
Kollisionsgasdruck (Argon)	1.0 mTorr

4.4.6 HPLC-Ionenfallen-MS-Analytik

4.4.6.1 HPLC: analytischer Maßstab (Chemstation 1100)

Laufmittel: (A) H₂O+0.1% Ameisensäure, (B) Acetonitril+0.1 % Ameisensäure

Gradient für die Chromatographie von Urin-, Plasma- und Mikrosomenproben:

Nr.	Zeit [min]	% A	% B	Flussrate [µl/min]
1	0.0	88	12	300
2	5.0	88	12	300
3	10.0	70	30	300
4	25.0	60	40	300
5	27.0	0	100	300
6	29.0	0	100	300
7	30.0	88	12	300
8	35.0	88	12	300

Säule: Grom Sil 120 ODS 3-CP, 150x2 mm, 5 µm

injiziertes Probenvolumen: 20 µl

4.4.6.2 MS-Detektor-Einstellungen (Bruker HCT-Ionenfalle)

Ionisation	Electrospray	Skimmer	40 V
Scan Mode	Standard Enhanced	Cap Exit	123.3 V
Polarity	positive	Octapole 1 DC	12.0 V
ICC	on	Octapole 2 DC	1.7 V
Smart Target	100.000	Trap Drive	47.7
Max. Accumulation Time	20 ms	Octapole RF	176.2 Vpp
Range	100-800 m/z	Lens 1	-5.0 V
Averages	3	Lens 2	-60.0 V

Rolling Averaging	2	Block Voltages	default
Tune:		Fragmentation settings:	
Capillary Voltage	-2000 V	Cut-off Selection	27 % of Precursor Mass
End Plate Offset	-500 V	Smart Fragmentation	on
Nebulizer	35 psi	Start Amplitude	30 %
Dry Gas	7 l/min	End Amplitude	200 %
Dry Temperature	300°C		

4.4.7 MS-Spektren

1) Piritramid

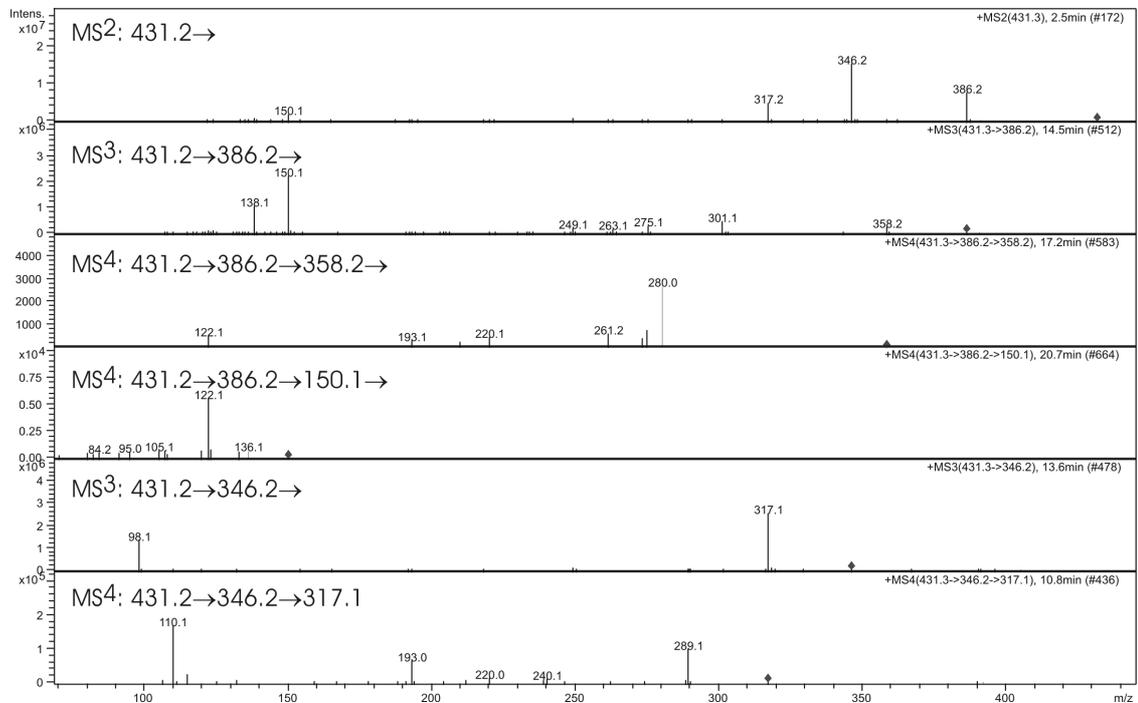


Abb. 4.1: Ionenfallen-CID-Spektrum von Piritramid

2) D4-Piritramid

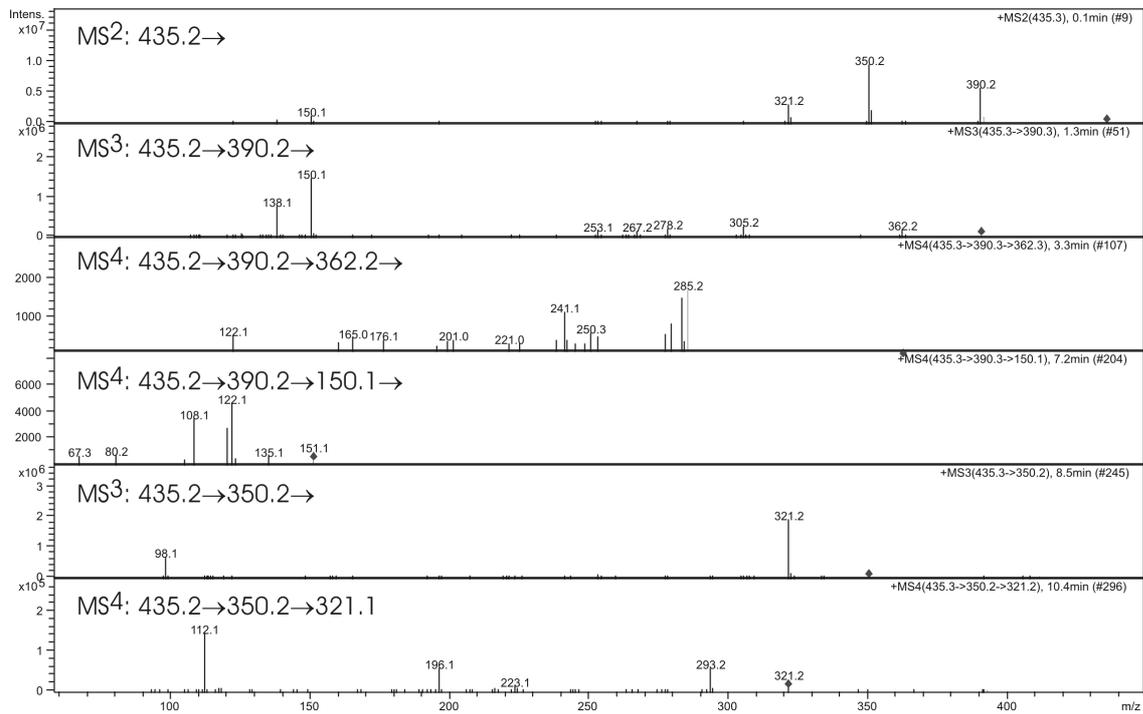


Abb. 4.2: Ionenfallen-CID-Spektrum von D4-Piritramid

3) Di-OH-M1 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 1)

