

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Möller

**CYP2D6-Phänotypisierung und
Bestimmung des Dextromethorphanmetabolismus
mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Heumüller

aus
Goroka/Papua-Neuguinea

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Ackenheil
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. P. Lohse
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cytochrom P450-Enzyme	1
1.1.1	Entstehung	1
1.1.2	Funktion	2
1.1.3	Nomenklatur	2
1.1.4	CYP1	5
1.1.5	CYP2	5
1.1.6	CYP3	6
1.1.7	Zusammenfassung	7
1.2	Die Alkoholkrankheit	7
1.3	Fragestellung	11
1.3.1	Entwicklung des CYP2D6-Phänotypisierungstests	11
1.3.2	Aufbau der Analysenmethode	12
1.3.3	Untersuchung des Dextromethorphanmetabolismus	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Dextromethorphan	14
2.1.1	Struktur	14
2.1.2	Metabolismus	14
2.1.3	Wirkung	16
2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	17
2.2.1	Das chromatographische Trennprinzip	17
2.2.2	Aussehen und Informationsgehalt eines Chromatogramms	18
2.2.3	RPLC – Vorteile und Besonderheiten	19
2.2.4	Trennung von Dextromethorphan und seiner Metabolite	21
2.3	Die Integration chromatographischer Daten	22
2.4	Experimentelle Arbeiten	25
2.4.1	HPLC – Apparatur und Betriebsbedingungen	25
2.4.2	Optimierung des Trennsystems	31
2.4.3	Optimierung der Detektion	34
2.4.4	Optimierung der Probenaufbereitung	35
2.4.5	Der Dextromethorphan-Phänotypisierungstest	51
2.4.6	Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite	55
2.4.7	Aufarbeitung der Plasmaproben	55
2.4.8	Geräte	57
2.4.9	Chromatographische Auftrennung	57
2.4.10	Berechnung	58
2.4.11	Wiederfindung	58
2.4.12	Bewertung des CYP2D6 – Metabolisierungsstatus	59
2.4.13	Aussage der Spiegelbestimmung	59

3	Ergebnisse	60
3.1	Analyse	60
3.1.1	Dextromethorphan-Phänotypisierungstest	60
3.1.2	Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite	62
3.2	Auswertung des Dextromethorphan-Phänotypisierungstests	65
3.2.1	CYP2D6 – Aktivität	65
3.2.2	CYP3A4 – Aktivität	66
3.3	Auswertung der Spiegelbestimmung	67
3.3.1	Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan und seiner Metabolite	67
3.3.2	DM/DO – Verhältnis im Verlauf	71
3.3.3	DO/HM – Verhältnis im Verlauf	72
4	Diskussion	74
4.1	Dextromethorphan-Phänotypisierungstest	74
4.1.1	CYP2D6 – Aktivität	74
4.1.2	CYP3A4 – Aktivität	74
4.2	Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite	75
4.2.1	Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan und seiner Metabolite	75
4.2.2	DM/DO – Verhältnis im Verlauf	77
4.2.3	DO/HM – Verhältnis im Verlauf	78
4.2.4	CYP2D6-Phänotypisierung	78
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	82
	Anhang:	
	Danksagung	89
	Lebenslauf	91

1 Einleitung

1.1 Cytochrom P450-Enzyme

1.1.1 Entstehung

Cytochrom-Enzyme der Reihe P450 beschreiben eine Klasse von Häm-haltigen Proteinen, welche für ihre katalytische Aktivität sowohl Sauerstoff, als auch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat benötigen.¹ Die P450-Superfamilie besitzt einen sehr alten Stammbaum. Es wird angenommen, dass das Urgen bereits vor der Auftrennung der Organismen in Prokaryonten und Eukaryonten vor über 3.5 Billionen Jahren existierte.² Das Vorkommen der P450-Enzyme in beiden Organismen mag den Umstand erklären, dass heute die P450-Enzyme der Mammalier sowohl in den Mitochondrien als auch im mikrosomalen Enzym-Pool vorkommen. Die Funktion der frühen Enzyme beinhaltete wahrscheinlich den Erhalt der Membranintegrität, die Bereitstellung von Zugangswegen zu neuen Energiequellen,³ und später auch die Rolle in der Aufrechterhaltung von steady-state-Niveaus endogener Liganden, die an Wachstum und Entwicklung beteiligt sind.⁴ Die Expansion isozymaler Formen innerhalb der Eukaryonten während der letzten 800 Millionen Jahre wurde auch schon als eine Form der Kriegsführung zwischen Pflanzen und Tieren bezeichnet.⁵ Als die Tiere anfangen, sich zu differenzieren und Pflanzen zu fressen, entwickelten jene Toxine, die sie weniger schmackhaft machen sollten. Daraufhin wurden wiederum neue Formen der P450-Enzyme kreiert, um diese Pflanzenprodukte abbauen zu können.⁶ Nebenbei gesagt sind viele unserer heutigen Pharmazeutika Abkömmlinge gerade dieser giftigen Pflanzenprodukte von damals.

1.1.2 Funktion

Die mikrosomalen P450-Cytochrome sind im glatten endoplasmatischen Retikulum überwiegend der Leber ansässig. Im Prozess des oxidativen Pharmakametabolismus sind sie für die Umwandlung des Hauptanteils der lipophilen Substanzen in hydrophilere Substanzen verantwortlich, die somit besser ausgeschieden werden können. Im Vergleich zu anderen Enzymklassen, ist an den P450-vermittelten Metabolismus ein gewisser Grad der Nichtspezifität geknüpft. Das bedeutet, dass ein P450-Enzym verschiedene Substrate umsetzen kann, und einige Substrate von unterschiedlichen P450-Enzymen metabolisiert werden können.

1.1.3 Nomenklatur

Bereits Ende der 80'er Jahre wurde für die P450-Isoenzyme eine Nomenklatur vorgeschlagen.⁷ Die Einteilung der Enzyme in Familien und Subfamilien innerhalb dieses Systems basiert auf der Ähnlichkeit der Gene. Cytochrom P450-Enzyme werden so benannt, dass dem Term CYP eine Zahl folgt, welche die Familie repräsentiert, ein Buchstabe für die Subfamilie und jeweils eine Zahl für das einzelne Enzym.⁸ Zwischen den Familien differieren die Proteinsequenzen im allgemeinen um mehr als 40%. Im Gegensatz dazu repräsentiert jede Subfamilie eine Ansammlung von sehr nahe stehenden Genen, von denen jedes eine fortlaufende Zahl innerhalb der Subfamilie zugeordnet bekommt. Enzyme der Familien CYP1, CYP2 und CYP3 sind die P450-Enzyme mit dem höchsten Anteil an der Metabolisierung von Arzneistoffen.

Tabelle 1 zeigt einige Aspekte dieser Isoenzyme auf

Clinically Used Drugs Metabolized by Cytochrome P450

Substrates

<u>1A2</u>	<u>2C19</u>	<u>2C9</u>	<u>2D6</u>	<u>2E1</u>	<u>3A4,5,7</u>
<u>Clozapine</u>	Proton Pump	NSAIDs:	Beta Blockers:	<u>Acetaminophen</u>	Macrolide
<u>Imipramine</u>	Inhibitors:	<u>Diclofenac</u>	<u>S-metoprolol</u>	<u>Chlorzoxazone</u>	Antibiotics:
<u>Mexillitene</u>	<u>Omeprazole</u>	<u>Ibuprofen</u>	<u>Propafenone</u>	<u>Ethanol</u>	<u>Clarithromycin</u>
<u>Naproxen</u>	<u>lansoprazole</u>	<u>Piroxicam</u>	<u>Timolol</u>		<u>Erythromycin</u>
<u>Riluzole</u>	<u>Pantoprazole</u>				NOT <u>Azithromycin</u>
<u>Tacrine</u>		Oral	Antidepressants:		
<u>Theophylline</u>	Anti-epileptics:	Hypoglycemic	<u>Amitriptyline</u>		Anti-arrhythmics:
	<u>Diazepam</u>	Agents:	<u>Clomipramine</u>		<u>Quinidine</u>
	<u>Phenytoin</u>	<u>Tolbutamide</u>	<u>Desipramine</u>		
	<u>Phenobarbitone</u>	<u>Glipizide</u>	<u>Imipramine</u>		Benzodiazepines:
	<u>Amitriptyline</u>		<u>Paroxetine</u>		<u>Alprazolam</u>
		Angiotensin II			<u>Diazepam</u>
	<u>Cyclophosphamide</u>	Blockers:	Antipsychotics:		<u>Midazolam</u>
	<u>Progesterone</u>	<u>NOT</u> <u>candesartan</u>	<u>Haloperidol</u>		<u>Triazolam</u>
		<u>Irbesartan</u>	<u>Risperidone</u>		
		<u>losartan</u>	<u>Thioridazine</u>		
		NOT <u>valsartan</u>			Immune
			<u>Codeine</u>		Modulators:
		<u>Celecoxib</u>	<u>Dextromethorphan</u>		<u>Cyclosporine</u>
		<u>Fluvastatin</u>	<u>Flecainide</u>		<u>Tacrolimus</u>
		<u>Naproxen</u>	<u>Mexiletine</u>		(FK506)
		<u>Phenytoin</u>	<u>Ondansetron</u>		
		<u>Sulfamethoxazole</u>	<u>Tamoxifen</u>		HIV Protease
		<u>Tamoxifen</u>	<u>Tramadol</u>		Inhibitors:
		<u>Tolbutamide</u>	<u>Venlafaxine</u>		<u>Indinavir</u>
		<u>Torsemide</u>			<u>Ritonavir</u>
		<u>Warfarin</u>			<u>Saquinavir</u>
					Prokinetics:
					<u>Cisapride</u>
					Antihistamines:
					<u>Astemizole</u>
					<u>Chlorpheniramine</u>
					Calcium Channel
					Blockers:
					<u>Amlodipine</u>

				<u>Diltiazem</u> <u>Felodipine</u> <u>Nifedipine</u> <u>Nisoldipine</u> <u>Nitrendipine</u> <u>Verapamil</u> HMG CoA Reductase Inhibitors: <u>Atorvastatin</u> <u>Cerivastatin</u> <u>lovastatin</u> NOT <u>Pravastatin</u> <u>Simvastatin</u> <u>Buspirone</u> <u>Maethadone</u> <u>Pimozide</u> <u>Quinine</u> <u>Sildenafil</u> <u>Tamoxifen</u> <u>Trazodone</u> <u>Vincristine</u>
--	--	--	--	--

Inhibitors(Ki)

<u>1A2</u>	<u>2C19</u>	<u>2C9</u>	<u>2D6</u>	<u>2E1</u>	<u>3A4,5,7</u>
-------------------	--------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-----------------------

<u>Cimetidine</u> <u>Fluoroquinolones</u> <u>Fluvoxamine</u> <u>Ticlopidine</u>	<u>Fluoxetine</u> <u>Fluvoxamine</u> <u>Ketoconazole</u> <u>lansoprazole</u> <u>Omeprazole</u> <u>Ticlopidine</u>	<u>Amiodarone</u> <u>Fluconazole</u> <u>Isoniazid</u> <u>Ticlopidine</u>	<u>Amiodarone</u> <u>Chlorpheniramine</u> <u>Cimetidine</u> <u>Clomipramine</u> <u>Fluoxetine</u> <u>Haloperidol</u> <u>Methadone</u> <u>Mibefradil</u> <u>Paroxetine</u> <u>Quinidine</u> <u>Ritonavir</u>	<u>Disulfiram</u>	HIV Protease Inhibitors: <u>Indinavir</u> <u>Nelfinavir</u> <u>Ritonavir</u> <u>Saquinavir</u> <u>Amiodarone</u> NOT <u>Azithromycin</u> <u>Cimetidine</u> <u>Clarithromycin</u> <u>Erythromycin</u> <u>Fluoxetine</u> <u>Grapefruit Juice</u> <u>Itraconazole</u> <u>Ketoconazole</u> <u>Mibefradil</u> <u>Nefazodone</u> <u>Troleandomycin</u>
--	--	---	---	-------------------	---

Inducers

<u>1A2</u>	<u>2C19</u>	<u>2C9</u>	<u>2D6</u>	<u>2E1</u>	<u>3A4,5,7</u>
<u>Tobacco</u>		<u>Rifampin</u> <u>Secobarbital</u>		<u>Ethanol</u> <u>Isoniazid</u>	<u>Carbamazepin</u> <u>Phenobarbital</u> <u>Phenytoin</u> <u>Rifabutin</u> <u>Rifampin</u> <u>St. John's wort</u> <u>Troglitazone</u>

Source: <http://medicine.iupui.edu/flockhart/clinlist.html> Updated: 02/01/2002

1.1.4 CYP1

Die CYP1-Familie hat nur eine Subfamilie, CYP1A. Beim Menschen beinhaltet diese Subfamilie CYP1A1 und CYP1A2. Beide sind für die Aktivierung zahlreicher Promutagene und Procarcinogene verantwortlich.⁹ Die Induktion von CYP1A bei Rauchern erklärt ihre schnellere Coffein-Clearance im Vergleich zu Nichtrauchern.¹⁰

1.1.5 CYP2

Die CYP2-Familie wird in der Leber von nicht weniger als fünf Subfamilien vertreten. Die Subfamilien CYP2A und CYP2B wurden noch nicht im Detail untersucht. Die CYP2C-Subfamilie umfasst wenigstens sieben Gene.¹¹ Die Gene für CYP2C9 und CYP2C10 unterscheiden sich nur in zwei Basen ihrer codierten Region, teilen sich viele ihrer Substrate und werden oft als CYP2C9/10 zusammengefasst. Ein anderes wichtiges

Mitglied der CYP2C-Subfamilie ist das genetisch polymorph vererbte (S)-Mephenytoin-Hydroxylase-CYP2C19. CYP2E1 ist der einzige, aber hoch geschätzte Vertreter der CYP2E-Familie, und steht für das mikrosomale Alkohol-Oxidations-System.¹²

CYP2D6 ist vielleicht das best bekannte oder am meisten erforschte der mikrosomalen P450-Enzyme, trotz seines relativ geringen Vorkommens in der Leber. Es ist die Ursache für den polymorphen Metabolismus von Debrisoquin und Spartein. Andere Charakteristika dieses Enzyms sind die relative Resistenz gegenüber Induktion,¹³ die Eigenschaft schon bei klinisch relevanten Konzentrationen einiger Substrate abgesättigt zu sein,^{14 15 16 17} Stereoselektivität in Abhängigkeit einiger Substrate (z.B. Propranolol)¹⁸, Produkte (z.B. Debrisoquine)¹⁹, oder Inhibitoren (z.B. Quinidine/Quinine)²⁰. Substrate von CYP2D6 sind eine Reihe kardiovaskulärer Medikamente, neuroaktiver Substanzen wie Neuroleptika, tricyclische Antidepressiva und Monoxidasehemmstoffe, und die Morphinderivate Codein und Dextromethorphan.²¹

1.1.6 CYP3

Die größte Fraktion der P450-Enzyme der Leber bilden die Mitglieder der CYP3A-Subfamilie, überwiegend CYP3A3 und CYP3A4, welche zu 99% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen, immunhistochemisch nicht unterscheidbar sind²², und keinen bekannten Unterschied in ihrer katalytischen Aktivität besitzen.²³ CYP3A5 wurde nur bei etwa 30% der Bevölkerung in der Leber nachgewiesen und ist in seiner metabolischen Kapazität weit mehr eingeschränkt als CYP3A4.²⁴ Sein häufiges Vorkommen im Nierengewebe könnte Analysen zum Arzneistoffmetabolismus im Urin erschweren.²⁵ Charakteristika der CYP3A-Subfamilie sind Induzierbarkeit²⁶,

Expression in klinisch relevanten extrahepatischen Geweben^{27 28}, Beteiligung am Metabolismus endogener Steroide^{29 30}, und die Fähigkeit verstärkte Enzymaktivität in der Anwesenheit von Flavonoiden und einiger Substrate zu entfalten.³¹

1.1.7 Zusammenfassung

Die Aktivität all dieser Enzyme variiert zwischen einzelnen Individuen und ethnischen Gruppen. Eine Reihe von Genen, die für CYP-Enzyme codieren, besitzen unterschiedliche Allele aufgrund von Mutation. Die Existenz dieser Allele in wenigstens 1% der Bevölkerung wird als genetischer Polymorphismus bezeichnet.³² Einzelne Genmutationen im Sinne von Genotypen können durch DNA-Analysen identifiziert werden. Genetischer Polymorphismus hat die Expression von Enzymen zur Folge, die funktionell entweder normal, abnormal oder inaktiv sind.

1.2 Die Alkoholkrankheit

Die Alkoholkrankheit ist das sozialmedizinische Problem Nummer 1. Durch Fehlzeiten am Arbeitsplatz, verringerte Arbeitsleistung, alkoholbedingte Verkehrs- und Betriebsunfälle sowie direkte und indirekte Krankheits- und Behandlungskosten (Produktionsausfall, Invalidität, Frühberentung) entstehen für Staat und Gesellschaft schwere wirtschaftliche Belastungen von jährlich rund 80 Milliarden DM. Etwa die Hälfte aller Straftaten wird unter Alkoholeinfluss verübt. Wegen Alkohol am Steuer werden in Deutschland jährlich ca. 280 000 Führerscheine eingezogen. Kaum abschätzbar sind die negativen Folgen für Individuum und Familie. Das persönliche Leid der Betroffenen und ihrer Angehörigen ist nicht in Zahlen fassbar.

Nach Felduntersuchungen sind etwa 3 bis 5% der Gesamtbevölkerung alkoholabhängig. Gemäss der Statistik der Deutschen Hauptstelle gegen die Suchtgefahren (DHS) leben bundesweit ca. 2,5 bis 3 Millionen Alkohol Kranke, davon etwa 500 000 Kinder und Jugendliche von 12 bis 21 Jahren. Hinzu kommt eine schwer zu ermittelnde Dunkelziffer. Männer sind häufiger alkoholkrank als Frauen, wenngleich bei diesen ebenso wie bei Jugendlichen eine deutlich zunehmende Tendenz besteht. Die Zahl der Abhängigen korreliert mit dem Pro-Kopf-Verbrauch von Alkohol. (Abbildung 1.1)

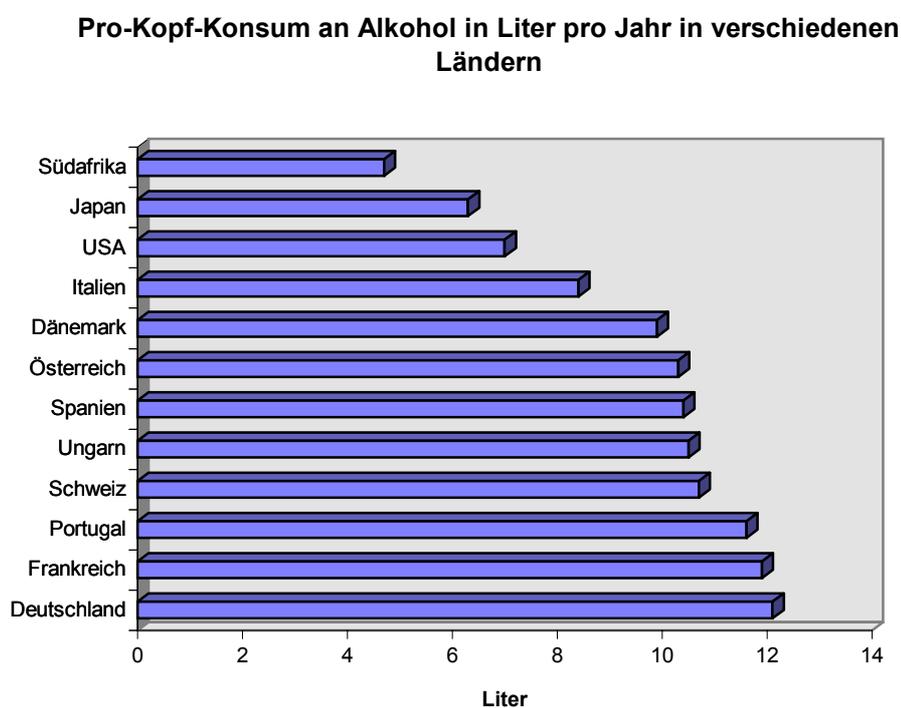


Abb. 1.1

In psychiatrischen Landeskrankenhäusern stellen Alkohol Kranke die größte Patientengruppe (bei männlichen Patienten 30 bis 40% der Gesamtklientel); dominierende Altersgruppe sind die 25- bis 55-jährigen. Ergänzend ist zu berücksichtigen, dass auf jeden Alkoholkranken mindestens zwei Mitbetroffene kommen: Partner, Eltern, Geschwister, Kinder, Freunde, die häufig als „Co-Alkoholiker“ fungieren.

Die Lebenserwartung von Alkoholikern ist im Vergleich zur Bevölkerung um ca. 15% (=10 Jahre) reduziert. Mehr als 40 000 Menschen sterben in Deutschland jährlich an den Folgen des Alkoholkonsums.