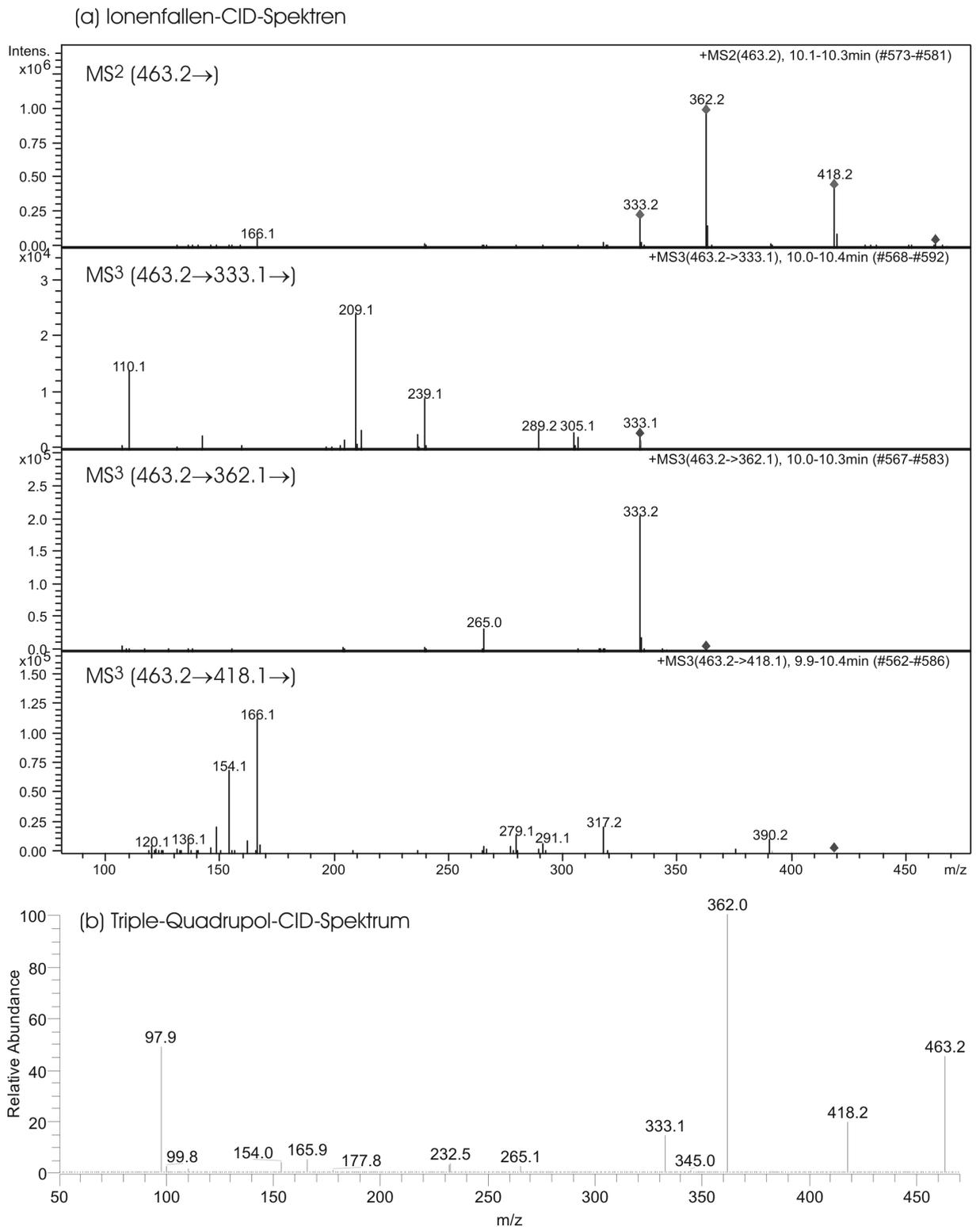


Abb. 4.3: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Di-OH-M1

4) Di-OH-M2 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 2)

(a) Ionenfallen-CID-Spektren

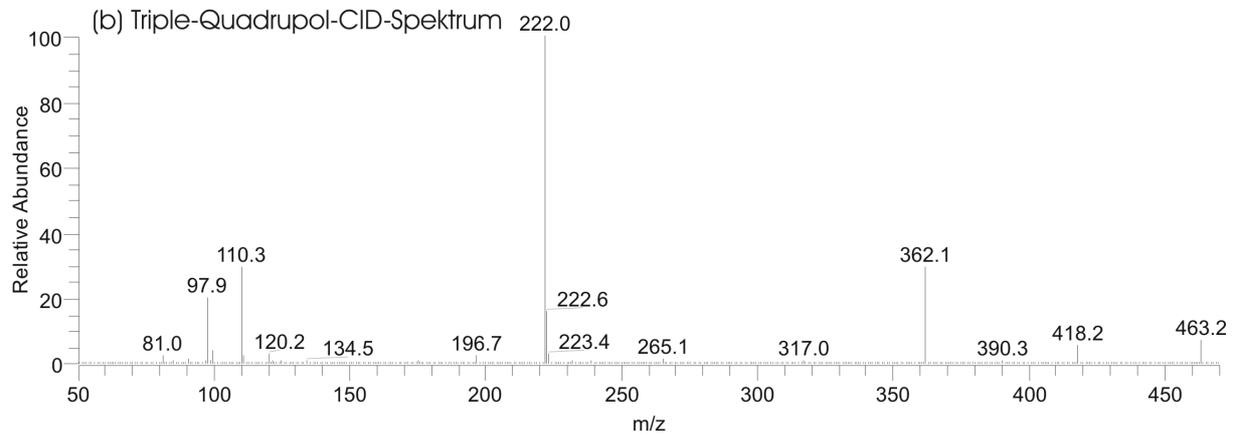
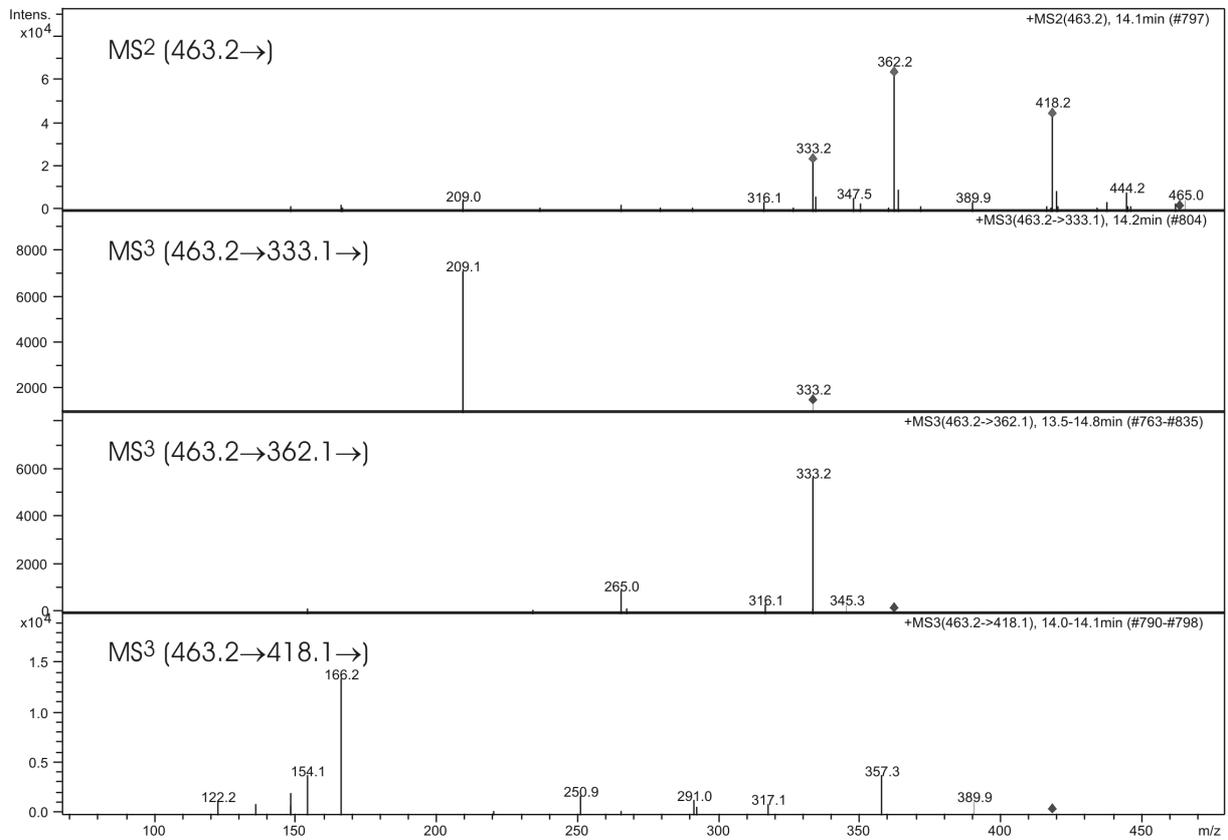