Der Alkoholismus hat eine multifaktorielle Genese: Die Wirkung der Droge Alkohol, individuelle Faktoren, das soziale Umfeld sowie aktuelle Situationen können zum Alkoholmissbrauch und zur Abhängigkeit führen. (Abbildung 1.2)³³

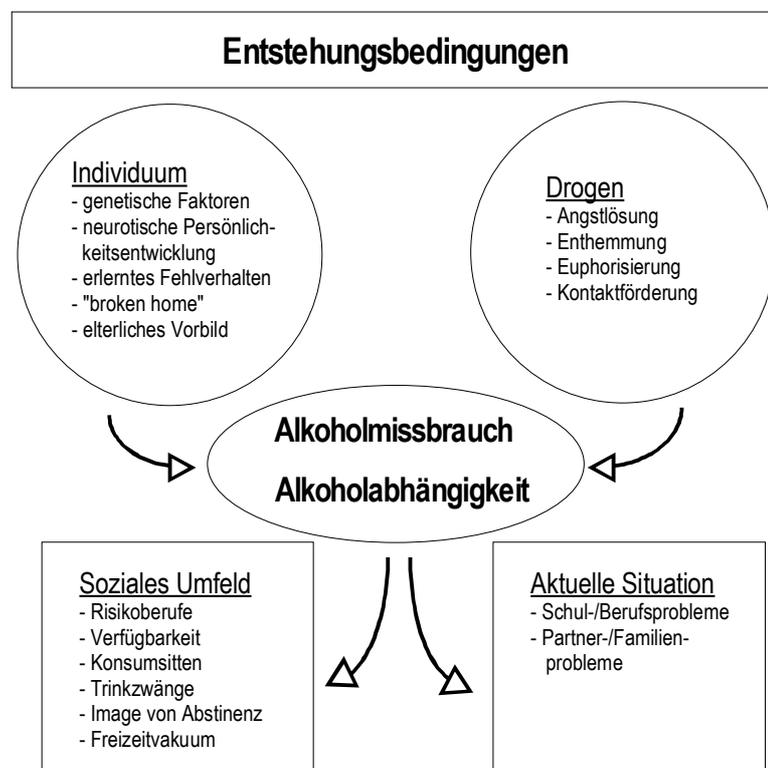


Abb. 1.2 Entstehung des Alkoholismus

Veränderungen in der glutamatergen Neurotransmission werden für eine Reihe von psychiatrischen Erkrankungen, wie Suchterkrankungen, Schizophrenie und neurodegenerativen Krankheiten verantwortlich gemacht.

Neurobiologische Untersuchungen zum Alkoholismus zeigen, dass einige der akuten und chronischen Wirkungen von Alkohol über die exzitatorisch wirkende Aminosäure Glutamat vermittelt werden und dass bei Alkoholkranken eine Dysfunktion in einigen Glutamatabhängigen Rezeptorsystemen vorherrscht.³⁴

Alkohol selbst inhibiert die Aktivität des NMDA-Rezeptors und reduziert die NMDA-stimulierenden Ionenströme in Abhängigkeit der Alkoholkonzentration. Eine Dysfunktion der glutamatergen Neurotransmission ist die Ursache der neuronalen Hyperexcitabilität, die zum Beispiel zu Krampfanfällen und zum Delirium tremens führt. Langjähriger Alkoholmissbrauch erhöht die NMDA-Rezeptordichte, die Bindungsaffinität und erzeugt eine Kreuztoleranz mit anderen non-kompetitiven NMDA-Antagonisten.^{35 36 37 38}

Im Verständnis der Grundlagen der Alkoholabhängigkeit und anderen Substanzen mit Suchtpotential, nimmt das glutamaterge NMDA-Rezeptorsystem (N-methyl-D-aspartate-receptor) eine zunehmend zentrale Bedeutung ein.

1.3 Fragestellung

1.3.1 Entwicklung des CYP2D6-Phänotypisierungstests

Die Aktivität der CYP-Enzyme kann sowohl mittels in-vitro als auch in-vivo Techniken ermittelt werden.

In-vivo kann die Aktivität der CYP-Enzyme durch den Einsatz von standardisierten Phänotypisierungsverfahren ermittelt werden. Das Phänotypisieren erfolgt durch die Verabreichung einer Testsubstanz, das Gewinnen und Analysieren von Blut- oder Urinproben, und das Errechnen eines Index der Enzymaktivität, basierend auf dem Verhältnis von verabreichtem Wirkstoff zu verstoffwechseltem Metabolit durch das jeweilige Enzym.

Da der Abbau des Dextromethorphan über das Cytochrom P450 Enzymsystem der Leber genetisch variabel schnell oder sehr langsam erfolgt, musste ein Test entwickelt werden, mit dem auf einfache Weise und einer möglichst geringen Dosis von Dextromethorphan der Metabolisierungstyp eines Menschen für diese Substanz zu ermitteln ist.

1.3.2 Aufbau der Analysenmethode

Zur Analyse der Testdroge Dextromethorphan und seiner Abbauprodukte Dextrophan, Methoxymorphinan und Hydroxymorphinan wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Anlehnung an die im Neurochemischen Labor für Antidepressiva bereits etablierte Analysenmethode gewählt und aufgebaut.

1.3.3 Untersuchung des Dextromethorphanmetabolismus bei Alkoholkranken und Nicht-Alkoholkranken

In den meisten Studien am Menschen zur Untersuchung der Glutamat-Rezeptorfunktion in psychiatrischen Erkrankungen werden non-kompetitive NMDA-Antagonisten wie Pentachlorphenol (PCP) oder Ketamin eingesetzt.^{40 41 42}

Der non-kompetitive NMDA-Antagonist Dextromethorphan und sein Hauptmetabolit Dextrorphan, ebenso ein NMDA-Antagonist, könnten in neuropharmakologischen Untersuchungen am Menschen bevorzugt Verwendung finden.

Dextromethorphan ist ein spezifischer non-kompetitiver Antagonist mit einer Bindungsaffinität am Ionenkanal des NMDA-Rezeptorkomplex von K_i (nM) 3500. Sein Metabolit Dextrorphan hat eine K_i (nM) von 222. Im Vergleich hierzu haben PCP eine K_i von 42, Memantine eine K_i von 540 und Amantadine eine K_i von 10500.

Dextromethorphan wird über den Gastrointestinaltrakt rasch aufgenommen, in der Leber über das Cytochrom P450-Enzymsystem metabolisiert und über die Niere ausgeschieden.

Seit über 40 Jahren wird Dextromethorphan als ein sogenanntes „over-the-counter“-Antitussivum weltweit verwendet. Es hat eine sehr hohe therapeutische Breite und ein Missbrauch ist praktisch nicht beschrieben.

Somit bietet sich der Einsatz von Dextromethorphan in klinischen Untersuchungen mit Suchtkranken geradezu an.

Dextromethorphan als non-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist wird in dieser Arbeit als Testsubstanz zur Phänotypisierung von CYP2D6 und CYP3A4 bei Alkoholkranken und Nicht-Alkoholkranken verwendet.

In der Literatur gibt es Untersuchungen, die Dextromethorphan einen neuroprotektiven Effekt zuweisen.⁴³ Außerdem wird Dextromethorphan unter anderem in Untersuchungen zur Schmerztherapie, im Opiatentzug und als Anticraving-Mittel eingesetzt.^{44 45 46} Untersuchungen zum Metabolismus von Dextromethorphan bei Alkoholkranken sind bis dato ein Novum.

Die in dieser Arbeit analysierten Proben zum Dextromethorphanmetabolismus bei Alkoholkranken und Nicht-Alkoholkranken stammen aus einer doppelblinden Placebo-kontrollierten Studie, welche die Effekte einer einmaligen Gabe des non-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten Dextromethorphan auf die subjektive Befindlichkeit, insbesondere auf Craving und alkoholartige Intoxikation, sowie parallel die Einflüsse auf Verhaltensparameter, physiologische Parameter und neurochemische Parameter untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Dextromethorphan

2.1.1 Struktur

Dextromethorphan (3-Methoxy-17-Methylmorphinan) ist ein weitverbreitetes, gut wirksames, nicht narkotisch wirkendes und frei verkäufliches Antitussivum, zum Beispiel WICK[®] Formel 44 Plus Hustenpastillen S entsprechend 7,33 mg pro Pastille, TUSS Hustenstiller Saft RENTSCHLER[®] entsprechend 3,664 mg pro 5 ml, Hustenstiller RATIOPHARM[®] Kapseln entsprechend 21,986 mg pro Kapsel. Wie Codein ist Dextromethorphan ein Morphinderivat.

Nach oraler Applikation wird es rasch zu Dextrorphan (3-Hydroxy-17-Methylmorphinan), 3-Hydroxymorphinan und 3-Methoxymorphinan metabolisiert.

2.1.2 Metabolismus

An menschlichen Lebermikrosomen wurde untersucht, dass Dextromethorphan über die Cytochrom P450-Enzyme CYP2D6 und Vertreter der CYP3A-Familie metabolisiert wird. CYP2D6 vermittelt die O-Demethylierung des Dextromethorphan zu Dextrorphan. CYP3A-Enzyme katalysieren die N-Demethylierung des Dextromethorphan zu 3-Methoxymorphinan. Sehr wichtig dabei ist, dass Dextrorphan nicht über CYP3A und 3-Methoxymorphinan nicht über CYP2D6 gebildet werden können. Sowohl Dextrorphan als auch 3-Methoxymorphinan werden weiter zu 3-Hydroxymorphinan demethyliert. Der sekundäre Metabolit 3-Hydroxymorphinan

entsteht aus Dextrorphan mittels CYP3A-Enzymen und aus 3-Methoxymorphinan mittels CYP2D6.^{47 48 49 50 51}

Abbildung 2.1 zeigt die Strukturformeln von Dextromethorphan und seinen O- und N-demethylierten Metaboliten.

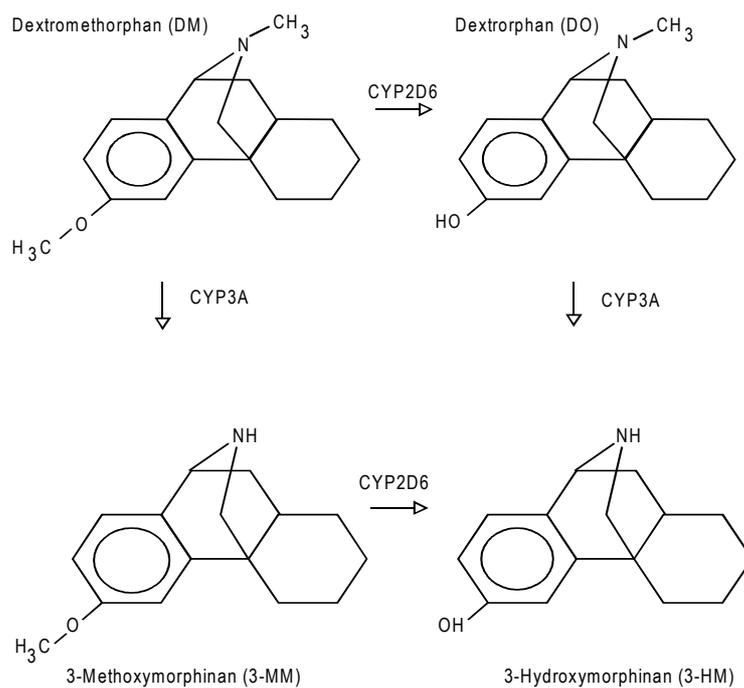


Abb. 2.1: Strukturformeln von DM und seiner O- und N-demethylierten Metabolite

Im Metabolismus des Dextromethorphan über CYP2D6 existiert eine sehr grosse Variationsbreite.⁵² Es wurde gezeigt, dass dieser Abbauweg einem genetischem Polymorphismus des CYP2D6 unterliegt.⁵³ Demnach können Menschen in sogenannte „extensive metabolizer“ und „poor metabolizer“ eingeteilt werden. Die Häufigkeit des poor-Metabolisierungs-Status rangiert zum Beispiel zwischen 1% in der chinesischen Bevölkerung und 7% in der schwedischen Bevölkerung.⁵⁴

2.1.3 Wirkung

Die antitussive Wirkung des nicht narkotisierenden Morphinderivats Dextromethorphan kommt schon seit über vierzig Jahren in bewährter Weise zur Anwendung.

Diese „alte“ Substanz hat bereits auf sich aufmerksam gemacht, als ihr antikonvulsive und neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben wurden. Diese beruhen auf wenigstens vier verschiedenen Mechanismen: 1) Bindung an die „high-affinity DM1- σ 1“-Bindungsstellen⁵⁵ ; 2) nicht-kompetitiver Antagonismus der NMDA-Rezeptoren⁵⁶ ; 3) Hemmung des Calcium-Einstroms über Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle⁵⁷ ; und 4) Interaktion mit Spannungs-abhängigen Na^{+} -Kanälen.⁵⁸

Diese ermutigenden experimentellen Ergebnisse führten zu einer Reihe klinischer Ansätze bei der Behandlung verschiedenster neurologischer Erkrankungen.^{59 60}

2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) hat einen außerordentlich weiten Anwendungsbereich und ist aufgrund der hohen Anzahl an Variationsmöglichkeiten für nahezu jedes Trennproblem geeignet. Es können unpolare (gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe), polare (nichtionische organische Verbindungen) und ionische (Salze, Säuren, Basen) Substanzgruppen sowie Isomere und Biopolymere getrennt werden. An das zu trennende Substanzgemisch werden lediglich bezüglich seiner Löslichkeit (möglichst im Fließmittel), seiner Haltbarkeit und seiner Detektierbarkeit (UV- / Fluoreszenz-Aktivität) bestimmte Anforderungen gestellt.⁶¹

2.2.1 Das chromatographische Trennprinzip

Die Auftrennung einer Probe in Einzelsubstanzen erfolgt in der Chromatographiesäule, die in einem Edelstahlmantel einen dichten Verband poröser Teilchen mit großer Gesamtoberfläche enthält (Säulenpackung /-bett, meist Kieselgel- oder Polymermatrix) und von einer mobilen Phase (Eluent) durchströmt wird. Die stationäre Phase besteht bei der Liquid-Solid-Adsorptionschromatographie (LSC) aus dem Säulenbett, bzw. aus der Grenzfläche der porösen Teilchen, an der die Wechselwirkung mit den Probenmolekülen stattfindet.⁶²

Bei der Liquid-Liquid-Verteilungschromatographie (LLC) ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit, die als dünne Schicht auf den porösen Teilchen des Säulenbettes (in diesem Fall Trägermaterial genannt) ausschließlich auf Grund von relativ schwachen Adhäsionskräften haftet. Durch die Verbindung der stationären Phase mit dem

Säulenbett, was meist in einer chemischen Reaktion der Silanolgruppen des Trägermaterials mit substituierten Chlorsilanen erfolgt, erhält man sogenannte gebundene Phasen.⁶¹ Sind die Substituenten der Chlorsilane polar, erhält man eine sogenannte chemisch gebundene Normalphase (normal phase), sind sie unpolar, sogenannte chemisch gebundene Umkehrphasen (reversed phase). Die Gestalt der stationären Phase variiert dabei in Abhängigkeit von der Polarität der mobilen Phase: Ist diese stark polar (z.B. Wasser), so werden die Alkylketten der Chlorsilane durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Trägermaterial gedrückt, ist sie stark apolar, so lagern sich die Eluensmoleküle zwischen die Alkylketten ein, so dass diese quasi in der mobilen Phase „schweben“.

Die eigentliche Auftrennung in die stofflichen Einzelbestandteile erfolgt nach dem Aufbringen des Substanzgemisches auf Grund der unterschiedlichen Verweilzeiten, die sich beim Herunterwaschen von der Säule (eluieren) für die Einzelsubstanzen in der Säule ergeben. Die unterschiedlichen Verweilzeiten kommen dadurch zustande, dass die Verteilungsgleichgewichte für die Einzelsubstanzen unterschiedliche Werte haben, so dass sie unterschiedlich lange in der stationären Phase verweilen.

2.2.2 Aussehen und Informationsgehalt eines Chromatogramms

Die Zeit, die eine Substanz benötigt, um vom Injektionsventil zum Säulenende zu gelangen, heißt Retentionszeit t_R . Die Retentionszeit t_R setzt sich zusammen aus den Verweilzeiten in der stationären Phase (t_S = Nettoretentionszeit) und der mobilen Phase (t_M = Säulentotzeit), sowie der apparativen Totzeit (t_{extra} = Extratotzeit), wobei t_M und t_{extra} für alle Probenkomponenten näherungsweise gleich sind.⁶¹

$$t_R = t_S + t_M + t_{\text{extra}}$$

Die auf die Säulentotzeit normierte Nettoretentionszeit einer Substanz A nennt man Kapazitätsfaktor $k'(A)$; er ist von den Säulenabmessungen unabhängig:

$$k'(A) = t_S(A)/t_M$$

Die Qualität einer Trennung (Auflösung) wird durch zwei Zeiten beeinflusst, den Peakabstand Δt (gemessen als Abstand der Peakmaxima) und die Peakbreite ω .⁶¹ Ein zu kleines Δt geht auf ein ungeeignetes Trennsystem (falsche Säule oder falsches Eluens), eine zu große Peakbasisbreite ω auf ein schlechtes Trennsystem (meist eine schlechte Trennsäule) zurück.

2.2.3 RPLC - Vorteile und Besonderheiten

Als Umkehrphasensystem arbeitet die RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) mit polaren mobilen und unpolaren stationären Phasen, die meist durch Umsetzung von extrem reinem synthetischen SiO_2 mit Alkylchlorsilanen, vorzugsweise Octadecylchlorsilan (ODS) aber auch Methyl-, Butyl- und Octylchlorsilan chemisch modifiziert und somit äußerst stabil und benutzerfreundlich sind. Um eine möglichst unpolare stationäre Phase zu erhalten, führt man anschließend noch ein sogenanntes „endcapping“ durch, eine Umsetzung mit Trimethylchlorsilan, das wegen seiner geringeren Größe auch noch mit OH-Gruppen in engeren Poren des Trägermaterials reagieren kann, die das ODS nicht mehr erreichen kann.⁶¹

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit betreibt man ODS-Phasen meist bei 40°C.⁶³

Häufig verwendete Eluentien für ODS-Säulen sind Methanol, Acetonitril und Tetrahydrofuran, sowie deren Gemische mit Wasser. Sobald das Elutionsmittel eine oder mehrere organische Komponenten enthält, wie in den meisten Fällen, wird allerdings auch dieses zumindest teilweise in die C18-Schicht adsorbiert und dort Bestandteil der stationären Phase. Durch die Gegenwart des adsorbierten Elutionsmittelanteils erhält das RPLC-System viel LLC-Eigenschaften.⁶¹

Wegen der Beseitigung fast aller polaren Gruppen kann man für die Art der Wechselwirkung zwischen stationärer ODS-Phase und Probensubstanzen vor allem dispersiven Charakter annehmen. Allerdings spielt die Entropie in den chemisch gebundenen Umkehrphasen bei der Adsorption in die stationäre ODS-Phase eine bedeutendere Rolle, da die gelösten Moleküle je nach ihrer Struktur zwischen die gebundenen C₁₈-Ketten und darin bereits adsorbierten Eluentsmoleküle richtiggehend eingeordnet werden müssen.⁶¹

Dementsprechend adsorbieren schwächer polare Substanzen fester (bzw. häufiger) als stärker polare und eluieren später.

Bei der Trennung von unpolaren Substanzen unterscheiden sich die Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase qualitativ kaum, so dass hier vor allem die Grenzfläche des gelösten Moleküls (surface area, SA_{Solut}) und damit dessen Größe ins Gewicht fällt. Darüber hinaus geht die Grenzflächenspannung des polaren Elutionsmittels gegen das gelöste Molekül als Faktor in den Term für die Cavity-Energie ein; diese Grenzflächenspannung (σ_{Eluent}) wird vereinfachend mit der gegen Luft gleichgesetzt. Die Cavity-Energie ΔG^{cav} ist die zur Erzeugung der für den Einbau eines Probenmoleküls erforderlichen „Höhle“ im Lösungsmittel aufzuwendende Energie.

$$\Delta G^{\text{cav}} = \text{const.} \cdot \sigma_{\text{Eluent}} \cdot SA_{\text{Solut}}$$

Die RPLC ist deshalb besonders zur Auftrennung von Substanzgemischen nach dem Anteil an unpolaren Baugruppen (z.B. -CH₂-), also auch von Homologen geeignet.

Bei der Trennung ähnlich großer polarer Substanzen (die meist Wasserstoffbrücken ausbilden können) entscheidet die nunmehr viel stärkere Wechselwirkung der polaren gelösten Moleküle mit der polaren mobilen Phase über die Dauer der Retention. Stark polare Substanzen eluieren meist so schnell, dass sie nicht mehr aufgetrennt werden können. Eine Erhöhung der Retentionszeit gelingt einfach, indem man den Wasseranteil des Elutionsmittels erhöht und damit auch dessen Grenzflächenspannung und Cavity-Energie. Die damit bewirkte Abnahme des Betrages der Freien Lösungsenthalpie in der mobilen Phase erzielt die gewünschte Erhöhung der Retention.⁶¹

Allgemein gilt, dass bei hohem Wassergehalt im Elutionsmittel die entsprechend hohe Cavity-Energie dominiert und nur sehr stark polare Substanzen noch zu annehmbaren Retentionszeiten ($t \leq 20\text{-}30$ min) eluieren. Für schwach- und mittelpolare Substanzen nimmt die Selektivität im Vergleich zu weitgehend organischem Eluens jedoch stark ab.

2.2.4 Trennung von Dextromethorphan und seiner Metabolite

Die vorausgegangenen Erläuterungen legen nahe, für die Analyse von Dextromethorphan und seiner Metabolite, die RPLC (Reversed-Phase-Liquid-Chromatography) zu verwenden.

Ausschlaggebend für erste Versuche mit dieser Methode, waren Untersuchungsergebnisse von Chen und Mitarbeitern, die eine HPLC-Methode zur

gleichzeitigen Trennung von Dextromethorphan und seiner drei Metabolite beschreiben.⁶⁴

2.3 Grundlegendes zur Integration chromatographischer Daten⁶⁵

Es sind im wesentlichen zwei Ziele, die ein „Chromatograph“ verfolgt, wenn er die Datenverarbeitung zur Datenreduktion verwendet:

1. Erhöhung der Präzision der qualitativen und quantitativen Aussage der Daten.
2. Reduktion des Zeitbedarfs, um die geforderten Informationen aus den Rohdaten zu erhalten.

Um diese beiden Ziele zu erreichen, ist es wichtig, dass der Benutzer den Ablauf der Datenverarbeitung und deren Einfluss auf die Integration versteht. Außerdem muss er fähig sein, dieses Hintergrundwissen auf die vorliegenden chromatographischen Probleme anzuwenden. Um diese beiden Punkte näher zu beleuchten, sollen die wichtigen Parameter und ihre Rolle bei der Integration und Präsentation der Daten und Reports besprochen werden, ebenso die praktische Anwendung dieser Funktionen.

Es gibt viele Parameter, die bei der Datenverarbeitung berücksichtigt werden müssen. Um mit der Integration die Fläche oder die Höhe sauber zu bestimmen, sind zwei Parameter wirklich kritisch. Dies sind die WIDTH und die SLOPE. Die WIDTH ist das Zehnfache der sogenannten „bunching rate“ (Zahl der Datenpunkte pro Zeiteinheit) und wird aus praktischen Gründen durch die Halbwertsbreite (in Sekunden) des schmalsten interessierenden Peaks im Chromatogramm gegeben. Die richtige Daten-Aufnahmerate

ist sehr wichtig für eine saubere Integration. Eine zu geringe bunching rate verschleift die Peaks, aber auch eine zu hohe bunching rate ist nicht gut, weil der Integrationsalgorithmus nur mit der richtigen bunching rate am besten arbeitet. Die Datenaufnahme wird mit einer festen Rate von 250 Datenpunkten pro Sekunde durchgeführt und nur die bunching rate verändert sich ausgehend vom Anfangswert als Funktion der zunehmenden Peakbreite im isokratischen Chromatogramm. Die richtige Wahl der anfänglich gesetzten WIDTH ist auch besonders wichtig, weil durch sie der zweite kritische Parameter SLOPE (Steigung) beeinflusst wird.

Die SLOPE ist der Parameter, mit dem die Anfangs- und Endpunkte der Peaks gefunden werden. Die SLOPE ist ein Maß für die Schwankung der Basislinie in Abhängigkeit von der Zeit und hat die Einheit $\mu\text{V}/\text{min}$. Je nach vorgegebener WIDTH ergibt sich eine andere SLOPE. Die Shimadzu Datenprozessoren haben einen internen Mechanismus, um die SLOPE zu messen, den S-Test. Diese gemessene SLOPE ist nicht unbedingt adäquat für alle chromatographischen Situationen, aber er ist ein guter Startwert. Die Entscheidung, ob ein SLOPE-Wert geeignet ist, erfolgt durch Betrachtung des Chromatogramms und besonders der Anfangs- und Endpunkte der Peaks. Diese Punkte sollten möglichst an der Stelle liegen, an der der Peak und die Basislinie visuell verschmelzen. Generell erscheinen die „peak detection marks“ vor und nach den Verschmelzungspunkten, wenn die SLOPE zu klein ist. Falls die Markierungen zu weit auf den ansteigenden oder abfallenden Flanken der Peaks erscheinen, ist wahrscheinlich der SLOPE-Wert zu groß. So lässt sich durch mehrfaches Probieren der beste SLOPE-Wert finden. Während des Laufs können SLOPE und WIDTH entweder durch das Zeitprogramm oder den voreingestellten automatischen Algorithmus ($T.DBL = 0$) verändert werden. Die saubere Wahl von WIDTH und SLOPE sind für die Integration sehr wichtig, können allein aber nicht alle

chromatographischen Situationen beherrschen. Die SLOPE ist sehr einfach im „post run“ Modus zu verändern, um die Auswirkungen auf die Integration zu testen. Weitere Parameter und Integrationsfunktionen, die im Folgenden diskutiert werden, sind bei der Integration schwieriger Chromatogramme noch von Bedeutung.

Die anderen verfügbaren Parameter sind DRIFT und T.DBL (time double). Die DRIFT erlaubt es, eine driftende Basislinie auszugleichen, indem ein erlaubter Drift-Winkel eingegeben wird. Die DRIFT hat zwar dieselben Einheiten wie die SLOPE, wird aber anders verwendet: Sie bestimmt den Endpunkt des Peaks in der Art, dass ein hoher Wert eine „valley to valley“ Integration erzwingt. Einen angemessenen DRIFT-Wert findet man nur durch Experimentieren.

Gibt man einen Wert für T.DBL ein, so wird der automatische Algorithmus ausgeschaltet. Der Parameter T.DBL gibt das Zeitintervall an, nach dem jeweils die WIDTH verdoppelt und die SLOPE halbiert wird. Das ist vernünftig für isotherme GC und isokratische HPLC. Setzt man T.DBL auf einen größeren Wert als die „Stoptime“, dann bleiben WIDTH und SLOPE während des ganzen Laufs konstant, wie es bei temperaturprogrammierter GC oder Gradienten-HPLC richtig ist, weil dort die Peakbreiten während des ganzen Chromatogramms konstant sind.

Im Zeitprogramm gibt es noch weitere Möglichkeiten, die Integration zu beeinflussen. Das sind Funktionen wie: „negative peak processing“, Integration An/Aus, Basislinienpunkt setzen, tangentieller Verlauf vorgegeben und horizontale Basislinie erzwungen. Alle besprochenen Funktionen erlauben es, praktisch jedes chromatographische Problem zu lösen. Eine gute chromatographische Auftrennung ist aber die Vorbedingung für jede qualitative und quantitative Aussage. Keine

Datenverarbeitung kann jedoch die Chromatographie verbessern, weil das Ergebnis nicht besser sein kann, als die Daten, die der Integration zur Verfügung stehen.

2.4 Experimentelle Arbeiten

2.4.1 HPLC - Apparatur und Betriebsbedingungen

Für die Durchführung der HPLC wurden folgende Geräte verwendet:

HPLC-Pumpe⁶⁶

LC-9A, Shimadzu

„Solvent Delivery Module“:

- Pumpe: 2-Kolben-Pumpe, Mikrovolumen (ca. 10µl/Hub)
- Pumpmodus: Konstanter-Fluss- oder Konstanter-Druck-Modus

Konstanter-Fluss-Modus:

Flussbereich: 0,001 bis 5 ml/min; 5.001 bis 9,999 ml/min

Flussratenreproduzierbarkeit: = 0,3%

Flussrichtigkeit: = 2%

Konstanter-Druck-Modus:

Druckbereich: 10 bis 400 kgf/cm²

Druckrichtigkeit: = 10 %

- Druckgrenzen: Hoch-Druck, Niedrig-Druck
- „Damper“: ca. 200 µl Fassungsvermögen

- Materialien mit Flüssigkeitskontakt:

SUS316, Rubin, Saphir, Teflon beschichtet mit Graphit; Hastelloy C,
PEEK, KelF

- Ansaugfilter: 5 µm Netz

- Serienfilter: 2 µm Netz, 200µl Fassungsvermögen

- Zeitprogramm: Flussrate, Druck, Event, LOOP

- Richtigkeit der Druckanzeige: $\pm 5 \text{ kgf/cm}^2$

- Kolbenreinigung: automatischer Kolbenreinigungskreislauf

Säulenofen⁶⁷

GECKO-CIL

Betriebstemperatur: 40°C

Autoinjektor⁶⁸

GINA 50, Gyncotek

Spezifikation:

- Injektionsprinzip: Inline split-loop

- Probenzahl: 50 + 1 Standard

- Probenflaschen: Glasflaschen mit Bördel-, Schraub- oder Deckelverschluss

Flaschenboden: flach, halbrund oder konisch

Volumen: 1,1 ml oder 1,8 ml

- Injektionsvolumen: 1 bis 250 µl mit Standard-Dosierspritze und 250 µl

Probenschleife

- Injektionsventil: Rheodyne Typ RH 7000

- Spülvolumen: keines
- Probenverlust: keiner
- Minimaler Probenbedarf: 5 µl in Flaschen 1,1 ml (konisch) für 1 µl Injektionsvolumen
- Reproduzierbarkeit: = 0,3% Standardabweichung bei Injektionsvolumen größer 10 µl
- Mehrfachinjektion: Max. 99 Wiederholungen/Probenort
- Injektionszähler: rückstellbar

- Methoden-Parameter: Start Probenort, Einspritzvolumen, Analysenzeit, Wiederholungen, Standard Intervall, Standard Volumen, Standard Analysenzeit, Nadelabsaughöhe, Racktyp, Anzahl Injektionen
- Sicherheitseinrichtungen: Zeitüberwachung sämtlicher mechanischer Bewegungsabläufe (Injektionsventil, Dosierspritze), elektronischer Probennadelschutz, Überwachung bei Probenflaschenfehlbelegung, Deckelverriegelungskontakt
- Eingabe/Anzeige: Tastatur, 4-stellige LED-Anzeige, 10 Leuchtdioden zur Menüanzeige
- Medienberührte Teile: Edelstahl 1.4571, PCTFE, PEEK
- Arbeitsdruck: Max. 340 bar

Trennsystem

Wie oben bereits dargestellt, besteht das chromatographische Trennsystem aus der Trennsäule bzw. dem Säulenfüllmaterial als stationärer Phase und dem durchströmenden Lösungsmittel als mobiler Phase.

Stationäre Phase:⁶⁹

- Säule: LiChrospher® 100 CN; Vertrieb: Merck KGaA, Darmstadt, Germany

- sphärische, poröse Kieselgel-Partikel, Partikeldurchmesser: 5 μm

- Porendurchmesser: 100 \AA

- Grösse der Oberfläche: 220 m^2/g

- an Silanol-Gruppen gebundene Umkehrphase mit C_{18} - und $\text{C}_3(\text{CN})$ -Ketten

- Abmessungen: Länge = 250 mm; $\text{\O} = 4$ mm

- Säulentestchromatogramm:

- Herstellertest:

- Teststandard: 1. Biphenyl, 2. m-Terphenyl, 3. 2-Nitrotoluene,

- 4. m-Quinquephenyl

- Flussrate: 1 ml/min

- Eluens: n-Heptan / Dioxan 99/1

- Daten des dritten Peaks: $k = 1.2$, $A_s = 1.0$, $N/m = 76420$,

- $p = 50$ bar

- Betriebsbedingungen:

- Betriebstemperaturen: 21°C und 40 °C

- Flussrate zwischen 0.8 ml/min und 1.4 ml/min

- Betriebsdruck zwischen 70 bar und 180 bar, in Abhängigkeit von Flussrate, Betriebstemperatur und mobiler Phase.

Mobile Phase:

Für die Herstellung der mobilen Phase wurden folgende Substanzen eingesetzt:

- Natriumhydrogenphosphat E. Merck, Darmstadt
- Phosphorsäure 85% E. Merck, Darmstadt
- Acetonitril HPLC-Grade E. Merck, Darmstadt
- Wasser deionisiert, gefiltert Millipore, Eschborn

Der zur Analyse verwendete Eluent ist ein Acetonitril-Natriumhydrogenphosphatpuffer-Gemisch (v/v = 20/80), 50 mM, mit einem pH-Wert von 3,0.

Detektor⁷⁰

Fluoreszenz-Detektor, Typ F-1050, Merck-Hitachi

Spezifikation:

- Exzitations-Monochromator

Large-aperture stigmatic concave grating, 1000 lines/mm

F : 3

- Emissions-Monochromator

Large-aperture stigmatic concave grating, 1000 lines/mm

F : 2,8

- Wellenlängenbereich

Fluoreszenz-Spektrum Exzitation

220 bis 650 nm

Fluoreszenz-Spektrum Emission

220 bis 730 nm

- Bandbreite 15 nm
- Wellenlängenrichtigkeit ± 7 nm
- Lichtquelle 150 W Quecksilber-Xenon-Lampe
- Detektoren Messung : R372F (photomultiplier tube)
Aufzeichnung: R1413 (photomultiplier tube)

- Empfindlichkeitsbereich

0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 100

- Zeit Konstante

0.3, 1, 3 sec

- Nullabgleich

Nullabgleich verfügbar mit „background compensation“

- Durchflusszelle:

Zellen-Inhalt	Fluss-Länge	Belichtung	Druck-Resistenz
12 μ l	1.3 X 1.3 X 12 mm	1.3 X 1.3 X 7 mm	30 kgf/cm ²
		= 12 μ l	

- Empfindlichkeit

12 μ l Zelle: „raman spectrum“ von Wasser, messbar bei einem S/N-Verhältnis

mehr als 110

gemessen bei einer Exzitationswellenlänge von 350 bis 370 nm und einer

Zeitkonstante von 1 sec

Integrator

CR4A, Shimadzu

2.4.2 Optimierung des Trennsystems

Da im Neurochemischen Labor zur Plasmaspiegelbestimmung von Psychopharmaka Purospher® RP-18-Säulen zur Anwendung kommen, wurde zuerst versucht, Dextromethorphan (DM) und den Metabolit Dextrorphan (DO) mit einer RP-18-Säule zu trennen.

Zuvor wurden Dextromethorphan (DM), Dextrorphan (DO), Hydroxymorphan (HM) und Methoxymorphan (MM) eingewogen und mit der entsprechenden Menge an Methanol gelöst, um Standardlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml zu erhalten:

4,668 mg DM in 4,7 ml Methanol

2,581 mg DO in 2,6 ml Methanol

1,461 mg HM in 1,5 ml Methanol

1,262 mg MM in 1,3 ml Methanol

Dextromethorphan, Dextrorphan, Hydroxymorphan und Methoxymorphan wurden von RBI (Natick, USA) bezogen.

Hierbei ergaben sich folgende Retentionszeiten (Abbildung 2.2)

t_R (DO) = 8,4 min

t_R (DM) = 46,6 min

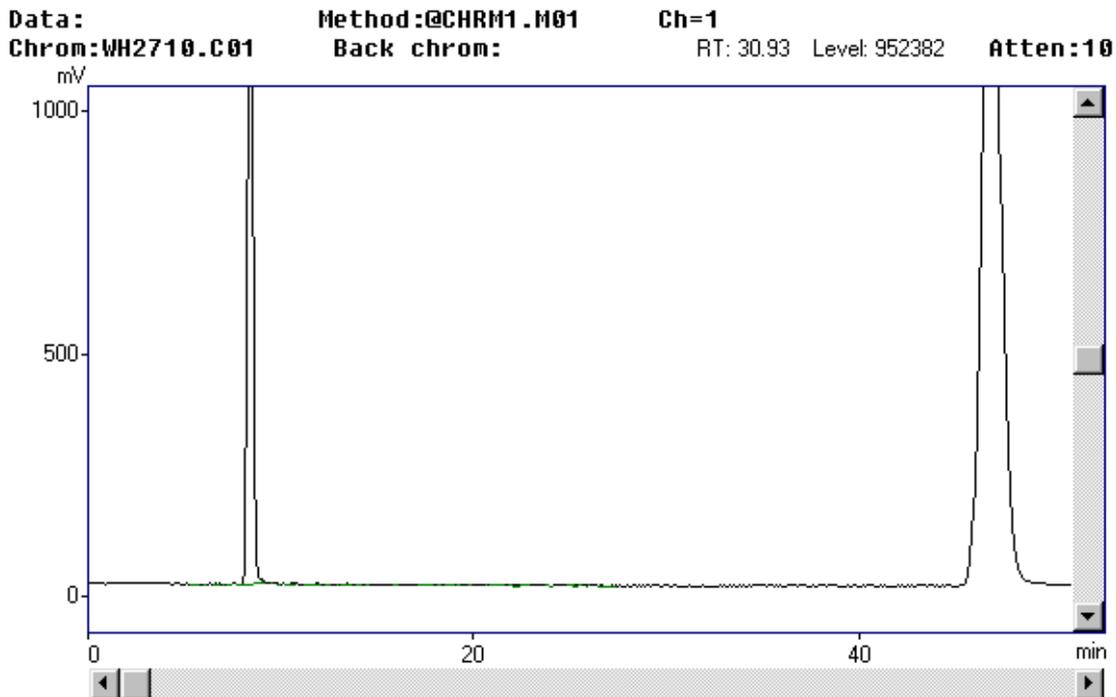


Abb. 2.2: Trennung von DO (peak 1) und DM (peak 2) mit einer C-18-Säule

Die C-18-Säule bewirkt eine fast ausschliesslich hydrophobe Wechselwirkung mit geringem polaren Anteil durch die nicht abgesättigten Silanolgruppen und hält die injizierten Substanzen umso mehr zurück, je weniger polare Anteile ein organisches Molekül aufweist. Das heißt, dass polare Moleküle sehr früh, unpolare „organische“ Moleküle spät im Chromatogramm kommen. Aus diesem Grund kommen die im Körper gebildeten Metabolite einer Substanz immer vor der Hauptsubstanz im Chromatogramm, weil bei der Metabolisierung die Hydrophilie und damit die Ausscheidungsfähigkeit über die Niere erhöht wird.

Im Beispiel des Dextromethorphans sieht man das sehr schön. Dextromethorphan wird am stärksten zurückgehalten, der polarere Metabolit Dextrorphan erheblich weniger. Der Unterschied in den Retentionszeiten ist bei der C-18-Säule so groß, dass man entweder eine Gradientenelution mit erheblich höherem Aufwand vornehmen, oder sich für ein anderes Trennsystem entscheiden müsste, um die Retentionszeiten in einen praktikablen Bereich unter 20 Minuten zu bekommen.⁷¹

Durch das Umsteigen auf eine LiChrospher CN- Säule, die im Vergleich zur Purospher RP-18-Säule eine zusätzliche polare Wechselwirkung aufweist, konnte eine akzeptable Retentionszeit für Dextromethorphan erreicht werden. (Abbildung 2.3)

t_R (DO) = 7,6 min

t_R (DM) = 15,1 min

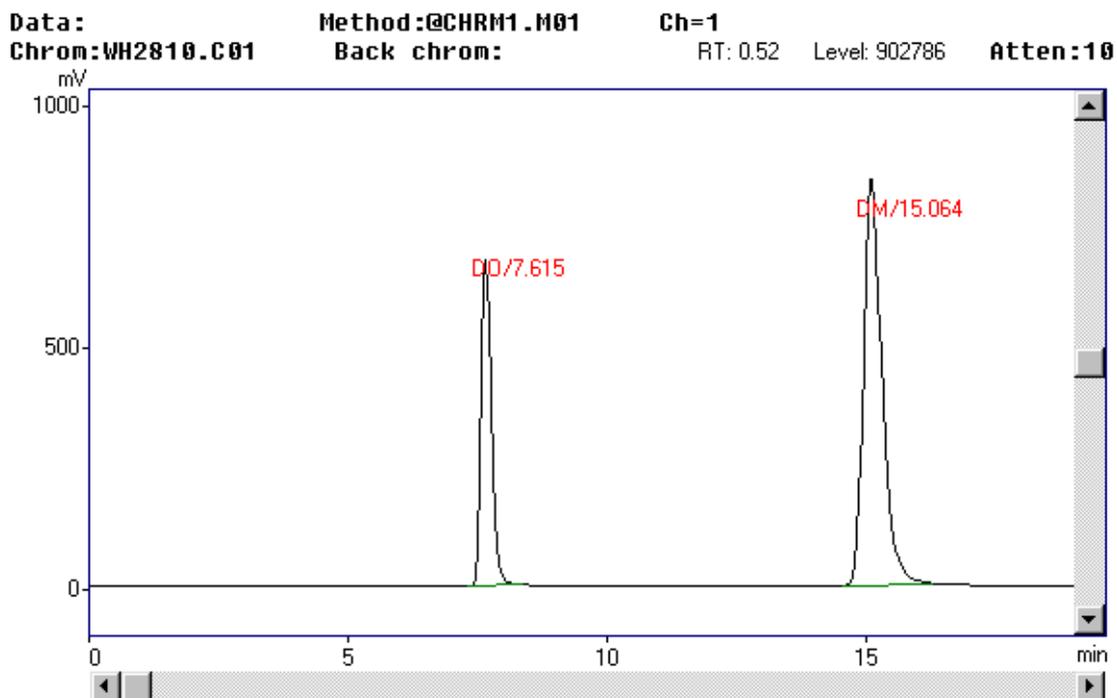


Abb. 2.3: Trennung von DO (peak 1) und DM (peak 2) mit einer CN-Säule

Somit wird für die weiteren Analysen die LiChrospher CN-Säule verwendet.

2.4.3 Optimierung der Detektion

Die in der Literatur angegebenen Wellenlängenbereiche zur Fluoreszenzdetektion von Dextromethorphan und seiner Metabolite wurden auf die hier herrschenden Bedingungen optimiert. (Tabelle 2)

ex - WL in nm	245	250	230	255	245
em - WL in nm	300	315	315	300	300
DO 100 ng/ml Peak-Höhe in μV	433620	138953	681113	110432	439330
DM 100 ng/ml Peak-Höhe in μV	703626	157912	840682	107352	728742
Abkürzungen: ex-WL = Exzitationswellenlänge; em-WL = Emissionswellenlänge; DO = Dextrophan; DM = Dextromethorphan					

Tab. 2 Wellenlängen-Optimierung anhand der Peak-Höhen von DO und DM

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wurden folgende Wellenlängen ermittelt, bei der die Peakhöhe und damit die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion am höchsten ist:

Exzitationswellenlänge $\lambda = 230 \text{ nm}$

Emissionswellenlänge $\lambda = 315 \text{ nm}$

2.4.4 Optimierung der Probenaufbereitung

Ziel der Probenvorbereitung ist eine möglichst weitgehende Abtrennung der Analysensubstanz von den Begleitstoffen in möglichst hoher Ausbeute, meist unter deutlicher Verringerung des Flüssigkeitsvolumens, das heißt man will zugleich aufreinigen und aufkonzentrieren.

Beim Aufkonzentrieren muss das Flüssigkeitsvolumen bearbeitbar bleiben. Die Minimalmenge von $25 \mu\text{l}$ kann nur schwer unterschritten werden. Typisches Injektionsvolumen für die HPLC sind $20 \mu\text{l}$.

Das Aufreinigen ist das Hauptziel der Probenvorbereitung. Hierbei kommen je nach Art der Probe und des Arbeitsbereichs des Analyten verschiedene Verfahren in Betracht, z.B. die SPE (Solid Phase Extraction), einfache Extraktionen oder mehrstufige Verfahren wie die Rückextraktion.