Abb. 4.4: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Di-OH-M2

5) Di-OH-M3 (dihydroxyliertes Piritramid, Peak 3)

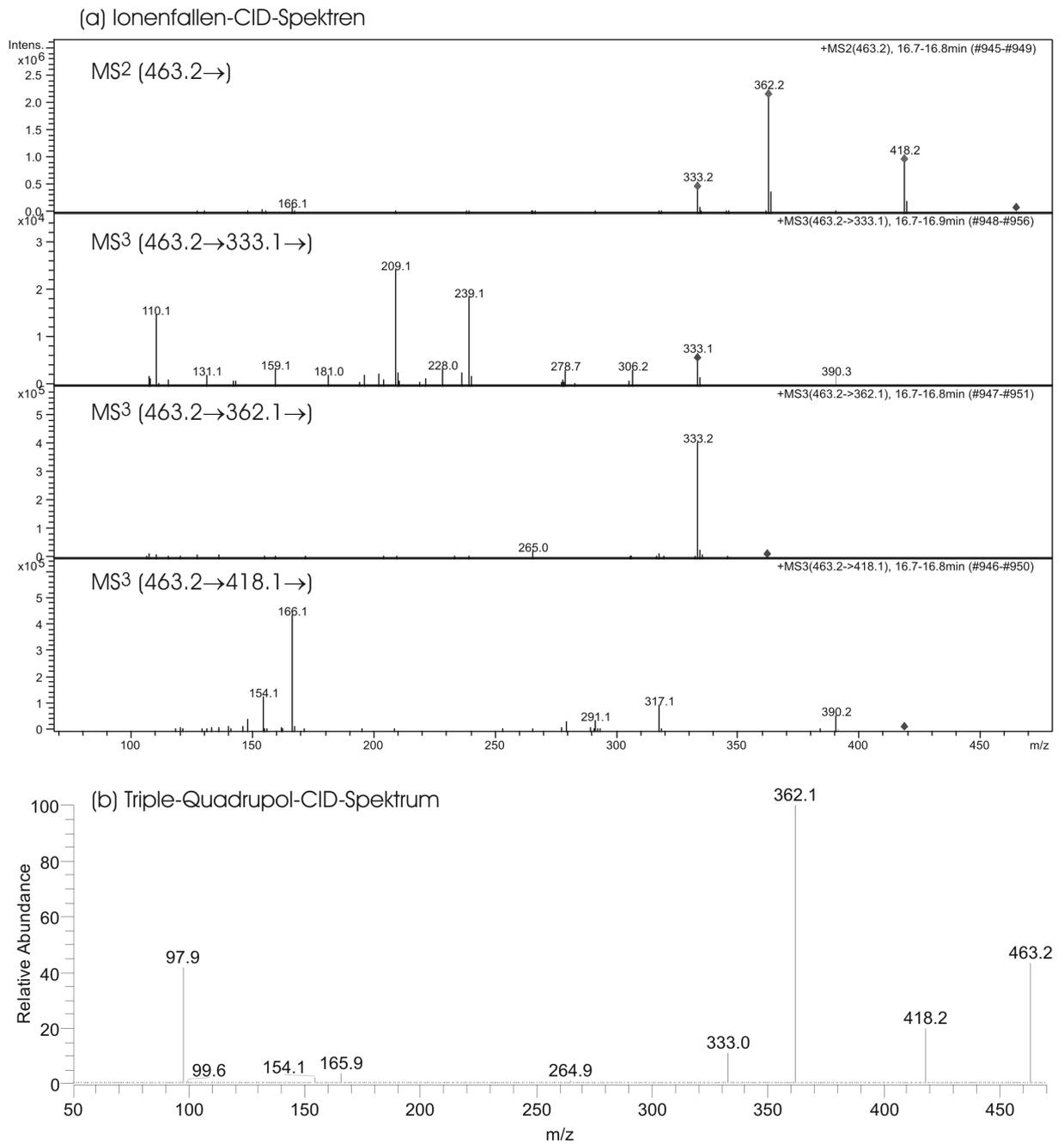


Abb. 4.5: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Di-OH-M3

6) Mono-OH-M1 (monohydroxyliertes Piritramid, Peak 1)

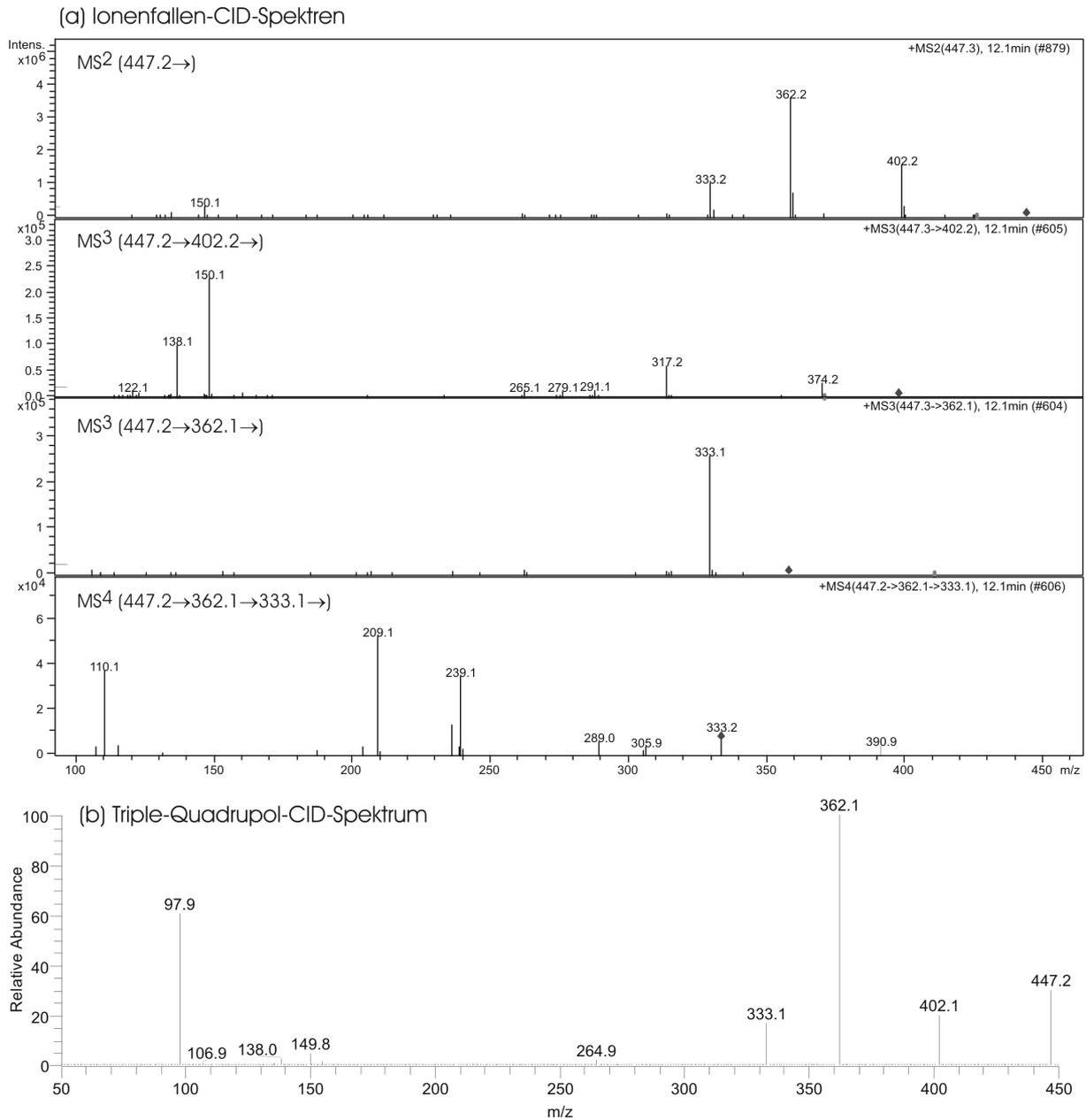


Abb. 4.6: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Mono-OH-M1

7) Mono-OH-M2 (monohydroxyliertes Piritramid, Peak 2)