Die Extraktion wässriger Lösungen erfolgt im allgemeinen durch organische Lösemittel, die nicht mit Wasser mischbar sind. Typische Lösemittel sind z.B. die niederen flüssigen Alkane Benzol, Toluol, Ethylacetat, Ether, Dichlormethan und

Chloroform. Das Extraktionsmittel wird nach der Polarität des Analyten und der Matrix gewählt. Je polarer der Analyt, desto polarer sollte das Lösemittel sein.

Auch der pH-Wert spielt in der Probenvorbereitung eine große Rolle. Basische Substanzen, z.B. Dextromethorphan und seine Metabolite, lassen sich im Basischen extrahieren, saure Substanzen im Sauren. Am besten ist es, den pK_S -Wert des Analyten zu kennen und den pH-Wert der zu extrahierenden Flüssigkeit um 2 Einheiten geringer (saure Substanzen) oder höher (basische Substanzen) zu wählen.

Begleitsubstanzen sind nicht nur um so störender, je höher ihre Konzentration in der Probe ist, sondern auch je näher ihre Peaks zum Peak der Analysensubstanz sind. Deshalb kann eine sonst geeignete Probenvorbereitung daran scheitern, weil der Peak einer Störsubstanz auf dem Peak des Analyten sitzt.

Herstellung von Kalibrations-Standards:

Leerplasma wird mit Stammlösungen von DM und DO in der Konzentration von 1 mg/ml versetzt, um Kalibrations-Standards mit den Konzentrationen 500, 100 und 20 ng/ml DM und DO zu erhalten.

Vergleich verschiedener Probenaufbereitungsverfahren:

A: SPE (Solid Phase Extraction)

Die SPE, bedient sich der Extraktion über spezielle Säulchen. Diese kleinen Säulen (HLB-Cartridge, Waters) werden zuerst mit Methanol gespült. Anschließend wird mittels Sog mit einer Wasserstrahlpumpe Plasma durch die Säule gesogen. Die nun auf dem Säulchenmaterial haftenden Substanzen werden dann mit einem Wasser/Methanol-Gemisch heruntergewaschen und aufgefangen. Das Lösungsmittel wird wiederum verdampft und der Rückstand in Eluent gelöst. (Abbildung 2.4)

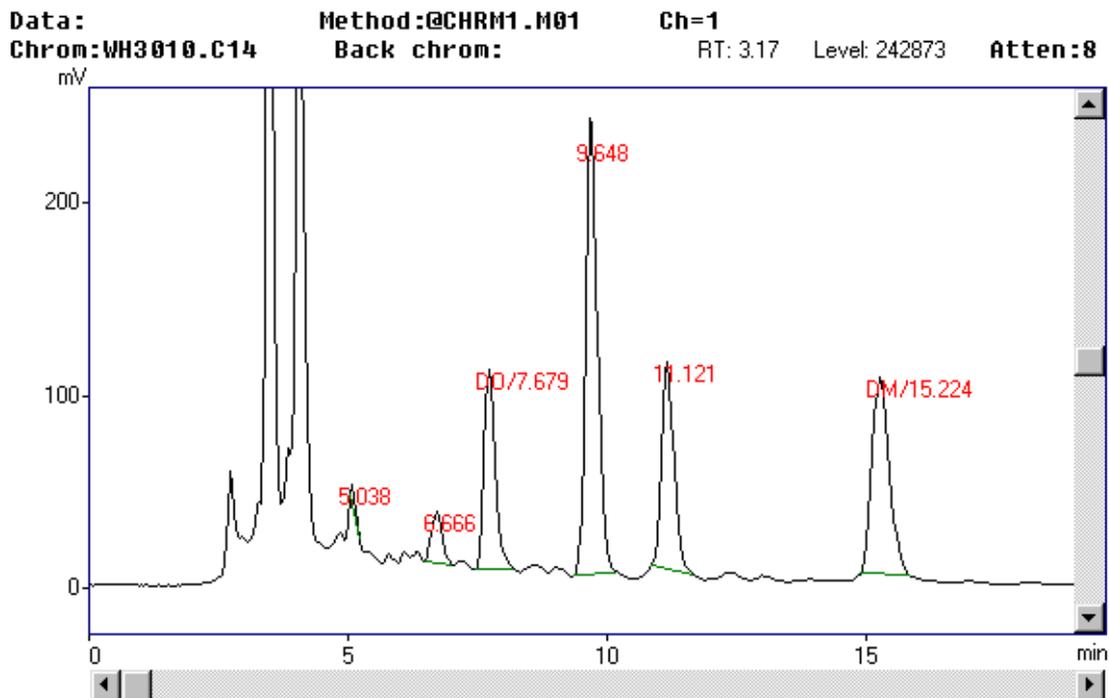


Abb. 2.4: Solid-Phase-Extraction ($t_{RDO} = 7,68$ min $t_{RDM} = 15,23$ min)

Ergebnis des Verfahrens A (SPE):

- SPE: Begleitsubstanzen werden in hoher Zahl mitextrahiert

B: Einfach-Extraktion

Bei den Einfach-Extraktionsverfahren werden die Substanzen aus dem Plasma wiederum mit Hexan oder Ethylacetat extrahiert, jedoch entfällt die Rückextraktion aus der organischen Phase in die wässrige Phase. Stattdessen wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom unter Sog verdampft, und die zurückgebliebenen Substanzen für die Injektion in Eluent gelöst.

(Abbildung 2.5 und 2.6)

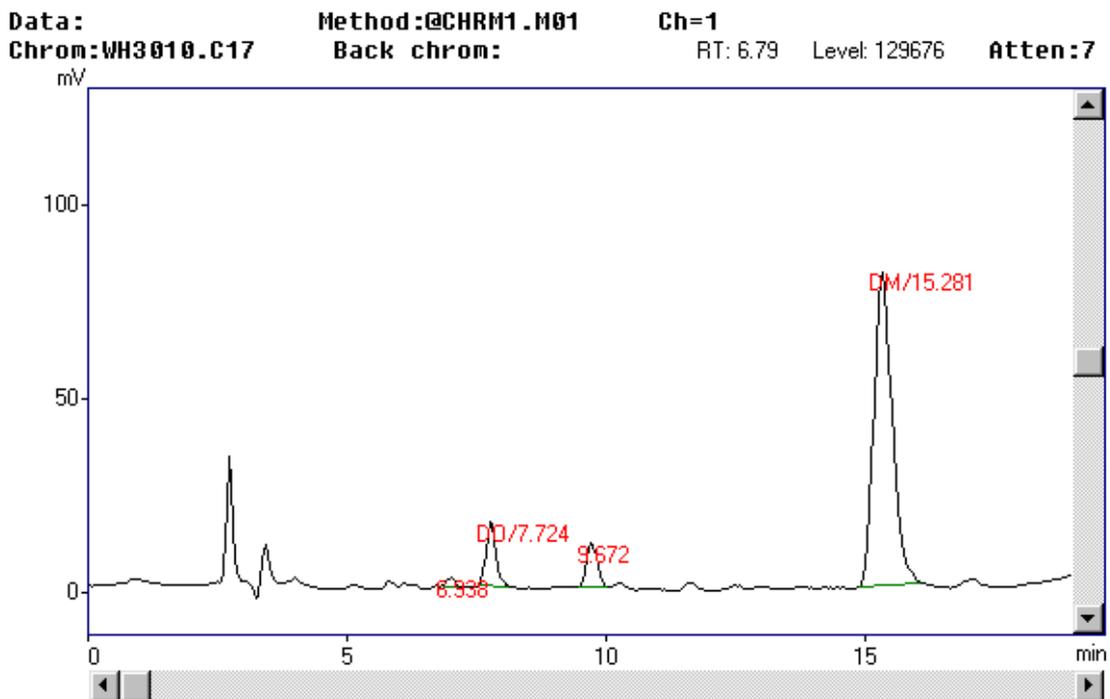


Abb. 2.5 Einfach-Extraktion mit Hexan ($t_{RDO} = 7,72$ min $t_{RDM} = 15,28$ min)

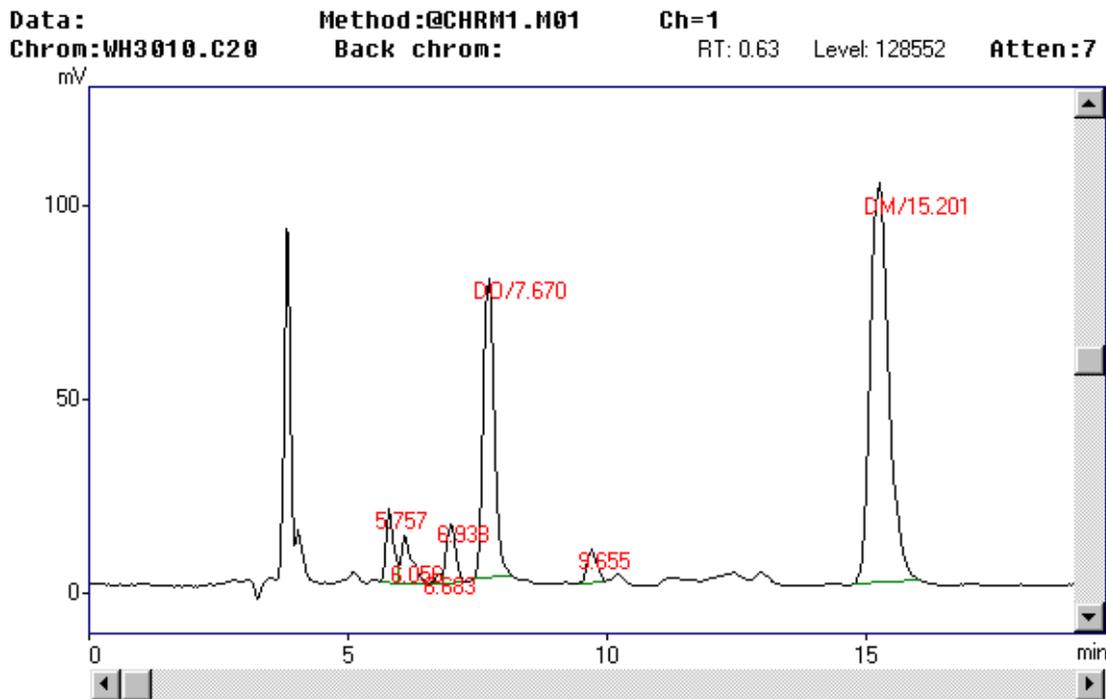


Abb. 2.6 Einfach-Extraktion mit Ethylacetat ($t_{RDO} = 7,67 \text{ min}$ $t_{RDM} = 15,2 \text{ min}$)

Ergebnis des Verfahrens B (Einfach-Extraktion):

- Einfach-Extraktion: viele „Stör-Peaks“ im Chromatogramm

C: Säulenschalten

Die Idee des Säulenschaltens ist es, sich den Aufwand der Extraktion der Analyten aus dem Plasma zu ersparen. Plasma kann direkt in die HPLC injiziert werden unter Verwendung zusätzlicher Säulen, Eluenten und Pumpen.

Eine Pumpe A spült das Plasma mit einem Eluenten A auf eine spezielle Reinigungssäule. Auf dieser werden die Analyten festgehalten, während die Plasmaproteine vom Eluenten A von der Reinigungssäule heruntergewaschen werden.

Nach einer gewissen Zeit werden die Analyten mittels einer zweiten Pumpe B und eines zweiten Eluenten B von der Reinigungssäule auf die eigentliche Trennsäule gewaschen.

Ein programmierbares Schaltventil koordiniert die beiden Pumpkreisläufe A und B so, dass die Reinigungssäule vom Eluenten A „vorwärts“ mit dem Plasma beladen wird, die Analyten jedoch „rückwärts“ vom Eluenten B von der Reinigungssäule gewaschen werden.

Ist der Vorgang des Rückwaschens beendet erfolgt eine Ventilschaltung. Die Reinigungssäule wird nun mit dem Eluenten A gewaschen, also reäquilibriert, bis zur erneuten Plasmajektion, während die Analyten mit dem Eluenten B auf der Trennsäule chromatographisch getrennt werden. (Abbildungen 2.7 und 2.8)

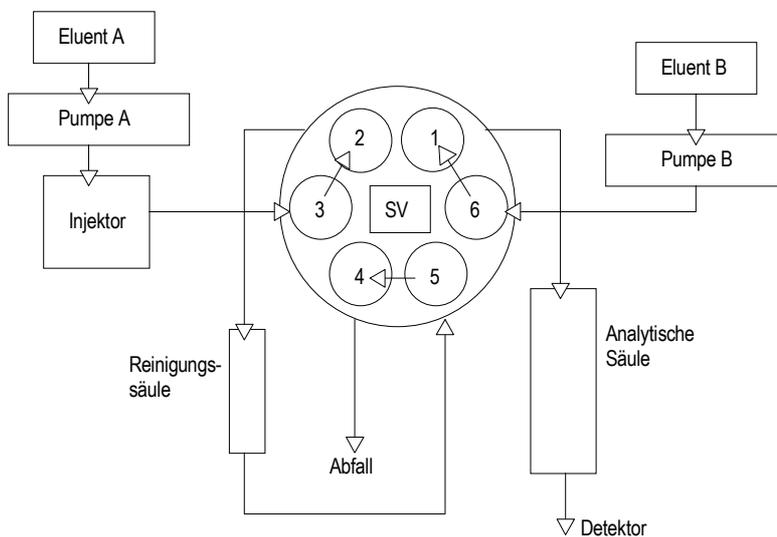


Abb. 2.7: Schaltkreislauf zum Beladen der Reinigungssäule

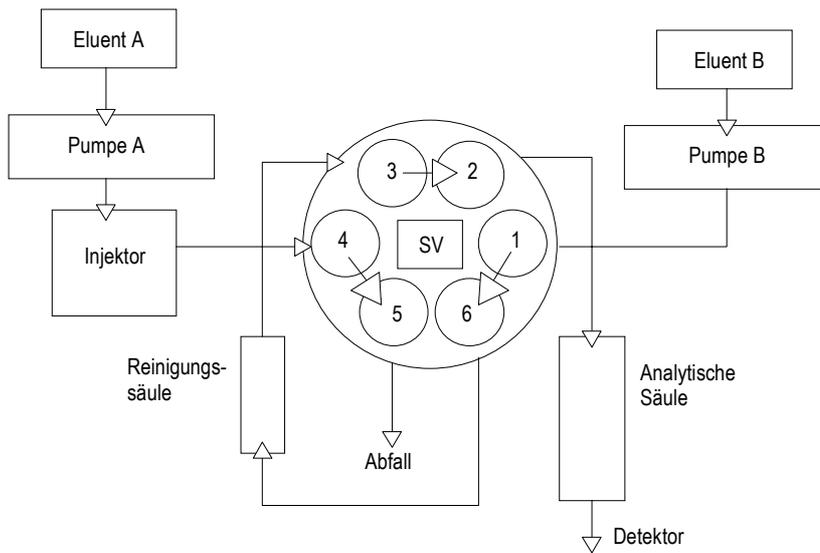


Abb. 2.8: Schaltkreislauf zum Rückwaschen der Reinigungssäule

Vor dem Beginn des Säulenschaltens müssen die Elutionsprofile für die Analyten, der Probenmatrix (Plasma) und des Analytentransfers bestimmt werden.

Elutionsprofil des Analyten: t_A (Abbildung 2.9)

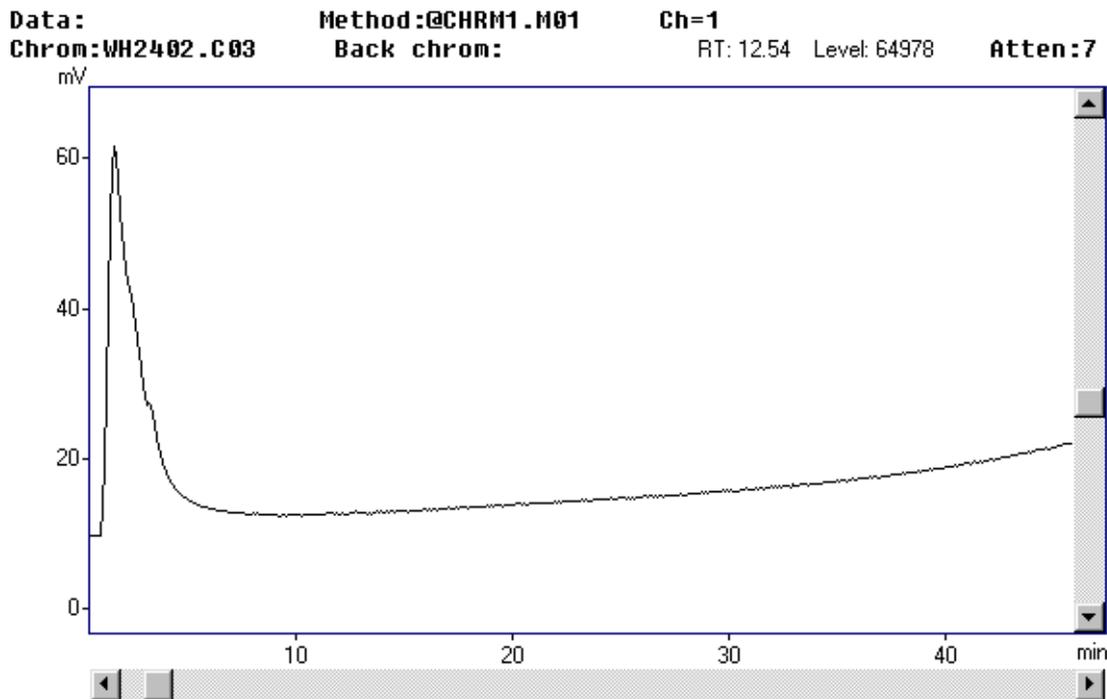


Abb. 2.9: Elutionsprofil des Analyten

$$t_A = 36 \text{ min}$$

Ab der Minute 36 im obigen Chromatogram beginnt der Analyt sich von der Säule herunterzuwaschen, sichtbar durch den langsamen Anstieg der Baseline.

Elutionsprofil des Plasma (Probenmatrix): t_M (Abbildung 2.10)

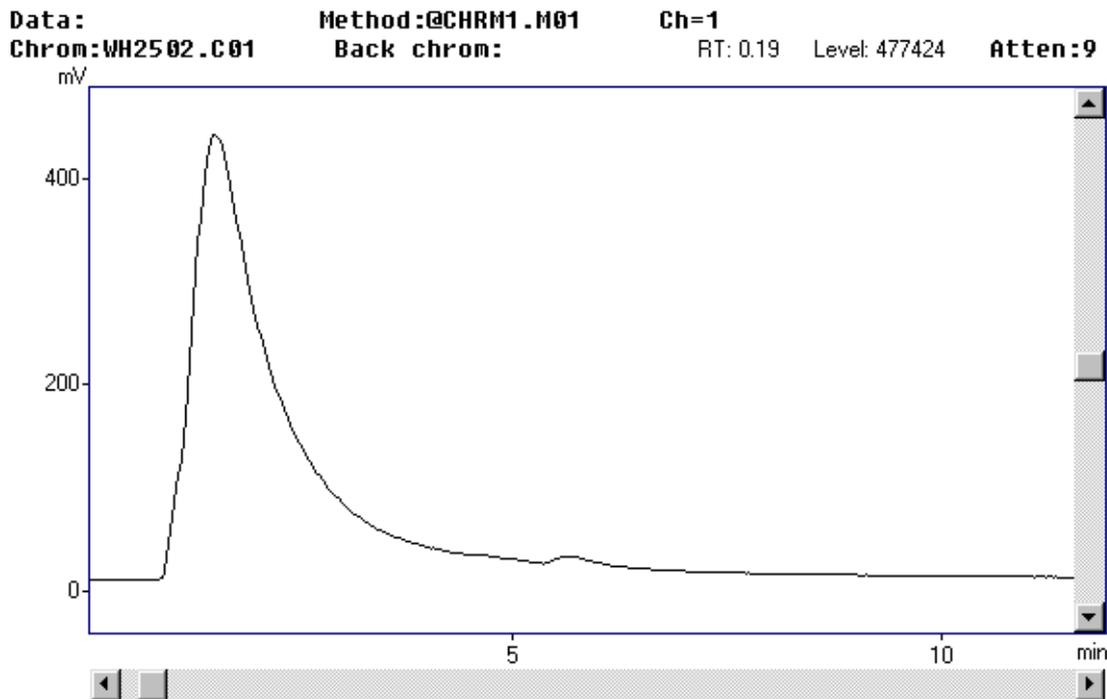


Abb. 2.10: Elutionsprofil des Plasma

$$t_M = 8 \text{ min}$$

Nach 8 Minuten ist das Plasma vollständig von der Reinigungssäule heruntergewaschen.

Elutionsprofil des Analytentransfers: t_T (Abbildung 2.11)

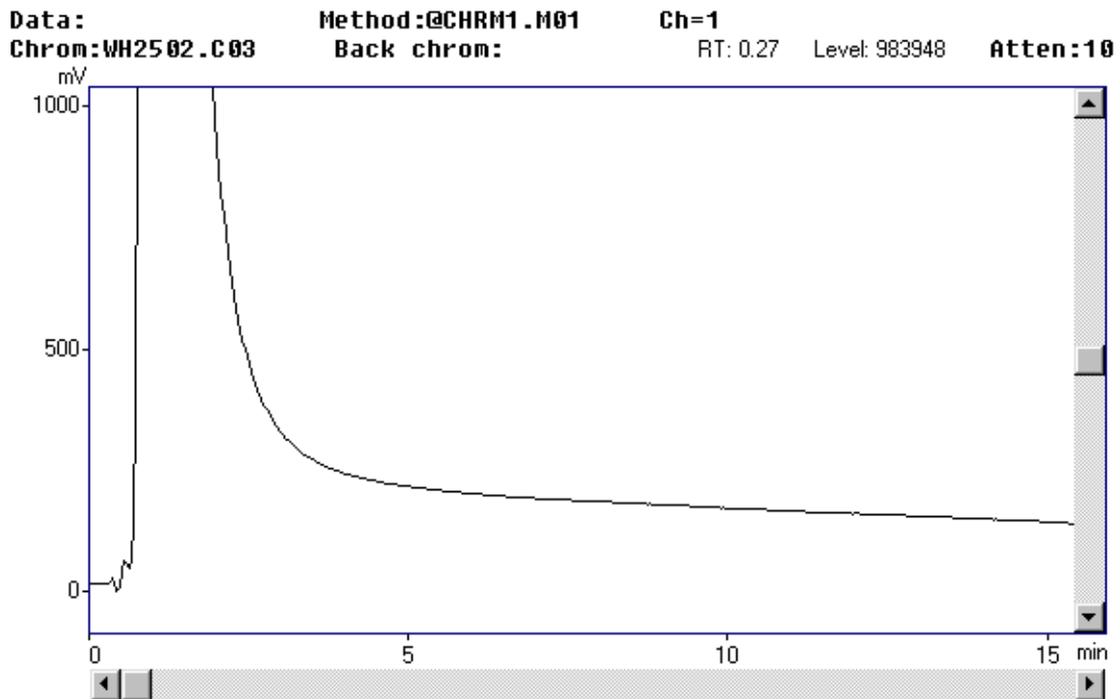


Abb. 2.11: Elutionsprofil des Analytentransfers

$$t_T = 8 \text{ min}$$

Nach 8 Minuten befindet sich kein Analyt mehr auf der Reinigungssäule.

Aus den ermittelten Zeiten können nun die Ventilschaltzeiten bestimmt werden:

$$t_{V1} = t_M + 5 \text{ min} : \text{Beginn des Rückwaschens}$$

$$t_{V2} = t_T + 1 \text{ min} : \text{Beginn der Reäquilibration}$$

Das HPLC-System für das Säulenschalten setzt sich zusammen aus einem automatischen Probengeber (Gina 50, Gyncotec) mit einem 6-Wege-Injektionsventil (Rheodyne RH 7000), einem 6-Wege-Schaltventil (Rheodyne), einer HPLC-Pumpe (LC-9A, Shimadzu) für das Beladen der Reinigungssäule mit dem Analyten und für die Reäquilibration der Reinigungssäule, einer zweiten HPLC-Pumpe (LC-9A, Shimadzu) für den analytischen Trennvorgang, einem Fluoreszenz-Detektor (F 1050, Merck-Hitachi) und einem Integrationssystem für Chromatogramme (CR4A, Shimadzu).

Die analytische Säule (250 X 4,6 mm) ist eine LiChrospher CN-Säule (Merck), die Reinigungssäule (10 X 4 mm) ist eine ADS-LiChrospher RP-8-Säule (Merck).

In den Minuten 0 - 5 werden Proben mit 100 µl Plasma mittels des Eluenten A (20 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer, pH = 7 und 5% Acetonitril) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min auf die Reinigungssäule gewaschen. Proteine und andere störende Plasmabestandteile werden dabei in ein Abfallbehältnis gewaschen.

In den Minuten 5 - 9, nach der Schaltung des 6-Wege-Schaltventils bei Minute 5, werden die zu bestimmenden Analyten von der Reinigungssäule auf die Analytische Säule mit dem Eluenten B (50 mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer, pH = 3,5 und 25% Acetonitril) bei einem Fluss von 1,0 ml/min gewaschen.

Die Analyten werden über die LiChrospher CN-Säule aufgetrennt und mittels Fluoreszenzdetektion erfasst.

Bei Minute 9 wurde das Schaltventil auf seine Ausgangsposition geschaltet, um während der laufenden chromatographischen Auftrennung die Reinigungssäule mit dem Eluenten A zu spülen, und damit für die nächste Plasmainjektion vorzubereiten.

Ergebnis des Verfahrens C (Säulenschalten):

Nach Optimierung des Säulenschaltssystems war es möglich das Plasma mit den darin vorhandenen Substanzen Hydroxymorphinan, Dextrorphan, Methoxymorphinan und Dextromethorphan mittels der Säulenschalttechnik aufzutrennen und zu analysieren. Die Abbildungen 2.12 und 2.13 zeigen das Auftrennungsergebnis.

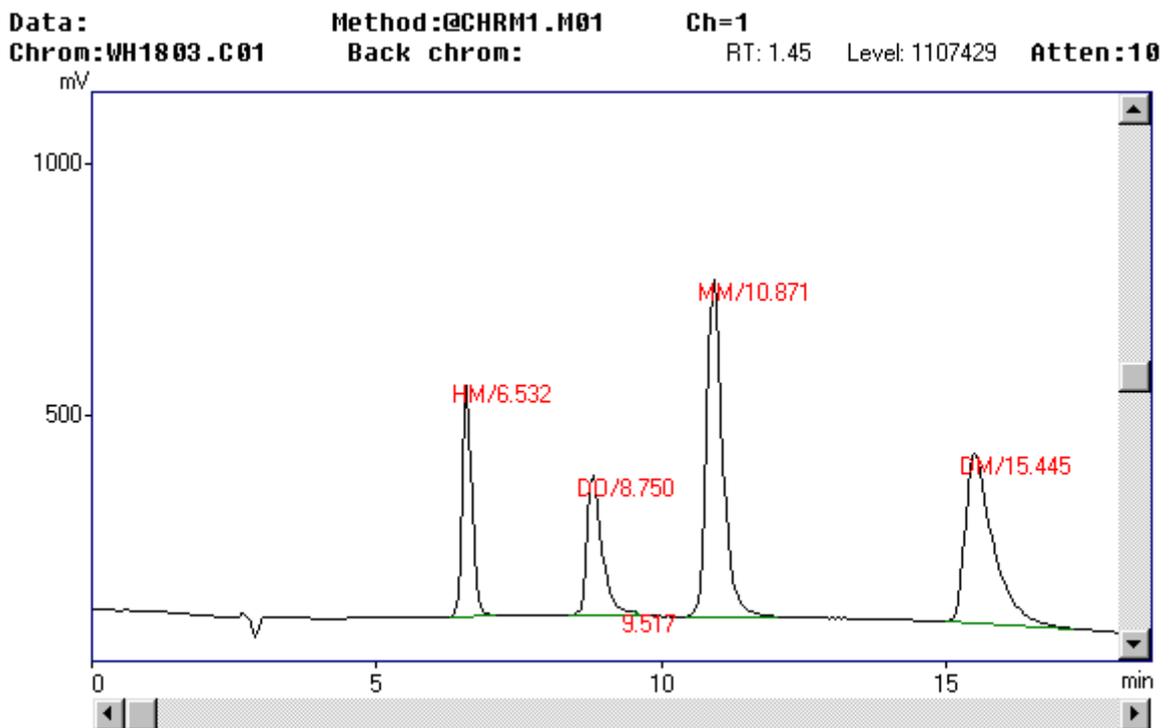


Abb. 2.12: Auftrennung nach Injektion einer Standardlösung mit HM DO MM und DM

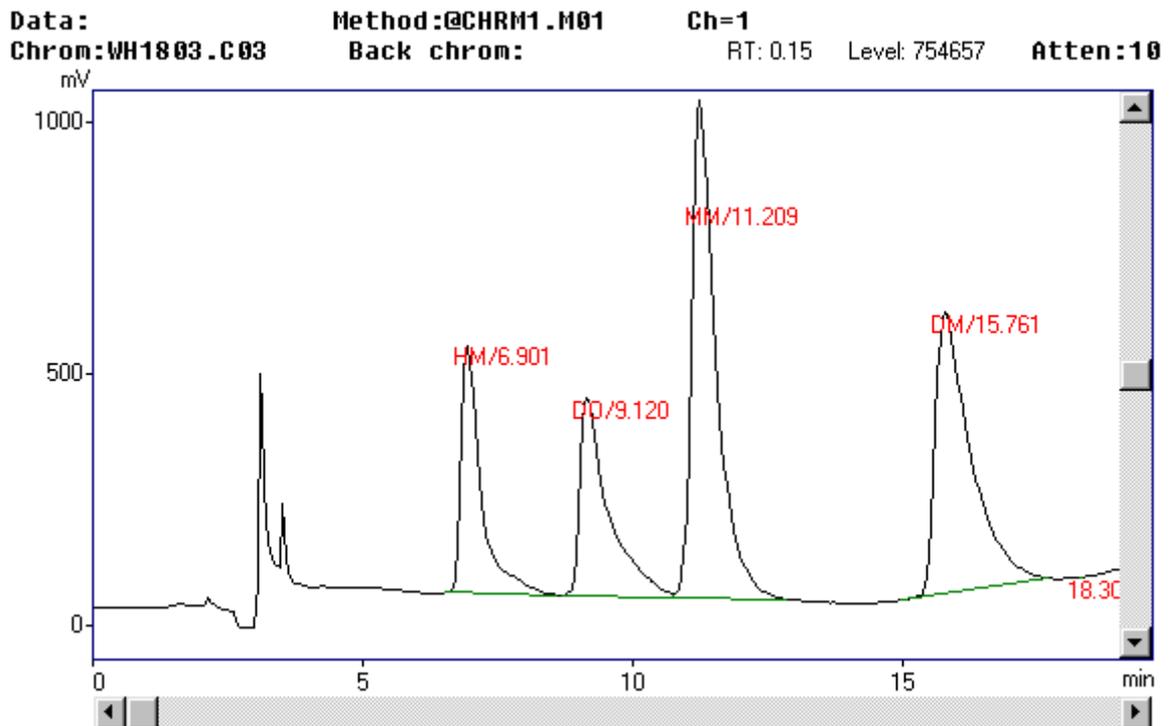


Abb. 2.13: Auftrennung nach Injektion von 200 μ l Plasma mit HM DO MM und DM

Da die Peaks deutliches Tailing aufwiesen, das die Quantifizierung beeinträchtigt, wurde dieses Probenaufbereitungsverfahren für die endgültige Analyse nicht verwendet.

D: Rück-Extraktions-Verfahren

Diesem Probenaufbereitungsverfahren liegt eine sogenannte 2-Schritt-Methode zugrunde, bei der im ersten Schritt die zu extrahierenden Substanzen aus dem Plasma in eine organische Phase überführt werden, um anschließend aus dieser organischen Phase wieder in eine wässrige, saure Phase rückextrahiert zu werden. Diese zweite wässrige

Phase dient als Injektions-Medium der aus dem Plasma extrahierten Substanzen für die HPLC.

Die beiden hier untersuchten Verfahren verwenden lediglich unterschiedliche organische Lösungsmittel für den ersten Schritt der Extraktion, nämlich zum einen *Hexan* und zum anderen *Ethylacetat*.

Folgende Schritte sind bei der Extraktion durchzuführen:

- 1: 1 ml Plasma wird mit 1 ml eines NaHCO₃-Puffers mit dem pH-Wert = 10,5 versetzt.
- 2: Zugabe des organischen Lösemittels, entweder Hexan (6 ml) oder Ethylacetat (5 ml)
- 3: 10 min mischen im Überkopf-Schüttler
- 4: 10 min zentrifugieren bei 3700 U/min
- 5: Abnahme der organischen Phase, Hexan (5 ml) und Ethylacetat (4 ml) und Zugabe von 200 µl 0,1 N H₃PO₄
- 6: 10 min mischen im Überkopf-Schüttler
- 7: 10 min zentrifugieren bei 3700 U/min
- 8: Absaugen der organischen Phase mithilfe einer Glaspipette unter Sog durch eine Wasserstrahlpumpe

Die extrahierten Substanzen befinden sich nun in den 200 µl 0,1 N H₃PO₄, und stehen so für die Injektion und damit der chromatographischen Auftrennung über HPLC zur Verfügung.

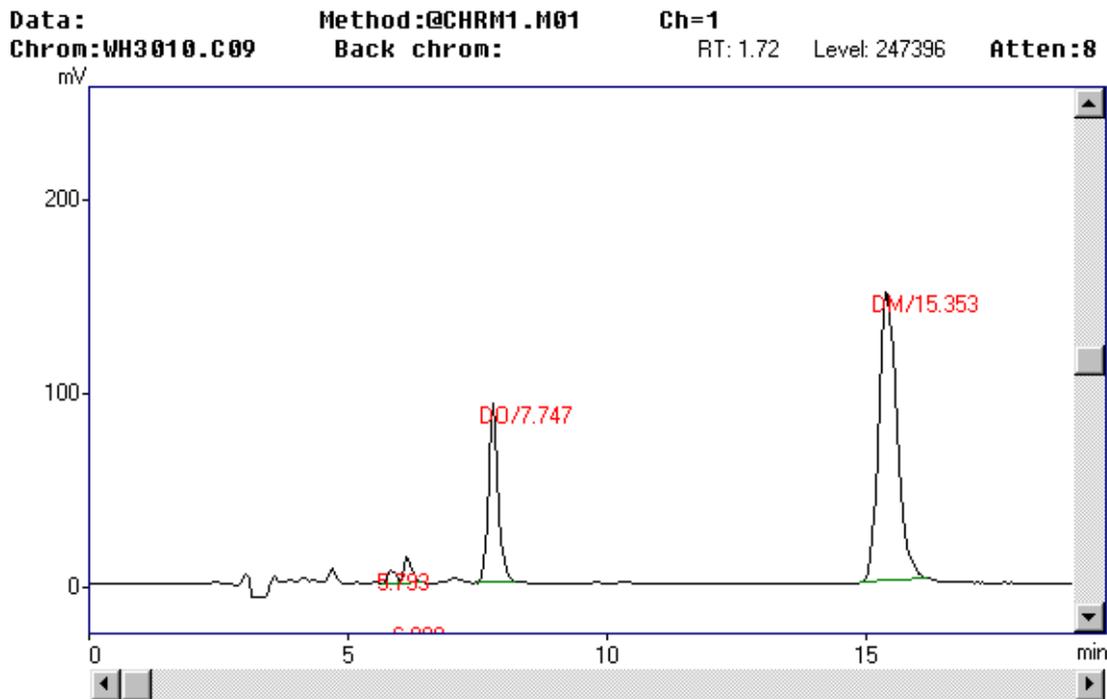


Abb. 2.14: Extraktion mit Hexan ($t_{RDO} = 7,75$ min $t_{RDM} = 15,35$ min)

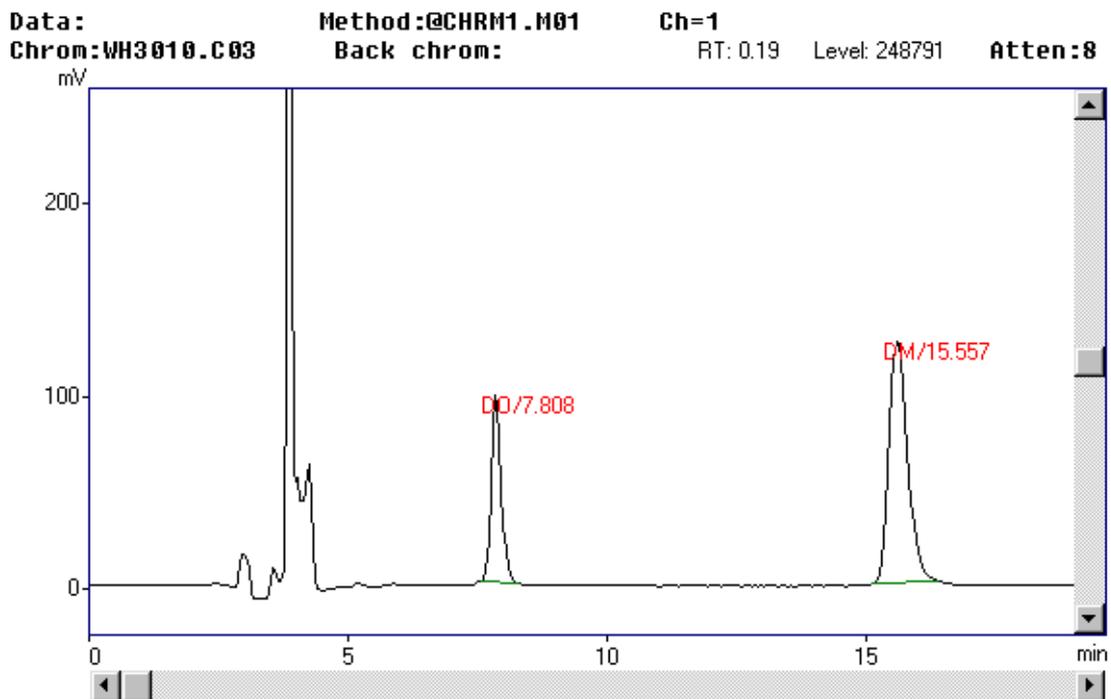


Abb. 2.15: Extraktion mit Ethylacetat ($t_{RDO} = 7,81$ min $t_{RDM} = 15,56$ min)

Ergebnis des Verfahrens D (Rück-Extraktions-Verfahren):

- für DM höhere Extraktionsausbeute mit Hexan (Peakhöhe 150920 μV) als mit Ethylacetat (Peakhöhe 126867 μV)
- für DO höhere Extraktionsausbeute mit Ethylacetat (Peakhöhe 99425 μV) als mit Hexan (Peakhöhe 93317 μV)
- insgesamt saubereres Extrakt mit Ethylacetat, da weniger „Stör-Peaks“ in den Chromatogrammen (Abbildungen 2.14 und 2.15)

Fazit:

Die Optimierung der Probenvorbereitung ergab, dass die Rück-Extraktions-Methode mit Ethylacetat für die Aufarbeitung der Plasmaproben die geeignetste ist, um Dextromethorphan und seine Metabolite aus dem Plasma zu extrahieren, da die Auftrennung und Darstellung mittels HPLC am saubersten und genauesten erfolgt.

2.4.5 Der Dextromethorphan-Phänotypisierungs-Test

Test-Design

Die bisher in der Literatur angewandten Tests zur Phänotypisierung des CYP2D6-Metabolisierungs-Status für Dextromethorphan, verwandten Dextromethorphan als Lösung in einem Konzentrationsbereich von 20 bis 50 mg als Testdosis. Die Patienten/Probanden bekamen Dextromethorphan zumeist in einem Glas Orangensaft verabreicht.

Da nach unserer Erfahrung mit Patienten aus der Psychiatrischen Klinik, für die der Test ja auch speziell konzipiert wurde, das Trinken eines „ominösen“ Saftes mit einer Testdroge versetzt, sehr oft auf Widerwillen stieß, und somit zur Ablehnung des Tests führte, entwickelten wir ein Test-Design, das weitaus größere Akzeptanz bei den Patienten hervorrief.

Wir verwendeten als Testdosis, die in ein bis zwei WICK[®] Formel 44 plus Husten-Pastillen enthaltenen 7,33 bzw. 14,66 mg Dextromethorphan.

Trotz des etwas bitteren Geschmacks, empfanden die Patienten/Probanden es als sehr angenehm und einfach, für einen „hoch-wissenschaftlichen“ Test, ein Hustenbonbon lutschen zu können, und nahmen so die damit verbundene Blutabnahme in Kauf.

Test-Zeitplan

- 1: Einnahme von 1 bis 2 WICK[®] Formel 44 Plus Husten-Pastillen
- 2: Abnahme von 5 bis 10 ml Vollblut, eine Stunde nach Applikation des
Dextromethorphan
- 3: Gewinnung des Plasmas durch Zentrifugieren im Labor
- 4: Einfrieren des Plasmas bei -25 °C bis zur Aufarbeitung

DEXTROMETHORPHAN-TEST ZUR CYP2D6-PHÄNOTYPISIERUNG

Fragestellung: Das cytochrome Enzym CYP2D6 der Leber spielt für die Metabolisierung von manchen Arzneimitteln eine wichtige Rolle. Zwischen 5 bis 10% der Europäer besitzen ein inaktives CYP2D6. Das hat zur Folge, daß sie sogenannte schwache Metabolisierer (poor metabolizer, PM) sind. Personen mit einem intakten CYP2D6 werden als extensive Metabolisierer (extensive metabolizer, EM) bezeichnet. Bei PM können trotz klinisch empfohlener Dosierung eines Medikamentes, das hauptsächlich von CYP2D6 abgebaut wird, toxische Blutspiegel resultieren. Um letzteres zu vermeiden, ist es durchaus sinnvoll, den Metabolisierer-Status (Phänotyp) zu bestimmen.

Vorgehensweise: Zur Phänotypisierung von CYP2D6 eignet sich die Messung der O-Demethylierung von Dextromethorphan. Dazu wird in Anlehnung an Härter 1996 (TherDrugMonit 18, 297) 60 Minuten nach Einnahme von Dextromethorphan die Blutkonzentration von Dextromethorphan und seinen Metaboliten bestimmt:

Achtung: Bei gleichzeitiger Einnahme von **MAO-Hemmern**, darf der Test **nicht** durchgeführt werden.

1: Einnahme eines Hustenbonbons (WICK), welches 7,33 mg Dextromethorphan enthält

Dies ist eine Dosis, die 6-12-jährige Kinder mehrmals am Tag einnehmen können. Bei Erwachsenen sind keinerlei unerwünschte Wirkungen zu erwarten.

Sollten dennoch unerwünschte Wirkungen auftreten, bitten wir Sie, sich mit dem Neurochemischen Labor in Verbindung zu setzen. (**Dr. Kuss, Tel.-Nr. 2731**)

Die Einnahme des Dextromethorphan wird in der Krankenakte dokumentiert.

2: Nach einer Stunde werden in einem Serum-Röhrchen 5 - 10 ml Blut entnommen.

Dies kann mit der Blutabnahme zur Plasmaspiegelbestimmung kombiniert werden, wenn der Patient seine Psychopharmakon-Morgendosis noch nicht eingenommen hat.

Störeinflüsse: Verschiedene Medikamente sind Substrat oder Inhibitor von CYP2D6 (z.B. Paroxetin, Fluoxetin, Metoprolol, Chinidin). Daraus kann ebenfalls ein PM-Status resultieren. **Bei der Anforderung ist es wichtig, die aktuelle Medikation genau anzugeben.**

Lagerung der Proben: Falls die Analysen nicht am gleichen Tag durchgeführt werden, müssen die Proben im Dunkeln und kühl (4°C) gelagert werden. Versand ohne Kühlung (1-2 Tage) möglich. Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum müssen die Proben eingefroren (-20°C) werden.