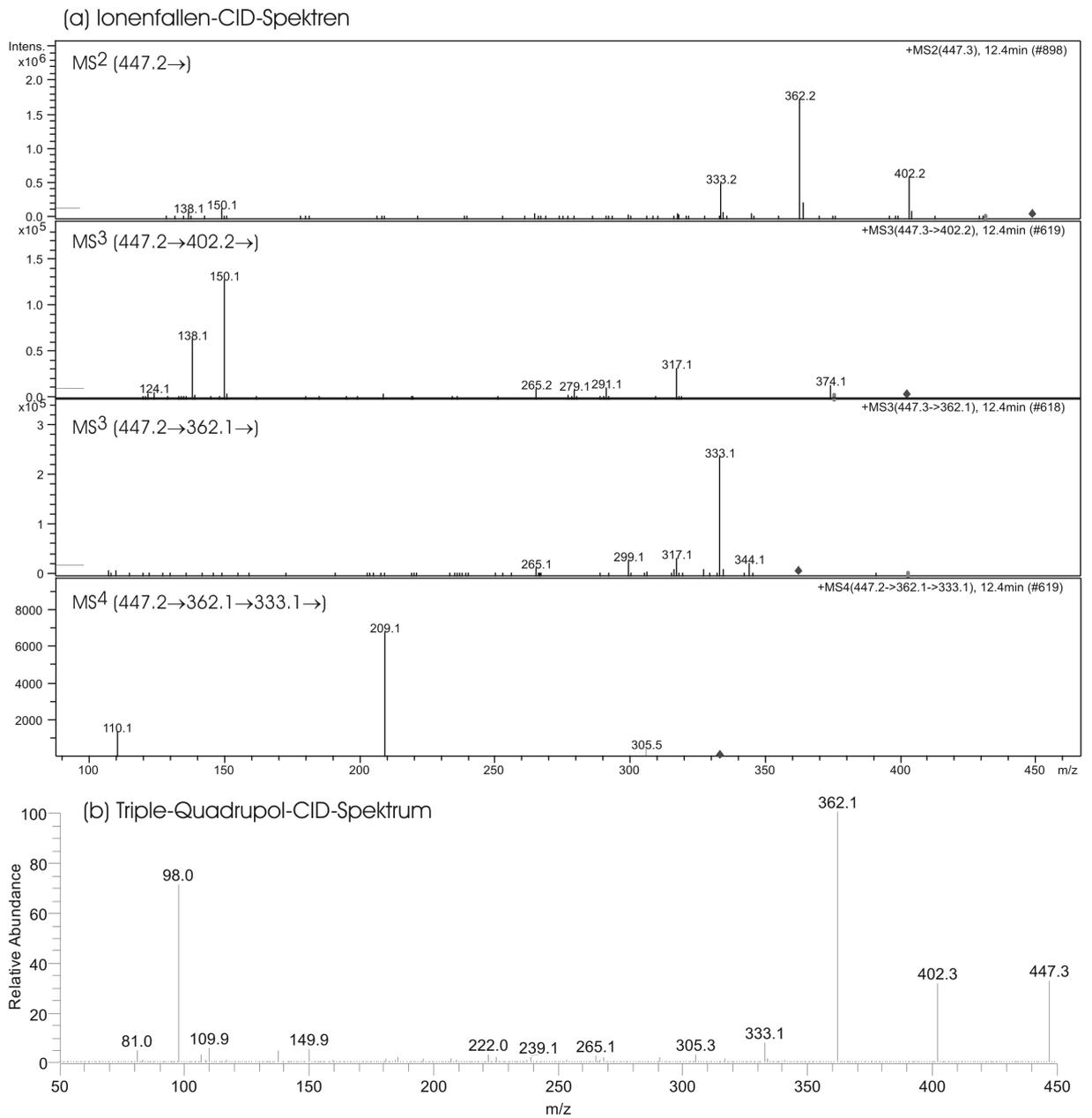


Abb. 4.7: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Mono-OH-M2

8) Mono-OH-M3 (monohydroxyliertes Piritramid, Peak 3)

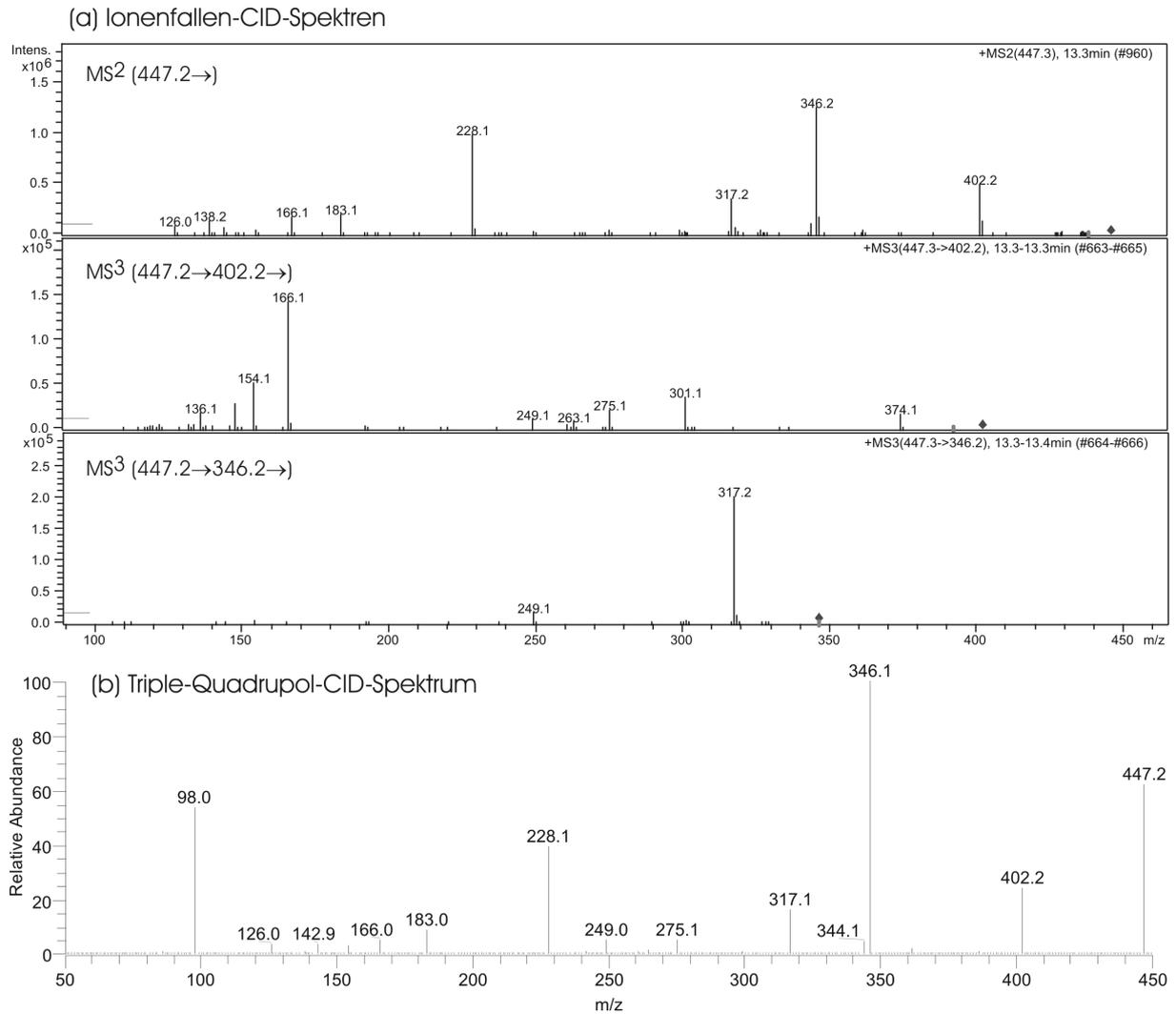


Abb. 4.8: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Mono-OH-M3

9) Mono-OH-M4 (monohydroxyliertes Piritramid, Peak 4)