Analyse: Die Bestimmung erfolgt nach einer HPLC-Methode und Fluoreszenzdetektion. Erfasst werden Dextromethorphan (DM), Dextrophan (DO), Methoxymorphinan (MM) und Hydroxymorphinan (HM).

Auswertung: Die Feststellung des CYP2D6-Metabolisierer-Status erfolgt aus dem Verhältnis der Konzentrationen Dextromethorphan (DM) und Dextrophan (DO).

Bedeutung des CYP2D6-Status: Die Einordnung des Patienten als EM oder PM sollte in den Krankenakten dokumentiert werden.

Bei Feststellung eines Extensive-Metabolizer-Status (EM) mit aktivem CYP2D6:

Der Patient wurde bezüglich seines Metabolisiererstatus mit Hilfe von Dextromethorphan als "Extensive Metabolizer" (EM) klassifiziert, d.h. er besitzt ein aktives Cytochrom P450

Isoenzym vom Typ CYP2D6. Bei der Medikation mit Medikamenten, die von CYP2D6 metabolisiert werden, ist eine normale Pharmakokinetik zu erwarten.

Bei Feststellung eines Poor-Metabolizer-Status (PM) mit nicht aktivem CYP2D6:

Der Patient wurde bezüglich seines Metabolisiererstatus mit Hilfe von Dextromethorphan als "Poor Metabolizer" (PM) klassifiziert, d.h. er besitzt **kein** aktives Cytochrom

P450-Isoenzym vom Typ CYP2D6. Bei der Medikation mit Medikamenten, die von CYP2D6 metabolisiert werden, sollte die Dosis daher reduziert und eine Kontrolle der Blutspiegel durchgeführt werden.

2.4.6 Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite bei Alkoholkranken und Nicht-Alkoholkranken

Die Proben zur Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite stammen aus einer Studie zur Untersuchung der Wirkung des non-kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten Dextromethorphan bei entzogenen Alkoholkranken und gesunden Kontrollpersonen.

Die Personen erhielten Dextromethorphan in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht. Proben wurden 1, 2 und 3 Stunden nach der Applikation der Spiegelbestimmung zugeführt.

2.4.7 Aufarbeitung der Plasmaproben

Phänotypisierungstest:

Für die Phänotypisierung des CYP2D6 mit Dextromethorphan nach Verabreichung der WICK[®] Formel 44 Plus Hustenpastillen wurde zur Extraktion 1 ml Plasma benötigt.

Nach Auftauen des gefrorenen Plasmas wird 1 ml Plasma mit 0,5 ml eines 0,2 M Natrium-Acetat-Puffer (pH = 6.2) und 25µl β-Glucuronidase (Boehringer, Mannheim) versetzt, und bei einer Temperatur von 47°C im Wasserbad für mindestens 1 Stunde inkubiert.

Der pH von 6,2 und die Inkubation bei 47 °C bringt die β -Glucuronidase in den für sie optimalen Aktivitätsbereich, um das Dextromethorphan und seine Metabolite von den

durch den Lebermetabolismus angehängten Zuckerresten abzuspalten, um die Substanzen so ergiebiger extrahieren zu können.

Nach der Inkubation erfolgt die Extraktion nach dem oben aufgeführten Rück-Extraktions-Verfahren mit Ethylacetat als organische Phase.

Das Extrakt, gelöst in den 200 µl der sauren, wässrigen Phase steht dann zur Analyse mit der HPLC zur Verfügung.

Es werden Kalibrationsstandards aus Leerplasma und den Stammlösungen von DM, DO, HM und MM mit den Konzentrationen 4, 40, 400, 1000 und 2000 ng/ml hergestellt

Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite:

Für die Extraktion reicht bereits eine Menge von 200 µl Plasma, da hier Dextromethorphan nahezu in 10-facher Dosis verabreicht wurde.

- 1: 200 µl Plasma mit 100 µl Natrium-Acetat-Puffer (0,2 M, pH = 6,2) und 5 µl β-Glucuronidase werden im Wasserbad bei 47°C mindestens 1 Stunde inkubiert.
- 2: Zugabe von 300 µl Natrium-Bicarbonat-Puffer (pH = 10,5) und 1000 µl Ethylacetat
- 3: 10 Minuten mischen im Überkopf-Schüttler
- 4: 10 Minuten bei 3700 U/min zentrifugieren
- 5: 800 µl des Ethylacetat abnehmen und 200 µl 0,1 M H₃PO₄ hinzufügen
- 6: 10 Minuten mischen im Überkopf-Schüttler
- 7: 10 Minuten bei 3700 U/min zentrifugieren
- 8: Ethylacetat mithilfe einer Glaspipette und Wasserstrahlpumpe absaugen

Dextromethorphan und seine Metabolite sind nun in den 200 µl der sauren, wässrigen Phase gelöst und können so mit der HPLC analysiert werden.

Es werden Kalibrations-Standards aus Leerplasma und den Stammlösungen von DM, DO, HM und MM mit den Konzentration 16, 80, 400, 2000 und 10000 ng/ml hergestellt.

2.4.8 Geräte

Das HPLC-System setzt sich zusammen aus einer Pumpe (LC-9A, Shimadzu), einem Probengeber (Gina 50, Gyncotec) mit einem 6-Wege-Injektionsventil (Rheodyne RH 7000), einem Säulenofen (Gecko-Cil), der analytischen Säule (LiChrospher 100 CN, Merck), einem Fluoreszenz-Detektor (F 1050, Merck-Hitachi) und einem Integrationssystem für Chromatogramme (CR4A, Shimadzu).

2.4.9 Chromatographische Auftrennung

Da nach Verabreichung hoher Dextromethorphanosen in einer Probe zum Teil sehr hohe Konzentrationsunterschiede von Dextromethorphan und seiner Metabolite vorherrschen (16 ng/ml – 10000 ng/ml), zeigten Vorversuche, dass bei kleinen Injektionsvolumina die geringen Konzentrationen nicht mehr nachweisbar sind.

Somit musste für den niedrigen Konzentrationsbereich (16 – 400 ng/ml) ein höheres Injektionsvolumen (150 µl) , respektive für den höheren Konzentrationsbereich (400 – 10000 ng/ml) ein entsprechend kleines Injektionsvolumen (20µl) gewählt werden.

Dadurch wird jede Probe für die zwei Konzentrationsbereiche analysiert.

Die „run time“ für einen Probendurchlauf beträgt 15 bis 20 Minuten.

Der verwendete Eluent ist ein 50 mM Natrium-Hydrogen-Phosphat-Puffer, pH = 3,5 mit 20 % Acetonitril.

2.4.10 Berechnung

Die Peak-Höhen werden anhand einer 3-Punkt-Kalibrierung mit den vorgegebenen Konzentrationen (je nach Konzentrationsbereich) einer gewichteten linearen Regression ($1/y^2$) unterworfen, um den Korrelationsfaktor, die Steigung und den Achsenabschnitt zu berechnen.

2.4.11 Wiederfindung

Die Extraktions-Wiederfindung wird bestimmt durch den Vergleich der Peak-Höhen von Analysen mit extrahiertem Plasma mit den Peak-Höhen von Analysen mit Standardlösungen der gleichen Konzentration. Die Wiederfindungsraten lagen für die 4 gemessenen Substanzen zwischen 79% und 90%.

2.4.12 Bewertung des CYP2D6-Metabolisierungs-Status

Um „poor metabolizer“ (PM) von „extensive metabolizer“ (EM) zu unterscheiden wird das Verhältnis der Konzentrationen von Dextromethorphan zu Dextrorphan herangezogen. Ein Wert von 0,3 wird in der Literatur angegeben, um zwischen PM und EM zu differenzieren.⁷²

2.4.13 Aussage der Spiegelbestimmung

Neben dem Konzentrationsverlauf von Dextromethorphan und seiner Metabolite Dextrorphan, Hydroxymorphinan und Methoxymorphinan über drei Stunden nach der Applikation von Dextromethorphan, kann auch für jeden Probanden der CYP2D6-Metabolisierungs-Typ angegeben werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse

3.1.1 Dextromethorphan-Phänotypisierungs-Test

Dextromethorphan und seine drei Metabolite Dextrorphan (DO), Hydroxymorphan (HO) und Methoxymorphan (MM) wurden mit LiChrospher CN-Material chromatographisch getrennt und mittels Fluoreszenz innerhalb 15 Minuten nach der Injektion in einem einzigen HPLC-Durchlauf detektiert. Interferenzen mit endogenen Plasmabestandteilen waren nicht vorhanden. (Abbildung 3.1)

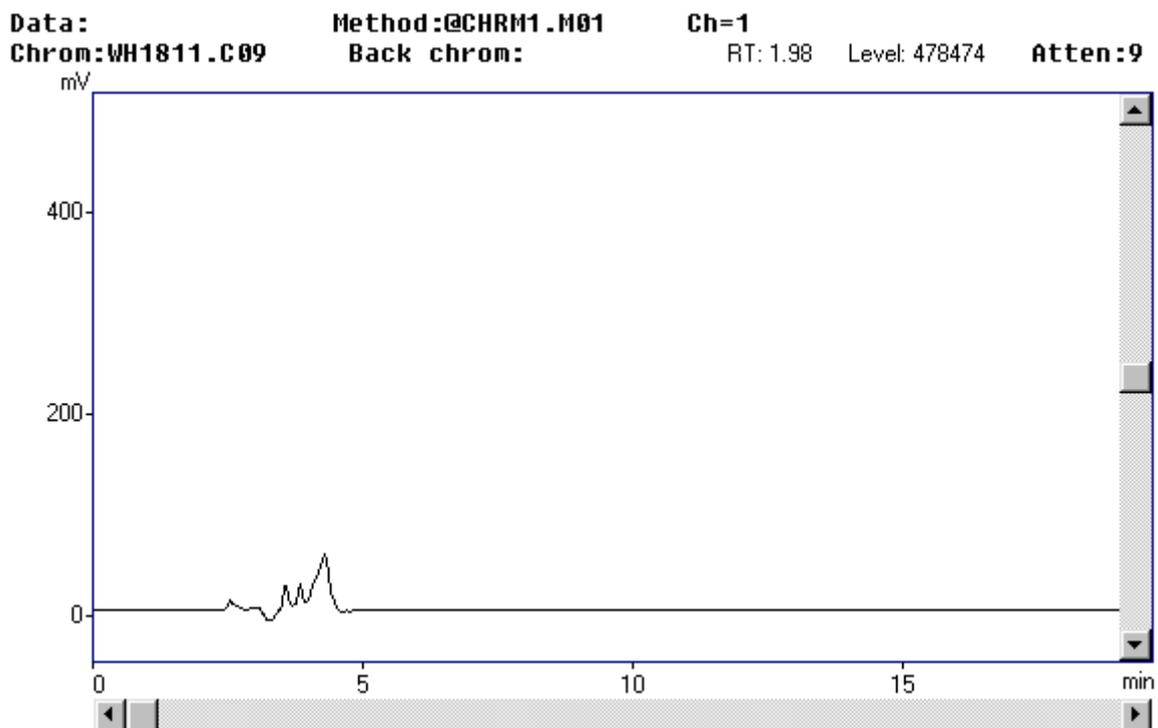


Abb. 3.1: Chromatogramm einer medikamentenfreien Plasmaprobe

In Plasmaproben der "extensive metabolizer" = EM sind die Metabolite Hydroxymorphinan und Dextrorphan in hohen Konzentrationen zu messen, während Dextromethorphan und der Metabolit Methoxymorphinan kaum nachzuweisen sind. (Abbildung 3.2)

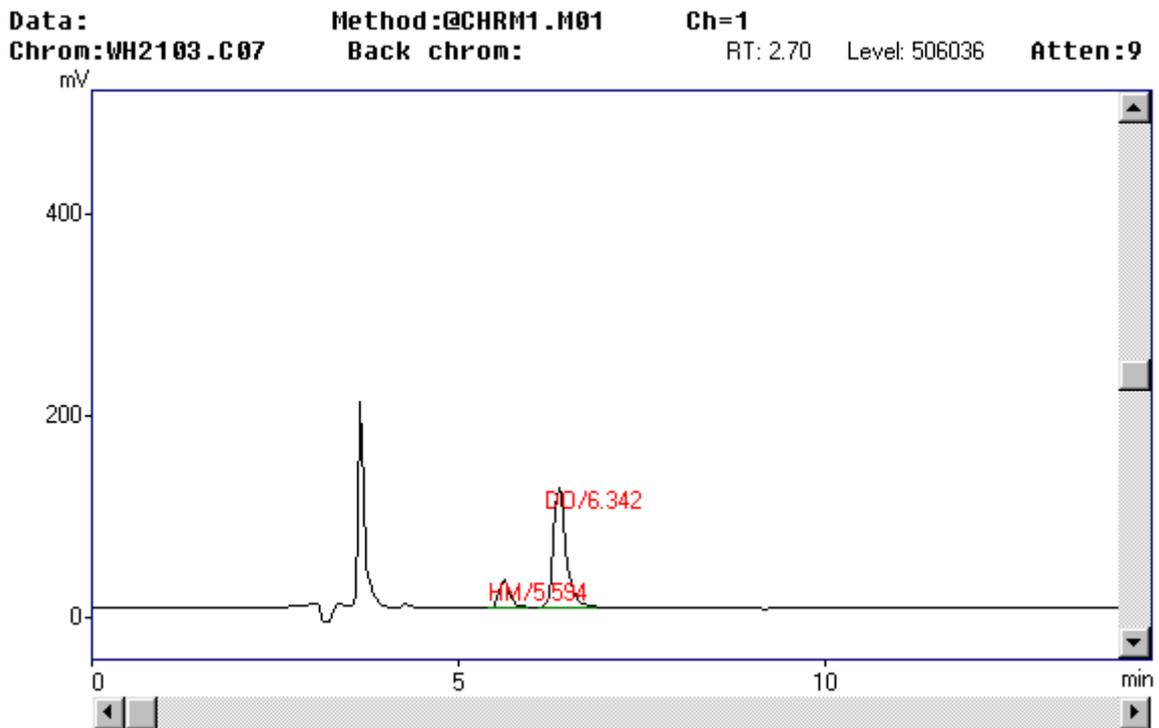


Abb. 3.2: Chromatogramm eines EM

In Plasmaproben der "poor metabolizer" = PM sind die Metabolite Hydroxymorphan und Dextrophan nur in geringen Konzentrationen messbar, Methoxymorphan liegt in der Regel unter der Nachweisgrenze, während Dextromethorphan gut nachweisbar ist. (Abbildung 3.3)

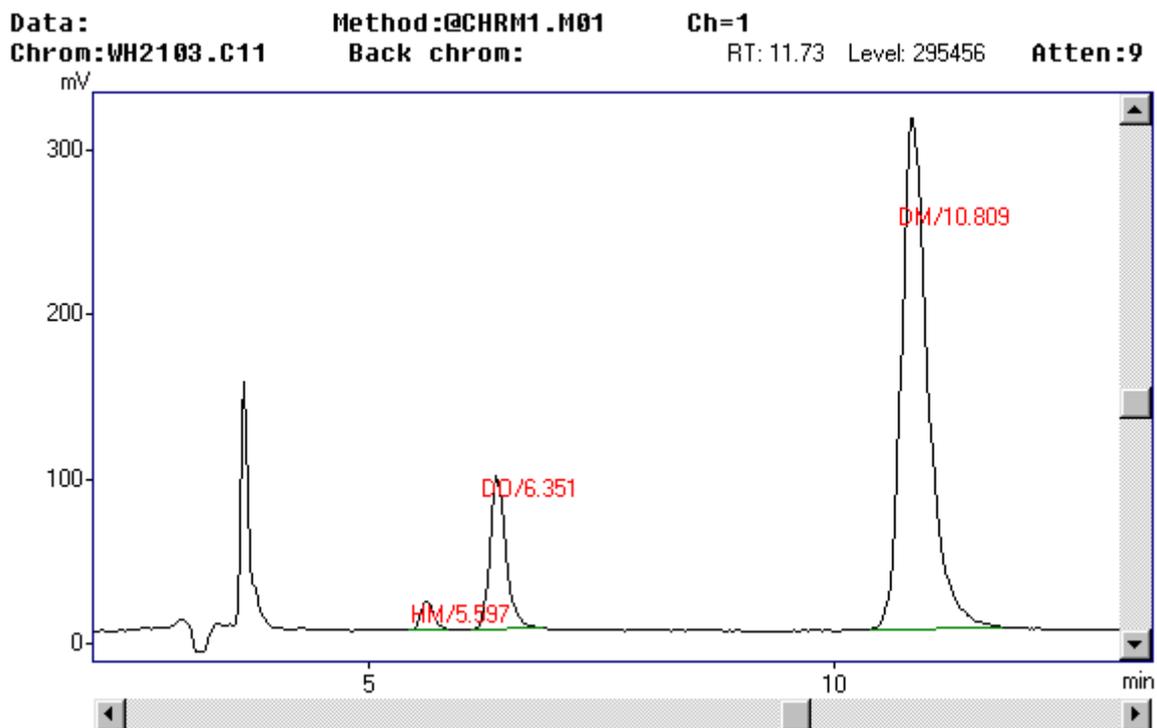


Abb. 3.3: Chromatogramm eines PM

3.1.2 Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite

Dextromethorphan und seine drei Metabolite Dextrophan (DO), Hydroxymorphan (HO) und Methoxymorphan (MM) wurden mit LiChrospher CN-Material chromatographisch getrennt und mittels Fluoreszenz innerhalb 15 bis 20 Minuten nach

der Injektion in einem einzigen HPLC-Durchlauf detektiert. Interferenzen mit endogenen Plasmabestandteilen waren nicht vorhanden. Da das Hauptresultat sich aus den Quotienten von Dextrorphan und Dextromethorphan (CYP2D6) und Hydroxymorphinan und Dextrorphan (CYP3A4) ergibt, wurde auf die Verwendung einer internen Standardsubstanz verzichtet.

Für die Messung wurden fünf Kalibrierungsstandards in den Konzentrationen 16, 80, 400, 2000 und 10000 ng/ml verwendet. Die Proben mit der niedrigsten Konzentration von 16 ng/ml ergaben nach der Extraktion folgende Signal-Rausch-Verhältnisse:

DM 19 DO 12 HM 22 MM 31

Alle Werte liegen somit deutlich über, wenn auch nahe an dem kritischen Schwellenwert von 10.

Die wahren Extraktionswiederfindungsraten sind:

DM 90 % DO 87% HM 68% MM 79%

Die Variationskoeffizienten (VK) einer Serie von 10 Messungen an verschiedenen Tagen zeigt Tabelle 3:

	16 ng/ml	80 ng/ml	400 ng/ml	Proben-Vol.
HM	8,32%	10,08%	1,60%	150 µl
DO	8,32%	10,57%	1,66%	150 µl
MM	12,10%	11,24%	1,66%	150 µl
DM	12,09%	11,67%	2,45%	150 µl

	400 ng/ml	2000 ng/ml	10000 ng/ml	Proben-Vol
HM	4,75%	6,63%	1,08%	20 µl
DO	4,33%	6,16%	1,05%	20 µl
MM	4,53%	6,42%	1,12%	20 µl
DM	6,40%	9,21%	1,66%	20 µl

Tab. 3 VK in Prozent einer Serie von 10 Messungen an verschiedenen Tagen

Da kein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem Sollwert und dem gemessenen Mittel der Einzelkonzentrationen, ist damit auch die Richtigkeit der Messung gewährleistet.

3.2 Auswertung des Dextromethorphan-Phänotypisierungstests

3.2.1 CYP2D6-Aktivität über die O-Demethylierung von Dextromethorphan

In Plasmaproben der "extensive metabolizer" = EM sind die Metabolite Hydroxymorphinan und Dextrorphan in hohen Konzentrationen zu messen, während Dextromethorphan und der Metabolit Methoxymorphinan kaum nachzuweisen sind.

In Plasmaproben der "poor metabolizer" = PM sind die Metabolite Hydroxymorphinan und Dextrorphan nur in geringen Konzentrationen messbar, Methoxymorphinan liegt in der Regel unter der Nachweisgrenze, während Dextromethorphan gut nachweisbar ist.

Um PM von EM zu differenzieren wird das Verhältnis der Konzentrationen von Dextromethorphan zu Dextrorphan herangezogen. Bei einem $DM/DO \geq 0,3$ wird die Person als "poor metabolizer" des CYP2D6-Enzyms klassifiziert. Bei einem $DM/DO < 0,3$ wird die Person als "extensive metabolizer" des CYP2D6-Enzyms klassifiziert.

Unter den 26 Testpersonen, die den Dextromethorphan-Test mit 7,33 mg (n = 11) oder 14,66 mg (n = 15) durchführten, fanden sich 6 "poor metabolizer". Das entspricht einem Anteil von 23%. In der Literatur ist für die kaukasische Rasse ein Anteil von etwa 10% "poor metabolizer" für das CYP2D6-Enzym angegeben.

Das metabolische Verhältnis der Dextromethorphan-O-Demethylierung, berechnet aus den Konzentrationen von DM zu DO zeigt Abbildung 3.4. Die Verhältnisse schwanken zwischen 0,01 und 0,18 für EM und zwischen 0,62 und 35 für PM.