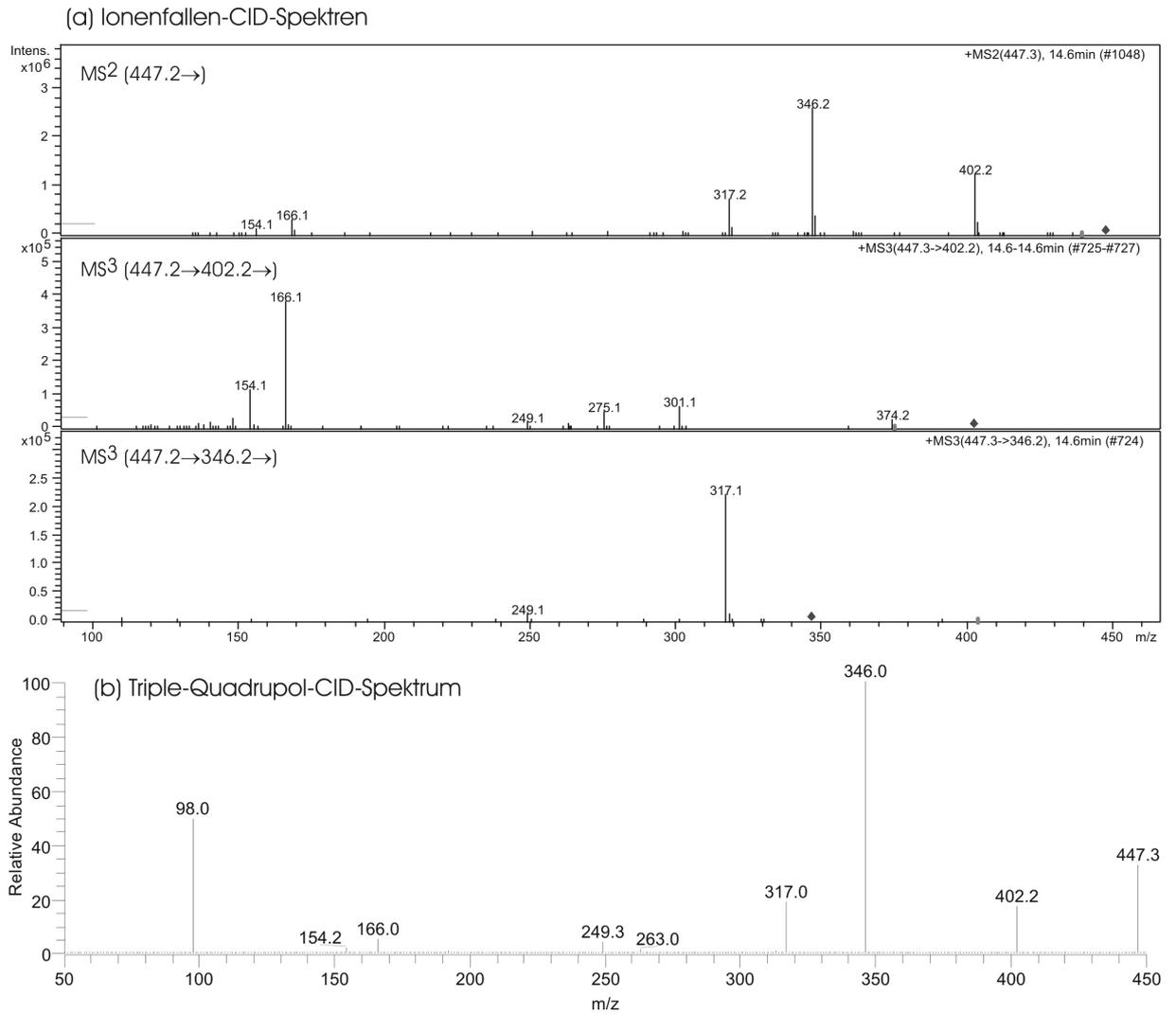
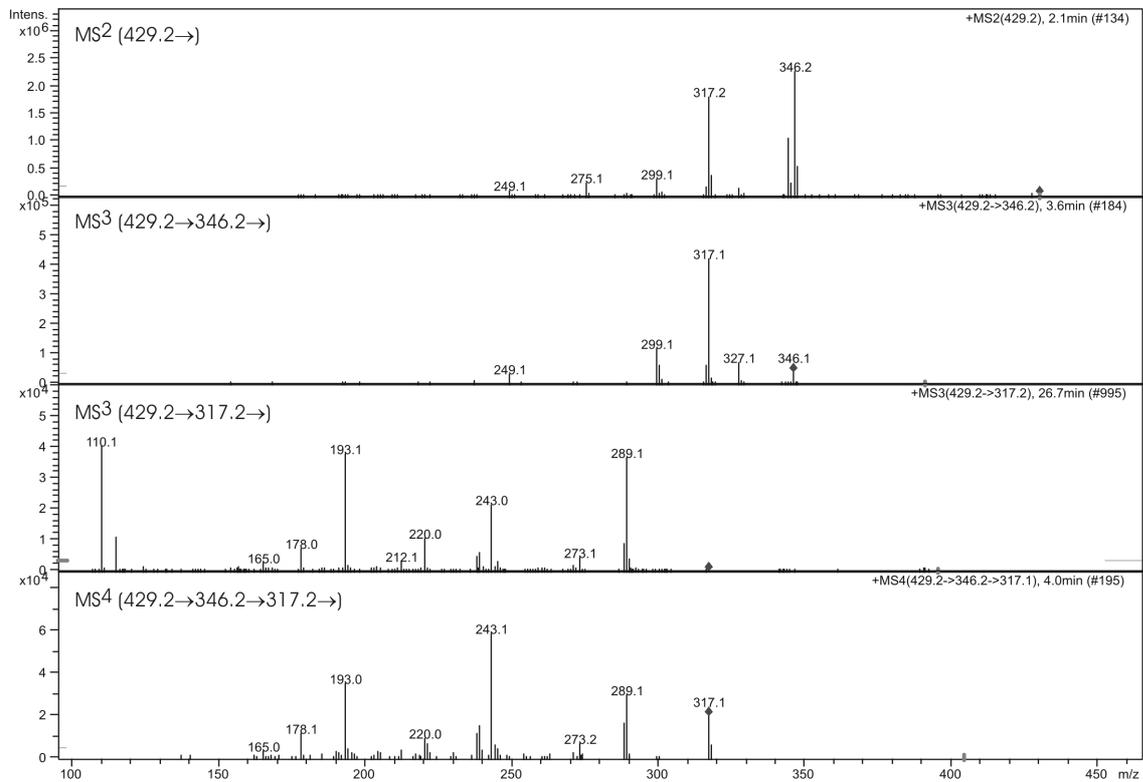


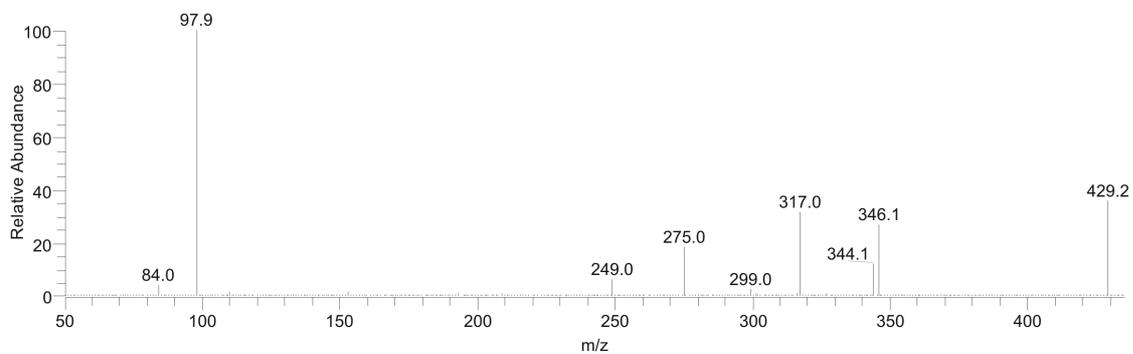
Abb. 4.9: Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-CID-MS-Spektren von Mono-OH-M4

10) Dehydro-M1 (dehydrogeniertes Piritramid)

(a) Ionenfallen-CID-Spektren



(b) Triple-Quadrupol-CID-Spektrum



(c) FT-MS-Spektrum

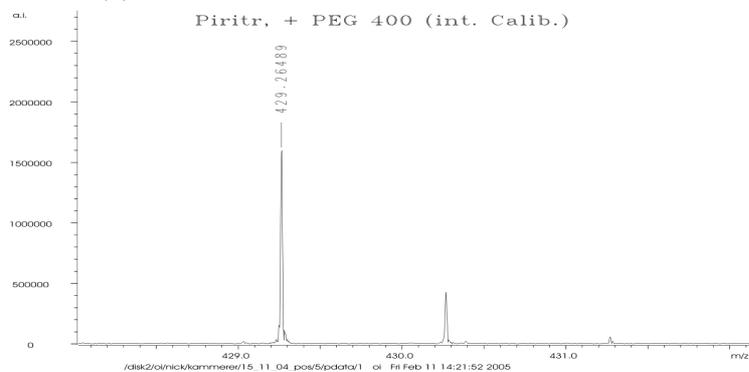


Abb. 4.10: Ionenfallen-, Triple-Quadrupol-CID-MS- und FT-MS-Spektren von Dehydro-Piritramid (Dehydro-M1)

5 Literatur

- [1] Abian J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 1999; 34(3): 157-68
- [2] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 1985; 57(3): 675-9
- [3] Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.). *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998: 348-68
- [4] Gross JH. *Mass Spectrometry - A Textbook*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004
- [5] de Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. 2. Aufl.; Chichester: John Wiley, 2003
- [6] Marquet P. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther Drug Monit* 2002; 24(2): 255-76
- [7] Muck W. Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Pharmazie* 1999; 54(9): 639-44
- [8] Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Aufl.; Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 485-8
- [9] Hoffman-La-Roche AG. Fachinformation Marcumar. 2004: 1-4
- [10] O'Reilly RA. Vergleich der klinischen Pharmakologie von Warfarin mit Phenprocoumon. *Hämostaseologie* 1997; 17: 145-8
- [11] Sadler JE. Medicine: K is for koagulation. *Nature* 2004; 427(6974): 493-4
- [12] Matzdorff A, Kemkes-Matthes B. Pharmakologie oraler Antikoagulationen. *Hämostaseologie* 1997; 17: 149-52
- [13] O'Reilly RA, Trager WF. Anticoagulant Drugs. In: Smith DF, eds. *Handbook of Stereoisomers: Therapeutic Drugs*. Ed. Boca Raton: CRC Press, 1989: 126-36
- [14] Jaehnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Groth U, Martini A. The enantiomers of phenprocoumon: Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Clin Pharmacol Ther* 1976; 20(3): 342-9
- [15] Lewis RJ, Trager WF. Warfarin metabolism in man: identification of metabolites in urine. *J Clin Invest* 1970; 49(5): 907-13
- [16] Trager WF, Lewis RJ, Garland WA. Mass spectral analysis in the identification of human metabolites of warfarin. *J Med Chem* 1970; 13(6): 1196-204
- [17] Lewis RJ, Trager WF. The metabolic fate of warfarin: studies on the metabolites in plasma. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 179:205-12.: 205-12
- [18] Toon S, Heimark LD, Trager WF, O'Reilly RA. Metabolic Fate of Phenprocoumon in Humans. *J Pharma Sci* 1985; 74(10): 1037-40

- [19] He M, Korzekwa KR, Jones JP, Rettie AE, Trager WF. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9. *Arch Biochem Biophys* 1999; 372(1): 16-28
- [20] Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(11): 1284-90
- [21] Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* 1997; 73(1): 67-74
- [22] Yamazaki H, Shimada T. Human Liver Cytochrome P450 Enzymes involved in the 7-Hydroxylation of R- and S-Warfarin Enantiomers. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1195-203
- [23] Wienkers LC, Wurden CJ, Storch E, Kunze KL et al. Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug Metab Dispos* 1996; 24(5): 610-4
- [24] Hermida J, Zarza J, Alberca I, Montes R et al. Differential effects of 2C9*3 and 2C9*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocoumarol. *Blood* 2002; 99(11): 4237-9
- [25] Tassies D, Freire C, Pijoan J, Maragall S et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica* 2002; 87(11): 1185-91
- [26] Thijssen HH, Verkooijen IW, Frank HL. The possession of the CYP2C9*3 allele is associated with low dose requirement of acenocoumarol. *pharmacogenetics* 2000; 10(8): 757-60
- [27] Thijssen HH, Driittij MJ, Vervoort LM, Vries-Hanje JC. Altered pharmacokinetics of R- and S-acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9*3. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70(3): 292-8
- [28] Verstuyft C, Morin S, Robert A, Lorient MA et al. Early acenocoumarol overanticoagulation among cytochrome P450 2C9 poor metabolizers. *pharmacogenetics* 2001; 11(8): 735-7
- [29] Ufer M, Svensson JO, Krausz KW, Gelboin HV et al. Identification of cytochromes P450 2C9 and 3A4 as the major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60(3): 173-82
- [30] Yasar U, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I et al. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254(3): 628-31
- [31] Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(3): 198-203
- [32] Verstuyft C, Robert A, Morin S, Lorient MA et al. Genetic and environmental risk factors for oral anticoagulant overdose. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 58(11): 739-45