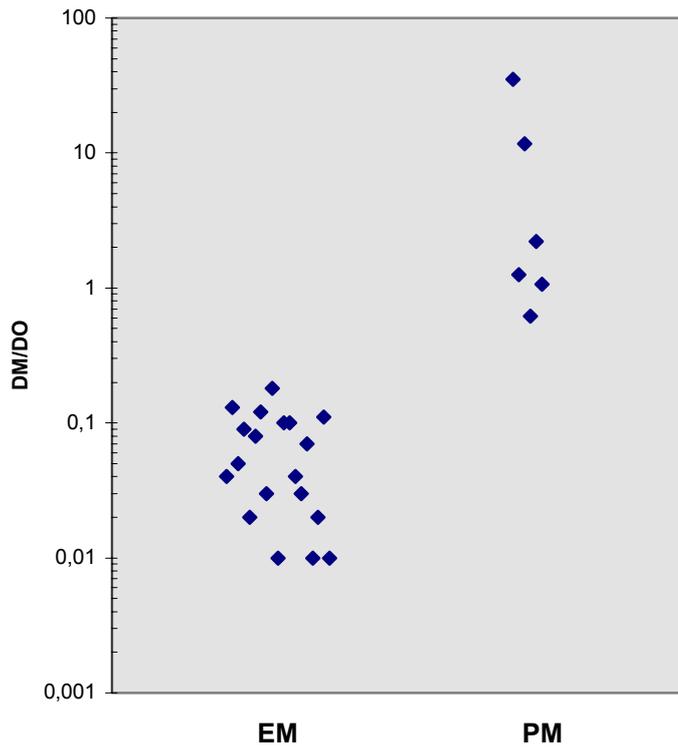


Abb. 3.4: DM/DO für EM und PM

3.2.2 CYP3A4-Aktivität über die N-Demethylierung von Dextromethorphan

Das metabolische Verhältnis der Dextromethorphan-N-Demethylierung, berechnet aus den Konzentrationen von DO zu HM zeigt Abbildung 3.5. Hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen EM und PM. Die Verhältnisse schwanken zwischen 0,06 und 15,71.

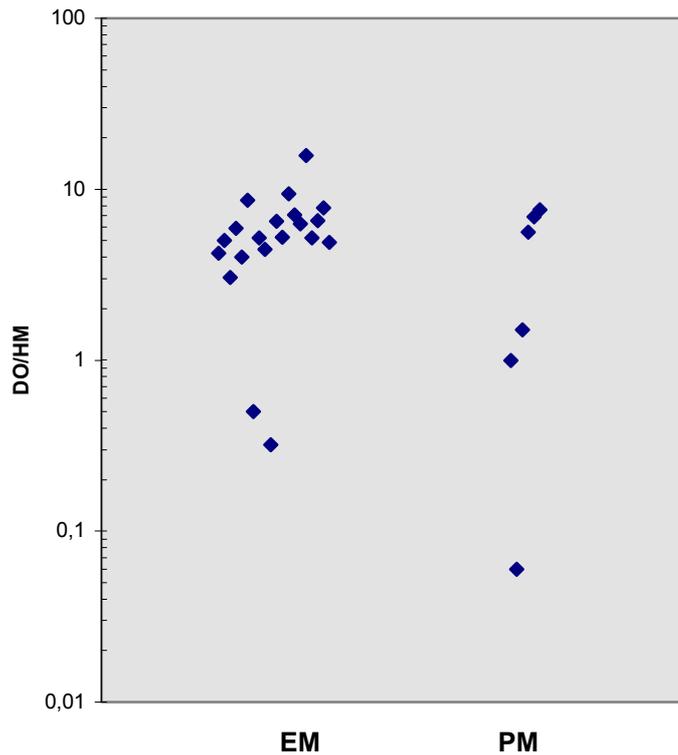


Abb. 3.5: DO/HM für EM und PM

3.3 Auswertung der Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite

3.3.1 Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan und seiner Metabolite

Verglichen wurden die Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan (DM), Dextrorphan (DO) und Hydroxymorphan (HM) im Verlauf von drei Stunden nach der Einnahme von 2 mg/kg KG Dextromethorphan zwischen einer Gruppe frisch entzogener Alkoholabhängiger = Gruppe A und einer Gruppe gesunder Probanden = Gruppe B. (Abbildungen 3.6 bis 3.11)

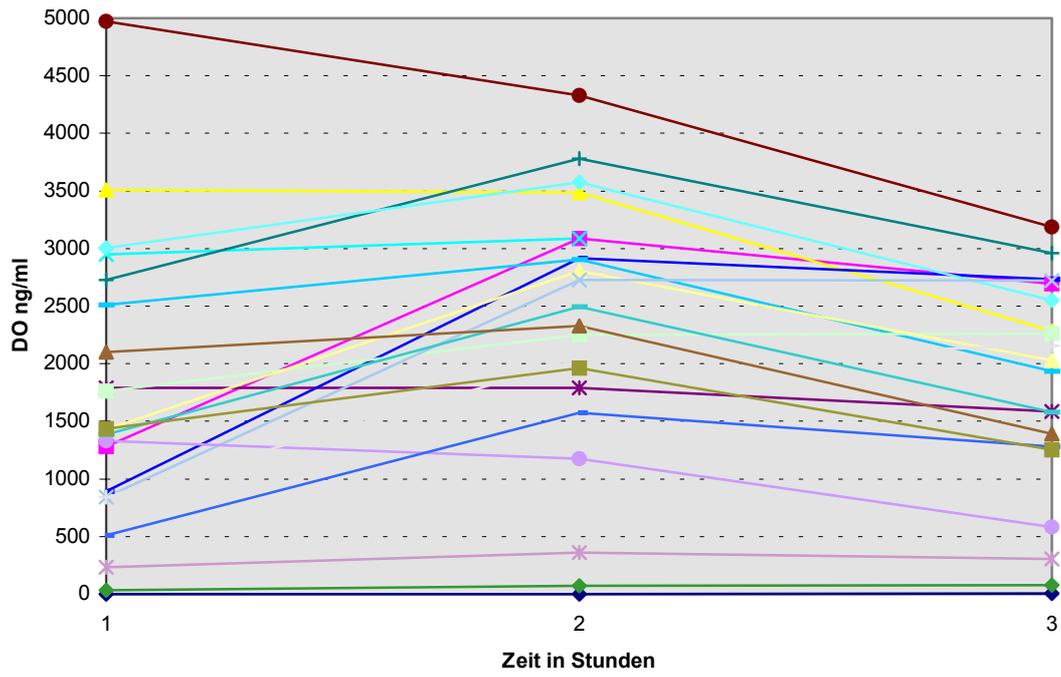


Abb. 3.8: DO im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe A (Alkoholranke)

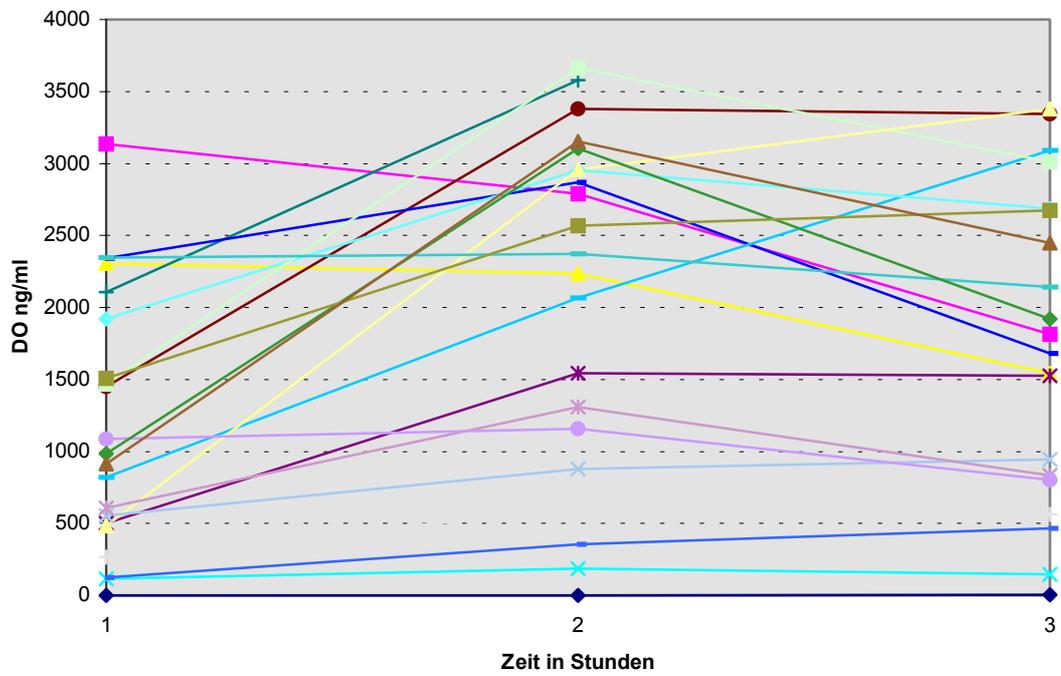


Abb. 3.9: DO im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe B (Gesunde)

3.3.2 DM/DO-Verhältnis im Verlauf

Die Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen den Verlauf von DM/DO bis 3 Stunden nach Applikation von Dextromethorphan.

Die Konzentration von Dextromethorphan liegt oft unter der Nachweisgrenze. Somit ergibt sich für das DM/DO-Verhältnis oft der Wert "NULL", welcher in der logarithmischen Darstellung nicht dargestellt werden kann. Statt jedoch der Konzentration "Null" die Konzentration der Nachweisgrenze für die Berechnung des DM/DO-Verhältnisses einzusetzen⁷³ erscheint nicht gerechtfertigt.

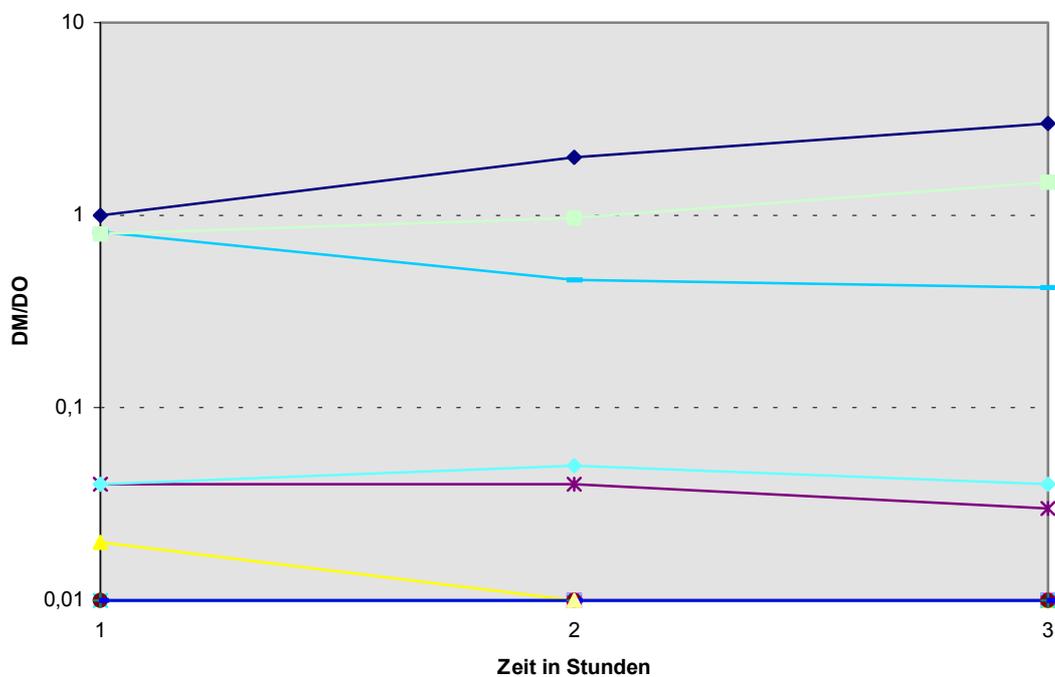


Abb. 3.12: DM/DO im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe A (Alkoholranke)

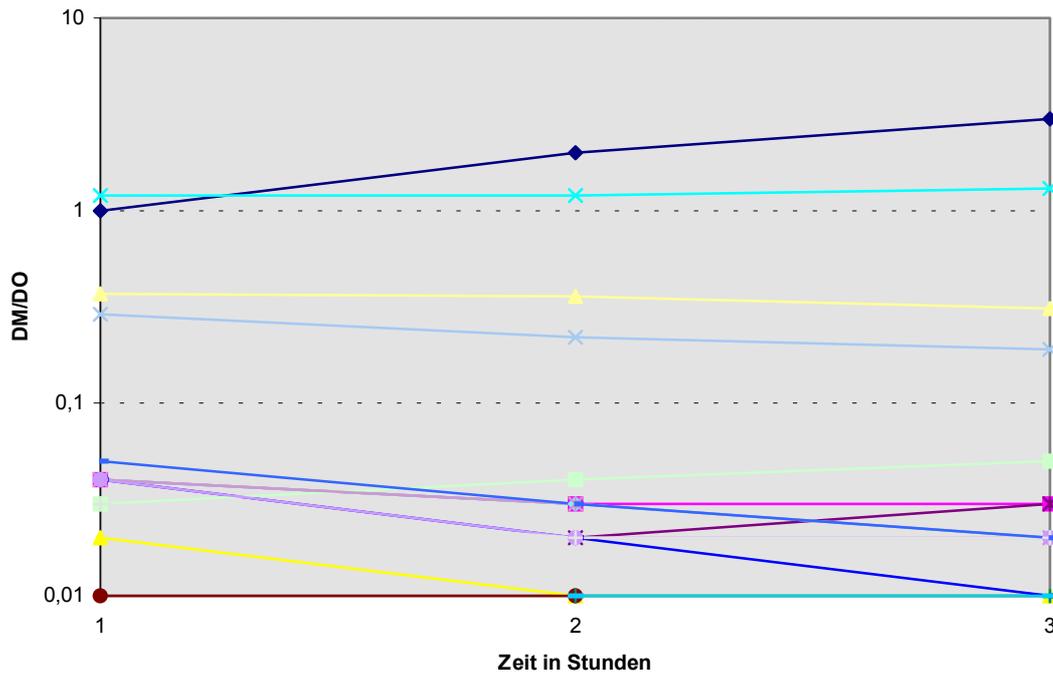


Abb. 3.13: DM/DO im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe B

3.3.3 DO/HM-Verhältnis im Verlauf

Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen den Verlauf von DO/HM bis 3 Stunden nach Applikation von Dextromethorphan

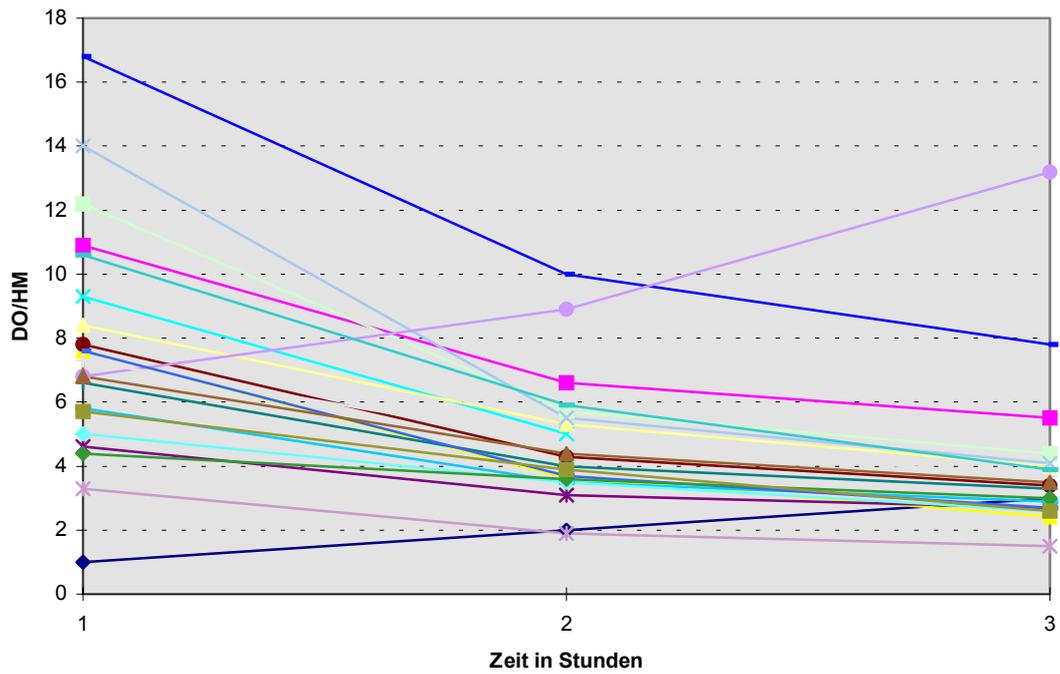


Abb. 3.14: DO/HM im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe A

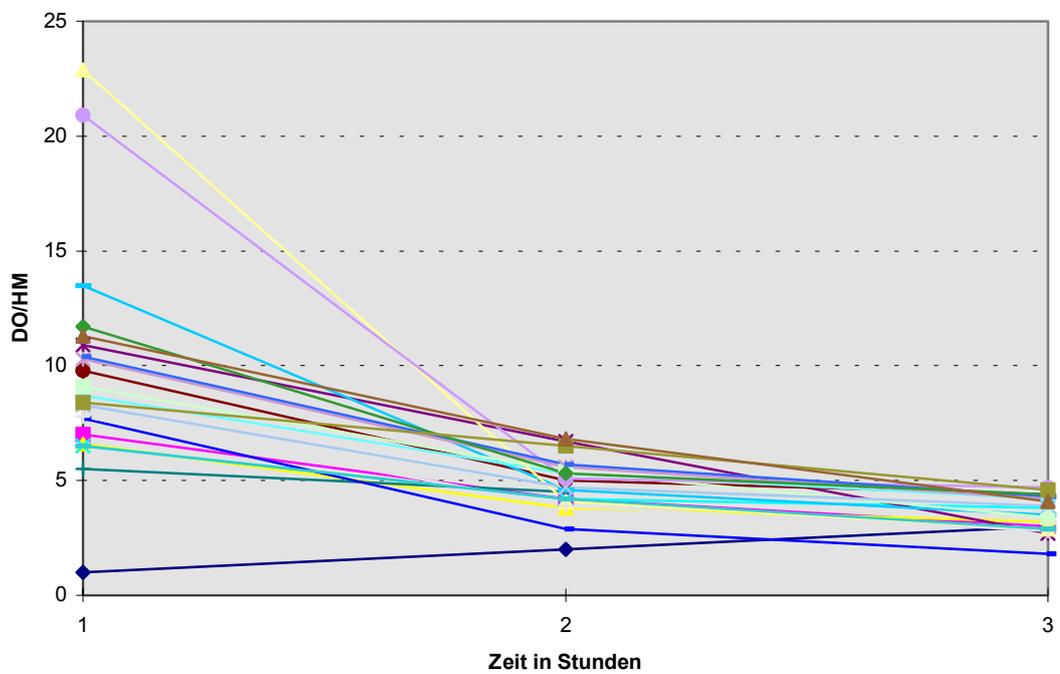


Abb. 3.15: DO/HM im Verlauf von 3 Stunden in der Gruppe B

4 Diskussion

4.1 Dextromethorphan-Phänotypisierungs-Test

4.1.1 CYP2D6-Aktivität über die O-Demethylierung von Dextromethorphan

Um PM von EM zu differenzieren wird das Verhältnis der Konzentrationen von Dextromethorphan zu Dextrorphan herangezogen. Bei einem $DM/DO \geq 0,3$ wird die Person als "poor metabolizer" des CYP2D6-Enzyms klassifiziert. Bei einem $DM/DO < 0,3$ wird die Person als "extensive metabolizer" des CYP2D6-Enzyms klassifiziert.

Unter den 26 Testpersonen, die den Dextromethorphan-Test mit 7,33 mg (n = 11) oder 14,66 mg (n = 15) durchführten, fanden sich 6 "poor metabolizer". Das entspricht einem Anteil von 23%. In der Literatur ist für die kaukasische Rasse ein Anteil von etwa 10% "poor metabolizer" für das CYP2D6-Enzym angegeben. In unserer „Stichprobe“ aus der kaukasischen Rasse fanden sich somit deutlich mehr „poor metabolizer“ als in der Literatur für die kaukasische Rasse beschrieben.⁵⁴

4.1.2 CYP3A4-Aktivität über die N-Demethylierung von Dextromethorphan

Das metabolische Verhältnis der Dextromethorphan-N-Demethylierung berechnet sich aus den Konzentrationen von DO zu HM, welches ein Maß für die Aktivität des CYP3A4 ist.⁷⁴

Hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen EM und PM, somit hat der Metabolisierungsstatus für das CYP2D6 keinen Einfluss auf die CYP3A4-Aktivität.

4.2 Spiegelbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite

4.2.1 Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan und seiner Metabolite

Für die "extensive metabolizer" beider Gruppen ergeben sich zum Beispiel am Zeitpunkt drei Stunden nach der Applikation des Dextromethorphan folgende gemittelte Konzentrationswerte (n = 18):

	<u>Gruppe A:</u>	<u>Gruppe B:</u>
Hydroxymorphinan:	584 ng/ml	584 ng/ml
Dextrorphan:	2070 ng/ml	1991 ng/ml
Dextromethorphan:	25 ng/ml	39 ng/ml

Wenn man jede Substanz zum entsprechenden Zeitpunkt nach der Applikation zwischen beiden Gruppen mittels eines U-Tests korreliert, ergibt sich folgendes:

Für den über die O- und N-Demethylierung des Dextromethorphan entstandenen Metabolit Hydroxymorphinan ergibt sich nur bei einer Stunde nach Applikation ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Gruppen A und B, und zwar dahingehend, dass in der Gruppe der Alkoholkranken (A) die HM-Werte höher liegen. Im weiteren Verlauf lassen sich für HM jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr in den Konzentrationen feststellen.

Das bedeutet, dass innerhalb der ersten Stunde nach Applikation des Dextromethorphan in der Gruppe der Alkoholkranken eine signifikant höhere Metabolisierungsrate von Dextromethorphan zum Metabolit Hydroxymorphinan vorliegt. In der Literatur ist für Menschen mit chronischem Alkoholmissbrauch der beschleunigte Metabolismus über das Cytochrom P450 Enzymsystem der Leber für zahlreiche Substanzen nachgewiesen.^{75 76 77}

Dies gilt somit auch für das Dextromethorphan.