- [33] Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; 96(5): 1816-9
- [34] Kirchheiner J, Ufer M, Walter EC, Kammerer B et al. Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers. *pharmacogenetics* 2004; 14(1): 19-26
- [35] De Wolff FA, Van Kempen MJ. Determination of Phenprocoumon, an anticoagulant, in human plasma. *Clin Chem* 1976; 22(10): 1575-8
- [36] Haefelfinger P. A specific and sensitive method for the determination of the anticoagulant phenprocoumon in plasma. *J Chromatogr* 1979; 162: 215-22
- [37] Haustein KO, Hüller G. Pharmacokinetics of phenprocoumon. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1994; 32(4): 192-7
- [38] De Vries JX, Völker U. Determination of the plasma protein binding of the coumarin anticoagulants phenprocoumon and its metabolites, warfarin and acenocoumarol, by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990; 529(2): 479-85
- [39] Petersen D, Barthels M, Schumann G, Buttner J. Concentrations of phenprocoumon in serum and serum water determined by high-performance liquid chromatography in patients on oral anticoagulant therapy. *Haemostasis* 1993; 23(2): 83-90
- [40] De Vries JX, Schmitz-Kummer E. Determination of the coumarin anticoagulant phenprocoumon and metabolites in human plasma, urine and breast milk by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 1994; 655: 63-71
- [41] De Vries JX, Völker U. Separation of the enantiomers of phenprocoumon and warfarin by high-performance liquid chromatography using a chiral stationary phase - Determination of the enantiomeric ratio of phenprocoumon in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1989; 493: 149-56
- [42] De Vries JX, Schmitz-Kummer E. Direct column liquid chromatographic enantiomer separation of the coumarin anticoagulants phenprocoumon, warfarin, acenocoumarol and metabolites on an α 1-acid glycoprotein chiral stationary phase. *J Chromatogr* 1993; 644: 315-20
- [43] De Vries JX, Simon M, Zimmermann R, Harenberg J. Identification of phenprocoumon metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1985; 338: 325-34
- [44] Edelbroek P, Van Kempen MJ, Helsing TJ, De Wolff FA. Analysis of phenprocoumon and its hydroxylated and conjugated metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr* 1990; (530): 347-58
- [45] De Vries JX, Harenberg J, Walter E, Zimmermann R, Simon M. Determination of the anticoagulant phenprocoumon in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1982; 231: 83-92
- [46] Rentsch KM, Gutteck-Amsler U, Bühner R, Fattinger KE, Vonderschmitt DJ. Sensitive stereospecific determination of acenocoumarol and phenprocoumon in

- plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2000; 742: 131-42
- [47] Heimark LD, Trager WF. A stable isotope assay for phenprocoumon and its metabolites. *Biomed Mass Spectrom* 1985; 12(2): 67-71
- [48] Ufer M, Kammerer B, Kirchheiner J, Rane A, Svensson JO. Determination of phenprocoumon, warfarin and their monohydroxylated metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 809(2): 217-26
- [49] Kollroser M, Schober C. Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by hplc-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *Clin Chem* 2002; 48(1): 84-91
- [50] De Vries JX, Kymber KA. Thermospray and particle beam liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of coumarin anticoagulants. *J Chromatogr* 1991; 562: 31-8
- [51] Chankvetadze B, Burjandze N, Blaschke G. Enantioseparation of the anticoagulant drug phenprocoumon in capillary electrophoresis with UV and laser-induced fluorescence detection and application of the method to urine samples. *Electrophoresis* 2001; 22: 3281-5
- [52] D'Hulst A, Verbeke N. Separation of the Enantiomers of Coumarinic Anticoagulant Drugs by Capillary Electrophoresis Using Maltodextrins as Chiral Modifiers. *Chirality* 1994; 6: 225-9
- [53] Kammerer B, Kahlich R, Ufer M, Laufer S, Gleiter CH. Determination of (R)- and (S)-phenprocoumon in human plasma by enantioselective liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18(4): 458-64
- [54] McAleer SD, Chrystyn H, Foondun AS. Measurement of the (R)- and (S)-isomers of warfarin in patients undergoing anticoagulant therapy. *Chirality* 1992; 4: 488-93
- [55] Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *pharmacogenetics* 1994; 4(1): 39-42
- [56] Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333(2): 447-58
- [57] Veronese ME, Doecke CJ, Mackenzie PI, McManus ME et al. Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochem J* 1993; 289(Pt 2): 533-8
- [58] Kirchheiner J, Bauer S, Meineke I, Rohde W et al. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *pharmacogenetics* 2002; 12(2): 101-9

- [59] Brockmoller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000; 1: 125-51
- [60] Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(8): 587-603
- [61] Steffensen FH, Kristensen K, Ejlersen E, Dahlerup JF, Sorensen HT. Major haemorrhagic complications during oral anticoagulant therapy in a Danish population-based cohort. *J Intern Med* 1997; 242(6): 497-503
- [62] Hummers-Pradier E, Hess S, Adham IM, Papke T et al. Determination of bleeding risk using genetic markers in patients taking phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59(3): 213-9
- [63] Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537-41
- [64] Daly AK, Aithal GP. Genetic regulation of warfarin metabolism and response. *Semin Vasc Med* 2003; 3(3): 231-8
- [65] Daly AK, King BP. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *pharmacogenetics* 2003; 13: 247-52
- [66] Haustein KO. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral anticoagulants, especially phenprocoumon. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25(1): 5-11
- [67] Diaz-Perez MJ, Chen JC, Aubry AF, Wainer IW. The direct determination of the enantiomers of ketorolac and parahydroxyketorolac in plasma and urine using enantioselective liquid chromatography on a human serum albumin-based chiral stationary phase. *Chirality* 1994; 6(4): 283-5
- [68] Zagrobelny J, Matuszewski BK, Kline WF, Vincent SH. Separation of the four stereoisomers of a potent inhibitor (L-694,458) of human leukocyte elastase and its determination in human plasma using achiral/chiral chromatography with column switching. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17(6-7): 1057-64
- [69] Iredale J, Wainer IW. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992; 573(2): 253-8
- [70] Clark BJ, Hamdi A, Berrisford RG, Sabanathan S, Mearns AJ. Reversed-phase and chiral high-performance liquid chromatographic assay of bupivacaine and its enantiomers in clinical samples after continuous extraplural infusion. *J Chromatogr* 1991; 553(1-2): 383-90
- [71] Gimenez F, Farinotti R, Thuillier A, Hazebroucq G, Wainer IW. Determination of the enantiomers of mefloquine in plasma and whole blood using a coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatographic system. *J Chromatogr* 1990; 529(2): 339-46
- [72] De Vries JX, Zimmermann R, Harenberg J. Phenprocoumon Metabolites in Human Plasma; Characterization by HPLC and GC-MS. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 29: 591-4
- [73] Haddock RE, Trager WF. Biotransformation of Phenprocoumon in the Rat. *J Med Chem* 1975; 18(5): 519-23

- [74] Abraham DJ (Hrsg). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Volume 2 – Chapter 13: Principles of Drug Metabolism. 6. Aufl.; Wiley-Interscience, 2003
- [75] Ufer M, Kammerer B, Kahlich R, Kirchheiner J et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-hydroxylation in vitro and in vivo. *Xenobiotica* 2004; 34(9): 847-59
- [76] Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(3): 825-31
- [77] Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(3): 268-73
- [78] Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52(4): 349-55
- [79] Rodman T, Pastor BH, Resnick ME. Phenprocoumon, Diphenadione, Warfarin and Bishydroxycoumarin: A Comparative Study. *Am J Med Sci* 1964; 247:655-60.: 655-60
- [80] Harenberg J, Staiger C, De Vries JX, Walter E et al. Cimetidine does not increase the anticoagulant effect of phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 14(2): 292-3
- [81] Harenberg J, Zimmermann R, Staiger C, De Vries JX et al. Lack of effect of cimetidine on action of phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol* 1982; 23(4): 365-7
- [82] Court MH, Duan SX, Guillemette C, Journault K et al. Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos* 2002; 30(11): 1257-65
- [83] Jager W, Mayer M, Platzer P, Reznicek G et al. Stereoselective metabolism of the monoterpene carvone by rat and human liver microsomes. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52(2): 191-7
- [84] Zhang M, Fawcett JP, Kennedy JM, Shaw JP. Stereoselective glucuronidation of formoterol by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49(2): 152-7
- [85] Wilson AA, Wang J, Koch P, Walle T. Stereoselective sulphate conjugation of fenoterol by human phenolsulphotransferases. *Xenobiotica* 1997; 27(11): 1147-54
- [86] De Vries JX, Simon M, Völker U, Walter-Sack I et al. Comparative plasma disposition and anticoagulant activities of racemic phenprocoumon and its metabolites in rats. *Haemostasis* 1993; 23(1): 13-8
- [87] Lewis RJ, Trager WF, Robinson AJ, Chan KK. Warfarin metabolites: the anticoagulant activity and pharmacology of warfarin alcohols. *J Lab Clin Med* 1973; 81(6): 925-31
- [88] Kumar N, Rowbotham DJ. Piritramide (editorial). *Br J Anaesth* 1999; 82(1): 3-5
- [89] Morlion B, Ebner E, Weber A, Finke W, Puchstein C. Influence of bolus size on efficacy of postoperative patient-controlled analgesia with piritramide. *Br J Anaesth* 1999; 82: 52-5

- [90] Petrat G, Klein U, Meißner W. On-demand analgesia with piritramide in children - a study on dosage specification and safety. *Eur J Pediatr Surg* 1997; 7: 38-41
- [91] Kietzmann D, Briede I, Bouillon T, Gundert-Remy U, Kettler D. Pharmacokinetics of piritramide after an intravenous bolus in surgical patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 41: 898-903
- [92] Bouillon T, Kietzmann D, Port R, Meinecke I, Hoeft A. Population pharmacokinetics of piritramide in surgical patients. *Anaesthesiology* 1999; 90: 7-15
- [93] Janssen-Cilag AG. Fachinformation Dipidolor. 2000: 1-2
- [94] Wiesner G, Gruber M, Wild K, Hoerauf K, Taeger K. Protein binding of piritramide: influence of various protein concentrations and the postoperative acute phase response. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 54: 843-5
- [95] Michaelis HC, Kietzmann D, Neurath H, Jongepier U, Schilling B. Sensitive determination of piritramide in human plasma by gas chromatography. *J Chromatogr* 1991; 571: 257-62
- [96] Michaelis HC, Kietzmann D, Kahl GF. Sensitive determination of piritramide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 1991; 14(18): 3439-45
- [97] Misztal G. Piritramide determination in serum by high-performance liquid chromatography. *Acta Pol Pharm* 1991; 48(5-6): 1-2
- [98] Martens-Lobenhoffer J, Romhild W. Quantitative determination of piritramide in human serum applying liquid chromatography-two-stage mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 783(1): 53-9
- [99] Luhmann I, Szathmary SC, Gruner I. Determination of pipamperone in human plasma by high performance liquid chromatography. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 1069-72
- [100] von Bruchhausen F, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U (Hrsg.). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgeband 5: Stoffe L-Z. 5. Aufl.*; Berlin, Heidelberg: Springer, 1999: 254-5
- [101] Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, Mallett DN, Plumb RS. The use of turbulent flow chromatography/mass spectrometry for the rapid, direct analysis of a novel pharmaceutical compound in plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1997; 11(18): 1953-8
- [102] Chiron S, Martinez E, Barcelo D. Online and off-line sample preparation of acidic herbicides and bentazon transformation products in estuarine waters. *J Chromatogr A* 1994; 665(2): 283-93
- [103] de Jong GJ, Jeronimus M, Bruins CHP, van Dongen WD, Ensing K. On-line coupling of SPE with MS for analysis of biosamples, exemplified by the determination of clenbuterol in urine. *Chromatographia* 2000; 52: 25
- [104] Grant RP, Cameron C, Mackenzie-McMurter S. Generic serial and parallel on-line direct-injection using turbulent flow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002; 16(18): 1785-92

- [105] Hopfgartner G, Husser C, Zell M. High-throughput quantification of drugs and their metabolites in biosamples by LC-MS/MS and CE-MS/MS: Possibilities and limitations. *Therapeutic Drug Monitoring* 2002; 24(1): 134-43
- [106] Koal T, Asperger A, Efer J, Engewald W. Simultaneous determination of a wide spectrum of pesticides in water by means of fast on-line SPE-HPLC-MS-MS - a novel approach. *Chromatographia* 2003; 57(Suppl.): S/93-S/101
- [107] Mallet CR, Lu Z, Mazzeo J, Neue U. Analysis of a basic drug by on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a mixed mode sorbent. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002; 16(8): 805-13
- [108] McMahan GP, Kelly MT. Determination of Aspirin and Salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* 1998; 70: 409-14
- [109] Raezke KP. Automated on-line solid-phase extraction. *LaborPraxis* 2000; 24(1): 52-4
- [110] Schellen A, Ooms B, van de Lagemaat D, Vreeken R, van Dongen WD. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J Chromatogr B* 2003; 788(2): 251-9
- [111] Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Use of monolithic supports for fast analysis of drugs and metabolites in plasma by direct injection. *Chromatographia* 2003; 57(9/10): 569-75
- [112] Unger M, Jacobsen W, Holzgrabe U, Benet LZ. Quantitative liquid chromatography-mass spectrometry determination of isatin in urine using automated on-line extraction. *J Chromatogr B* 2002; 767(2): 245-53
- [113] Vidal C, Kirchner GI, Sewing K-F. Fully automated analysis of tacrolimus from blood using online-SPE followed by HPLC/ESI-MS. *Advances in Mass Spectrometry* 1998; 14:
- [114] Zimmer D, Pickard V, Czembor W, Müller C. Turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry for directly injecting raw plasma samples derived from pharmacokinetic studies. *Chromatographia* 2000; 52: 26-7
- [115] Zhang JY, Fast DM, Breau AP. Determination of valdecoxib and its metabolites in human urine by automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 785(1): 123-34
- [116] Derendorf H, Gramatté T, Schäfer HG. *Pharmakokinetik*. 2.Aufl.; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2002
- [117] Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(2): 355-60
- [118] McCarver DG, Hines RN. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(2): 361-6
- [119] Ginsberg G, Hattis D, Miller R, Sonawane B. Pediatric pharmacokinetic data: implications for environmental risk assessment for children. *Pediatrics* 2004; 113(4 Suppl): 973-83

- [120] Strolin BM, Baltes EL. Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17(3): 281-99
- [121] Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978; 6(2): 165-75
- [122] Olkkola KT, Hamunen K, Maunuksela EL. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of opioid analgesics in infants and children. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28(5): 385-404
- [123] Tozuka Z, Kaneko H, Shiraga T, Mitani Y et al. Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap. *J Mass Spectrom* 2003; 38(8): 793-808
- [124] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.: 248-54
- [125] Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U et al. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys* 1996; 331(2): 145-69
- [126] Forrest IS, Bolt AG, Serra MT. "Applejack" concentration of urinary chlorpromazine metabolites: a widely applicable and mild procedure. *Life Sci* 1966; 5(5): 473-9

Auflistung der akademischen Lehrer

Prof. Dr. Klaus T. Wanner	Pharmazeutische Chemie, LMU München
Prof. Dr. Franz Bracher	Pharmazeutische Chemie, LMU München
Prof. Dr. Eberhard Reimann	Pharmazeutische Chemie, LMU München
PD Dr. Franz Paintner	Pharmazeutische Chemie, LMU München
PD Dr. Matthias Lehr	Pharmazeutische Chemie, LMU München
Prof. Dr. Karl Thoma	Pharmazeutische Technologie, LMU München
Prof. Dr. Gerhard Winter	Pharmazeutische Technologie, LMU München
Prof. Dr. Hildebert Wagner	Pharmazeutische Biologie, LMU München
Prof. Dr. Angelika Vollmer	Pharmazeutische Biologie, LMU München
Prof. Dr. M.H. Zenk	Pharmazeutische Biologie, LMU München
Prof. Dr. Horst Domdey	Biochemie, LMU München
Prof. Dr. Burckhard Fichtl	Pharmakologie und Toxikologie, LMU München
Prof. Dr. Martin Biel	Pharmakologie und Toxikologie, LMU München
Prof. Dr. Ines Golly	Pharmakologie und Toxikologie, LMU München
Prof. Dr. Klaus-Otto Schümann	Pharmakologie und Toxikologie, LMU München
Prof. Dr. Dr. Christa Habrich	Geschichte der Pharmazie, LMU München
Prof. Dr. Stefan Laufer	Pharmazeutische Chemie, Universität Tübingen
Prof. Dr. Christoph H. Gleiter	Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Tübingen