Für den über die O-Demethylierung des Dextromethorphan entstandenen Metabolit Dextrorphan lassen sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von drei Stunden nach Applikation keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Da wie oben gezeigt für Hydroxymorphinan innerhalb der ersten Stunde nach Applikation von Dextromethorphan in der Gruppe der Alkoholkranken ein signifikant höherer Wert vorliegt, jedoch für Dextrorphan kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen nachzuweisen ist, lässt sich daraus schließen, dass der chronische Alkoholmissbrauch eine Aktivitätssteigerung für das CYP3A4, also die N-Demethylierung (Dextrorphan zu Hydroxymorphinan) hervorruft.

Anders bei der Muttersubstanz Dextromethorphan. Hier liegen in der Gruppe B, also der Gruppe der gesunden Vergleichsgruppe (Nicht-Alkoholiker), die mittleren Konzentrationen für Dextromethorphan über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant höher als in der Gruppe A.

Dieses Ergebnis untermauert die oben herausgearbeitete Feststellung, dass in der Gruppe der Alkoholkranken eine höhere Metabolisierungsrate für Dextromethorphan aufgrund von Enzyminduktion durch chronischen Alkoholmissbrauch vorliegen könnte.

4.2.2 DM/DO-Verhältnis im Verlauf

Wenn man die Werte des DM/DO-Verhältnisses zum jeweilig entsprechenden Zeitpunkt nach Verabreichung des Dextromethorphan der beiden Gruppen mittels des U-Testes (Mann-Whitney) korreliert, zeigt sich:

Das DM/DO-Verhältnis in der Gruppe der Nicht-Alkoholkranken (Gruppe B) liegt über dem gesamten Beobachtungszeitraum signifikant höher als in der Gruppe der Alkoholkranken (Gruppe A)

Um so kleiner der Wert für DM/DO, desto potenter ist die Enzymaktivität des CYP2D6. Siehe auch die Differenzierung zwischen den „poor“ und „extensive“ Metabolizer. Somit kann über das DM/DO-Verhältnis die Aussage getroffen werden, dass in der Gruppe der Alkoholkranken eine signifikant höhere Enzymaktivität des CYP2D6 vorliegt.

4.2.3 DO/HM-Verhältnis im Verlauf

Für das DO/HM-Verhältnis ergibt sich im Verlauf von drei Stunden nach der Applikation kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen.

Über den Konzentrationsverlauf der Einzelsubstanzen konnte gezeigt werden, dass zumindest innerhalb der ersten Stunde nach Applikation des Dextromethorphan eine höhere Metabolisierungsrate bei den Alkoholkranken über das CYP3A4 (N-Demethylierung von Dextrorphan zu Hydroxymorphinan) vorliegen könnte.

Wenn man das DO/HM-Verhältnis als Maß für die CYP3A4-Aktivität herannimmt, kann kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen nachgewiesen werden.⁷⁴

4.2.4 CYP2D6-Phänotypisierung

In der Gruppe der Alkoholabhängigen (n = 20) fanden sich 2 "poor metabolizer" für CYP2D6, ebenso in der Gruppe der Probanden (n = 20). Das ergibt einen PM-Anteil von 10% der getesteten Personen, entsprechend den in der Literatur angegebenen Zahlen für die kaukasische Rasse.⁵⁴

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Konzipierung eines Phänotypisierungstests für das Enzym CYP2D6, der im Routineablauf einer Psychiatrischen Klinik einfach und praktikabel durchzuführen ist.

In unserer Stichprobe, die den Phänotypisierungstest mit der geringen Dosis über das Hustenbonbon durchgeführt hatte, befanden sich sogar deutlich mehr „Poor Metabolizer“, nämlich 23%, als die 10%, die in der Literatur beschrieben sind⁵⁴.

Der Metabolisierungsstatus „Extensive Metabolizer“ und „Poor Metabolizer“ der durch die CYP2D6-Aktivität über die O-Demethylierung des Dextromethorphan über das Konzentrationsverhältnis DM/DO definiert ist, hat keinen Einfluss auf die CYP3A4-Aktivität, welche durch die N-Demethylierung von Dextromethorphan über das Konzentrationsverhältnis DO/HM charakterisiert wird.

Analog zu der im Neurochemischen Labor bereits etablierten Nachweismethode der trizyklischen Antidepressiva mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie konnte die Analyse des Dextromethorphan und seiner Metabolite aufgebaut werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Dextromethorphan und seiner Metabolite keine gänzlich neue Analysenmethode erfordert, und Labore mit vorhandener Technik die Bestimmung des CYP2D6 – Metabolisierungsstatus durchführen können.

Unter den verschiedenen Extraktionsverfahren erwies sich das Rück-Extraktions-Verfahren als das zwar aufwendigste, jedoch genaueste und zuverlässigste Verfahren.

Der Variationskoeffizient lag zwischen 7 – 11%.

Die Versuche das Plasma ohne Extraktionsverfahren über die Säulenschaltmethode direkt der HPLC zur Messung zuzuführen zeigten, dass ein Nachweis von Dextromethorphan und seiner Metabolite möglich ist, jedoch das Säulenschalten aufgrund des enormen apparativen Aufwandes und der damit verbundenen höheren Anfälligkeit des Systems für die Masse der Analysen nicht praktikabel genug ist.

Das Hauptaugenmerk der Arbeit richtete sich auf den Verlauf der Spiegel von Dextromethorphan und seiner Metabolite bei entzogenen Alkoholkranken drei Wochen nach erfolgtem Entzug und gesunden Kontrollpersonen. Diese Personen erhielten eine auf das Körpergewicht bezogene Dosierung (2mgDextromethorphan/kg KG), im Mittel 140 mg, im Vergleich zu 14 mg beim Bonbontest (enthalten in 2 WICK Formel 44 Plus Hustenpastillen)

Aufgrund der hohen Dosierung von Dextromethorphan traten in einer Probe sehr hohe Konzentrationsunterschiede (16 ng/ml bis 10000 ng/ml) zwischen der Muttersubstanz und ihren Metaboliten auf. Deshalb wurde eine Probe jeweils für einen niedrigen und einen hohen Konzentrationsbereich analysiert. Über unterschiedliche Injektionsvolumina, 20 µl für den Konzentrationsbereich 16 – 400 ng/ml und 150 µl für den Konzentrationsbereich 400 – 10000 ng/ml konnte dieses Problem gelöst werden.

Die Auswertung der Konzentrationsverläufe von Dextromethorphan, Hydroxymorphan, Dextrorphan und Methoxymorphan bei Alkoholkranken und Nicht-Alkoholkranken zeigte, dass in der Gruppe der Alkoholkranken innerhalb der ersten Stunde nach Applikation von Dextromethorphan, signifikant mehr Hydroxymorphan entsteht als in der Gruppe der Nicht-Alkoholkranken.

Die Konzentration für Dextromethorphan liegt in der Gruppe der Nicht-Alkoholkranken (n = 18) mit im Mittel 40 ng/ml über dem gesamten Beobachtungszeitraum signifikant höher als bei den Alkoholkranken (n = 18) mit im Mittel 25 ng/ml.

Die Auswertung des Konzentrationsverhältnisses DM/DO als Maß für die CYP2D6-Aktivität erbrachte ein signifikant höheres DM/DO-Verhältnis in der Gruppe der Nicht-Alkoholkranken. DM/DO = 0,025 (Gesunde) versus DM/DO = 0,015 (Alkoholkranke).

Die Auswertung des Konzentrationsverhältnisses DO/HM als Maß für die CYP3A4-Aktivität erbrachte keinen Unterschied der beiden Gruppen.

Sowohl die höheren Dextromethorphanwerte und die höheren Werte des DM/DO-Verhältnisses in der Gruppe der Gesunden, als auch die höheren 1-Stunden-Werte des Hydroxymorphinan bei den Alkoholkranken sprechen für eine geringere Aktivität des CYP2D6 bei den Nicht-Alkoholkranken, respektive eine höhere Aktivität des CYP2D6 bei den Alkoholkranken.

Die Ergebnisse zeigen, dass chronischer Alkoholmissbrauch einen induktiven Effekt auf das CYP2D6 hat und dass dieser Effekt zumindest drei Wochen in die Abstinenzphase hineinreicht.

Da es bisher noch keine Untersuchungen zum Dextromethorphanmetabolismus bei Alkoholkranken gab, lassen sich unsere Beobachtungen noch nicht anhand vergleichbarer Studienergebnisse diskutieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Omura T, Sto R, Cooper DY, Rosenthal O, Estabrook W. Function of cytochrome P450 of microsomes. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 1965; 24: 1181-9
2. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1993; 12: 1-15
3. Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 945-93
4. Nebert DW. Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1203-14
5. Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant „warfare“, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990; 6: 182-6
6. Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 1989; 19: 1149-60
7. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987; 6: 1-11
8. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6 (1): 1-42
9. Guengerich FP. Bioactivation an detoxication of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metab Dispos* 1993; 21: 1-6
10. Kalow W, Tang B. Caffeine as a metabolic probe: exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 44-8
11. Ged C, Umbenhauer DR, Bellew TM, Bork RW, Srivastava PK, Shinriki N, Lloyd RS, Guengerich FP. Characterization of cDNAs, mRNAs, and proteins related to human liver microsomal cytochrome P450 (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase. *Biochemistry* 1988; 27:6929-40

12. Lieber CS. Biochemical factors in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 13:136-53
13. Eichelbaum M, Minehita S, Ohnhaus E, Zekorn C. The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 22: 49-53
14. Brosen K. Recent developments in hepatic drug oxidation: implications for clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1990; 18:220-39
15. Kaye CM, Haddock RE, Langley PF, Mellows G, Tasker TCG, Zussman BD, Greb WH. A review of the metabolism and pharmacokinetics of paroxetine in man. *Acta Psychiatr Scand* 1989; 80 (suppl 350): 60-75
16. Sindrup SH, BrAFsen K, Gram LF, Hallas J, Skjelbo E, Allen A, Allen GD, Cooper SM, Mellows G, Tasker TCG, Zussam BD. The relationship between paroxetine and the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51: 278-87
17. Siddoway LA, Thompson KA, McAllister CB, Wang T, Wilkinson GR, Roden DM, Woosley RL. Polymorphism of propafenone metabolism and disposition in man: clinical and pharmacokinetic consequences. *Circulation* 1987; 75: 785-91
18. Ward SA, Walle T, Walle UK, Wilkinson GR, Branch RA. Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquin hydroxylase activities. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 45: 72-9
19. Meese C, Fischer C, Eichelbaum M. Stereoselectivity of the 4-hydroxylation of debrisoquine in man, detected by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1988; 15: 63-6
20. Otton SV, Inaba T, Kalow W. Competitive inhibition of spareine oxidation in human liver by β -adrenoceptor antagonists and other cardiovascular drugs. *Life Sci* 1984; 34: 73-80
21. Cholerton S, Daly AK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13:434-9
22. Wrighton S, Stevens J. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22: 1-21
23. Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 346-52

24. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, VandenBranden M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 207-13
25. Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 171-84
26. Watkins PB. Role of cytochromes P450 in drug metabolism and hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 235-50
27. Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *L Clin Invest* 1992; 90: 1871-8
28. Schuetz EG, Schuetz JD, Grogan WM, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Raucy J, Guzelian P, Gionela K, Watlington CO. Expression of cytochrome P4503A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294:206-14
29. Ged C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Bories P, Michel H, Beaune P, Maurel P. The increase in urinary excretion of 6 β -hydrocortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III A induction. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28: 373-87
30. Waxman D, Attisano C, Guengerich P, Lapenson D. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 β -hydroxylase cytochrome P450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263: 424-36
31. Shou M, Grogan J, Mancewicz Ja, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Korzekwa KR. Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* 1994; 33: 6450-5
32. De Vane CL. Pharmacogenetics and drug metabolism of newer antidepressant agents. *J Clin Psychiatry* 1994; 55 Suppl. 12: 38-45
33. Möller HJ, Laux G, Deister A. Psychiatrie (Duale Reihe); *Hippokrates Verlag*; 1995: 295-296
34. Lovinger DM. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res*; 1993; 17:19-27
35. Morgan PF, Nadi NS, Karanian J, Linnoila M. Mapping brain structures activated during ethanol withdrawal: role of glutamate and NMDA receptors. *European Journal of Pharmacology*; 1992; 225: 217-223

36. Danysz W, Jankowska E, Glazewski S, Kostowski W. The Involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*; 1992; 16: 499-504
37. Danysz W, Parsons CG, Bresink I, Quack G. Glutamate in CNS disorders. A revived target for drug development? *DN&P* 8; 1995; 261-277
38. Trevisan L, Fitzgerald LW, Brose N, Gasic GP, Heinemann SF, Duman RS, Nestler EJ. Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDA R1 subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J Neurochem* 62; 1994, 62: 1635-1638
39. Schmider J, Greenblatt DJ, von Moltke LL, et al. Relationship of in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics and drug interactions: implications for diazepam disposition in humans. *J Clin Psychopharmacol* 1996; 16 (4): 267-72
40. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*; 1994; 51:199-214
41. Krystal JH, Petrakis IL, Webb E, Cooney NL, Karper LP, Namanworth S, Stetson P, Trevisan LA, Charney DS. Dose-related-like effects of the NMDA antagonist, ketamine, in recently detoxified alcoholics. *Arch Gen Psychiatry*; 1998; 55: 9-19
42. Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology*; 1998; 20: 106-118
43. Torella FC. Dextromethorphan and neuromodulation: old drug coughs up new activities. *Trends Pharmacol Sci*; 1989; 10: 501-507
44. Bisaga A, Gianelli P, Popik P. Opiate withdrawal with dextromethorphan. *Am J Psychiatry*; 1997; 154: 584
45. Tao PL, Yeh GC, Su CH, Wu YH. Co-administration of dextromethorphan during pregnancy and throughout lactation significantly decreases the adverse effects associated with chronic morphine administration in rat offspring. *Life Sci*; 2001; 69: 2439-2450
46. Wadhwa A, Clarke D, Goodchild CS, Young D. Large-dose oral dextromethorphan as an adjunct to patient-controlled analgesia with morphine after knee surgery. *Anesth Analg*; 2001; 92: 448-454

47. Ladona MG, Lindstrom B, THyr C, Dun-Ren P, Rane A. Differential foetal development of the O- and N-demethylation of codein and dextromethorphan in man. *Br J Clin Pharmacol Ther* 1992; 32(3): 295-302
48. Jacqz-Aigrain E, Cresteil T. Cytochrome P450-dependent metabolism of dextromethorphan: fetal and adult studies. *Dev Pharmacol Ther* 1992; 18(3-4):161-8
49. Jacqz-Aigrain E, Funck-Brentano C, Cresteil T. CYP2D6- and CYP3A-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. *Pharmacogenetics* 1993; 3(4): 197-204
50. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD. Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994 Jul 5; 48(1): 173-82
51. Kerry NL, Somogyi AA, Bochner F, Mikus G. The role of CYP2D6 in primary and secondary oxidative metabolism of dextromethorphan: in vitro studies using human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38(3): 243-8
52. Pfaff G, Briegel P, Lamprecht I. Inter-individual variation in the metabolism of dextromethorphan. *Int J Pharm* 1983; 14: 173-89
53. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Pharmacol* 1979; 16(3): 183-7
54. Bertilsson L, Lou YQ, Du YL, Liu Y, Kuang TY, Liao XM, Wang KY, Reviriego J, Iselius L, Sjoqvist F. Pronounced differences between native chinies and swedish populations in the polymorphic hydroxylation of debrisoquine and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51(4): 388-97
55. Apland JP, Braitman DJ. Effects of non-opioid antitussives on epileptiform activity and NMDA responses in hippocampal and olfactory cortex slices. *Brain Res* 1990; 529: 277-285
56. Wong BY, Coulter DA, Choi DW, Prince DA. Dextrophan and Dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices. *Neurosci Lett* 1988; 85: 261-266
57. Carpenter CL, Marks SS, Watson DL, Greenberg DA. Dextromethorphan and Dextrophan as calcium channel antagonists. *Brain Res* 1988; 439: 372-375
58. Netzer R, Pflimlin P, Trube G. Dextromethorphan blocks N-methyl-D-aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1993; 238: 209-216
59. Tortella FC, Pellicano M, Bowery NG. Dextromethorphan and neuromodulation: old drug coughs up new activities. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 501-507
60. Fisher RS, Cysyk BJ, Lesser RP, Pontecorno MJ, Ferkany JT, Schwerdt PR. Dextromethorphan for treatment of complex partial seizures. *Neurology* 1990; 40: 547-549

61. Unger KK (Hrsg.). Handbuch der HPLC Teil I - Leitfaden für Anfänger und Praktiker. *GIT - Verlag, Darmstadt, 1989*
62. Aced G, Möckel HJ. Liquidchromatographie - apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. *Verlag Chemie Weinheim, 1991*
63. Bayer E, Paulus A, et al. *J Chromatography* 364; 1986; 25
64. Chen ZR, Somogyi AA, Bochner F. Simultaneous Determination of Dextromethorphan and three metabolites in Plasma and Urine using HPLC with application to their disposition in man. *Ther Drug Monit*; 1990; 12: 97-104
65. Kuss HJ. Schriftliche Mitteilung zur Integration chromatografischer Daten
66. Solvent Delivery Module LC-9A. Shimadzu HPLC Instruction Manual
67. HPLC Column Heater. GECKO-CIL. Operating Instructions
68. Gina 50 Probengeber. Gyncotek. Bedienungsanleitung
69. Certification of Analysis. LiChrospher 100 CN. Merck KGaA
70. Florescence Detector Model F-1050. Hitachi. Instruction Manual
71. Kuss HJ. Schriftliche Mitteilung zur Auftrennung von DM und seiner Metabolite mittels HPLC.
72. Baumann P, Jonzier-Perey M. GC and GC-MS procedures for simultaneous phenotyping with dextromethorphan and mephenytoin. *Clin Chim Acta* 1988; 171: 211-22
73. De Zeeuw RA, Eikema D, Franke JP, et al. A rapid thin layer chromatographic procedure to identify poor and extensive metabolizers in man using dextromethorphan. *Pharmazie* 1992; 47: 346-8
74. Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *Journal of Chromatography B*; 1996; 678: 113-128

75. Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, Kostrubsky V, Szakacs J, Wood S, Sinclair P. Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochem Biopharmacol*; 1998; 55: 1557-1565
76. Riggs JE. Alcohol associated rhabdomyolysis: ethanol induction of cytochrome P450 may potentiate myotoxicity. *Clin Neuropharmacol*; 1998; 21: 363-364
77. Brackett CC, Bloch JD. Phenytoin as a possible cause of acetaminophen hepatotoxicity: case report and review of the literature. *Psychopharmacotherapy*; 2000; 20: 229-233

Danksagung

Als Leiter des Neurochemischen Labors der Psychiatrischen Klinik der LMU München, Herrn Prof. Dr. med. M. Ackenheil, gilt ihm mein außerordentlicher Dank in seiner Abteilung den Dextromethorphan-Metabolismus mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als Thema der Doktorarbeit untersucht zu haben.

Als ich im Herbst 1997 als Neuling in der Laborchemie mit der Bearbeitung des Themas anfang, kam es mir sehr entgegen, dass das nette und sehr aufgeschlossene Team der Neurochemischen Abteilung neben ihrer Routine- und Forschungsarbeit sich Zeit nahmen, einem frischen Doktoranden stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Nur so war es mir möglich, mich zügig in die Materie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie einzuarbeiten.

Für die Gewinnung des Probenmaterials zur Spiegelbestimmung des Dextromethorphan und seiner Metanolite ein herzliches Dankeschön der Arbeitsgruppe unter Dr. med. M. Soyka und Dr. med. C. G. Schütz.

Ganz besonders geht mein Dank an Dr. rer. nat. H. J. Kuss, der mich sowohl in den praktischen Dingen bei der Anwendung der HPLC aber vor allem auch in den theoretischen Belangen stets mit seiner Kompetenz in einer sehr angenehmen und freundlichen Art betreute.

Für meinen persönlichen Werdegang sehe ich es als absolute Bereicherung, mich in eine der wichtigsten laborchemischen Analysenmethoden, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, eingearbeitet zu haben, um damit den Metabolismus des Dextromethorphan zu untersuchen. Mich faszinierte, mit dieser schon so lange bekannten Substanz Dextromethorphan, einen für diesen Stoff neuen Anwendungsbereich mit zu erschließen.

Auch wenn die Arbeit mit Dextromethorphan nur einen sehr kleinen bruchstückhaften Teil aus dem doch so riesigen Bereich der CYP-Enzyme und des Medikamentenstoffwechsels im Bereich der Suchtforschung erfasst, bin ich fest überzeugt, dass durch weiterführende Untersuchungen dem Dextromethorphan in Zukunft eine wichtige Rolle zukommen wird.

Tübingen, im März 2003

Lebenslauf von **Wolfgang Heumüller**

Geburtsdatum: 08.09.1970
Geburtsort: Goroka / Papua Neuguinea
Familienstand: verheiratet
Wohnort: In der Klinge 9, 72127 Kusterdingen

Schulbildung:

1976 – 1981 Grundschule Mönchsdeggingen / Bayern
1981 – 1990 Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen / Bayern

Studium:

1992 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
in München
1998 – 1999 Praktisches Jahr:
- Innere Medizin: Medizinische Klinik Ziemssenstraße München
- Chirurgie: Dr. von Haunersches Kinderspital München
- Anästhesie: Kreiskrankenhaus Traunstein
April 1999 Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote -sehr gut (1,49)-

Arzt im Praktikum:

01.12.1999 – 31.05.2001 Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Universität München

Assistenzarzt:

Seit 01.06.2001 Herz- Thorax- Gefäßchirurgie an der Universitätsklinik der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Promotion:

Seit 1997 Prof. Dr. med. Ackenheil / Dr. Kuss
Neurochemisches Labor der Psychiatrischen Klinik,
Nussbaumstrasse München

Thema: CYP2D6-Phänotypisierung und Bestimmung des Dextromehorphan-
Metabolismus mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Sonstiges:

- Wehrdienst als Gebirgssanitäter in Kempten und Landshut 1990 – 1991
- Auslandsfamulaturen in Nordirland 1996
- Hobbys: Ausdauersportarten, Bergsport, Kirchenmusik