

Die quantitative Bestimmung von Mefexamid und dessen Hauptmetaboliten Desmethyl-Mefexamid im menschlichen Harn nach Einnahme einer therapeutischen Dosis

W. Gielsdorf* und M. Herper

Direktion Polizeitechnische Untersuchungen, Gothaer Straße 19, D-1000 Berlin 62

Quantitative Determination of Mefexamide and Its Main Degradation Product Desmethyl-Mefexamide in Human Urine After Ingestion of Therapeutic Doses

Summary. After oral ingestion of 400 mg Mefexamidehydrochloride for Mefexamide (I) and its main degradation product Desmethyl-Mefexamide (II) the following pharmacokinetic parameters have been determined:

1. Elimination of I and II follows 1st order kinetics.
2. Biological half-life $t_{1/2}$ for I is 4-6, for II 4.5-6.5 h.
3. Elimination rate constant for I and II is between 0.10 to 0.20 h⁻¹.
4. 5-10% of the administered drug are excreted unchanged, 10-16% as Desmethyl-Mefexamide within 72 h after ingestion.
5. The described thinlayer chromatographic and gas chromatographic/mass spectrometric methods allow detection of I and II for at least 72 h after application.
6. II is excreted free and conjugated in nearly equal amounts.

Key words: Mefexamide, pharmacokinetics - Desmethyl-Mefexamide

Zusammenfassung. Nach oraler Einnahme von 400 mg Mefexamidhydrochlorid wurden für die Ausscheidung von Mefexamid (I) und dessen Hauptmetaboliten Desmethyl-Mefexamid (II) im menschlichen Harn die folgenden pharmakokinetischen Parameter bestimmt:

1. Die Eliminierung von I und II erfolgt nach einer Kinetik 1. Ordnung.
2. Die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ beträgt für I 4-6, für II 4,5-6,5 h.
3. Die Eliminationskonstante k_2 liegt für I und II zwischen 0,10 und 0,20 h⁻¹.
4. 5-10% der eingenommenen Dosis werden unverändert, 10-16% als Desmethyl-Mefexamid innerhalb 72 h nach Applikation ausgeschieden.

* *Neue Adresse:* LAB-MS GmbH, Brühlweg 23, D-7910 Neu-Ulm 4, FRG

5. Der dünn-schichtchromatographische und gaschromatographisch/massenspektrometrische Nachweis der Verbindungen gelingt mit den angegebenen Methoden problemlos bis mindestens 72 h nach Einnahme.
6. Verbindung II wird zu etwa gleichen Teilen frei und konjugiert ausgeschieden.

Schlüsselwörter: Mefexamid, Pharmakokinetik – Desmethyl-Mefexamid

I. Einführung

In einer ersten Mitteilung [1] wurde über die renalen Ausscheidungsprodukte des Mefexamid und deren Nachweis mit verschiedenen chromatographischen und spektroskopischen Methoden, insbesondere der Dünnschichtchromatographie (DC) und Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS), berichtet.

Außerdem wurde das analytische Profil der Reinsubstanz (I) und ihres Hauptmetaboliten Desmethyl-Mefexamid (II) erarbeitet. Für den forensisch/klinischen Toxikologen sind zur Beurteilung einer Einnahme (Intoxikationen!) derartiger Verbindungen jedoch weitergehende, zusätzliche Angaben erforderlich, etwa zu den *quantitativen* Ausscheidungsverhältnissen, der Nachweisbarkeit der Verbindung in Abhängigkeit von der Zeit oder der Nachweisgrenze mit den verschiedenen Analyseverfahren.

Da uns in derartigen Fällen nur in Ausnahmefällen Blut oder Serum zur Verfügung steht, wurden nur die Ausscheidungsverhältnisse im Harn berücksichtigt.

II. Geräte und Methoden

Fünf gesunde, männliche Versuchspersonen erhielten ca. eine halbe Stunde nach dem Frühstück eine einmalige Dosis von zwei Kapseln (entspr. 400 mg Mefexamidhydrochlorid) Mefexamid forte (H. Mack, Illertissen).

Die Probanden hatten mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn keine Arzneimittel mehr eingenommen; während des Versuchs wurde die gewohnte Ernährung beibehalten, jedoch auf Kaffee, Tee, Konservengerichte und andere Medikamente (Vitaminpräparate!) verzichtet.

Der Harn wurde in Glasgefäßen gesammelt und sofort aufgearbeitet; die bis 24 h nach Einnahme erhaltenen *Spontanurine* wurden einzeln untersucht, die 24–48- und 48–72-Stundenurine sind *Sammelurine*.

Zur *Extraktion des Harns* wurde dieser mit einer 10%igen Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Pufferlösung¹ auf pH 8.9 eingestellt (5 ml Puffer je 20 ml Harn) und 3× mit Chloroform extrahiert. Dieses Puffersystem hat sich insbesondere zur Extraktion phenolischer Verbindungen (Morphin!) bewährt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur abgezogen. Die Rückstände wurden in 100 µl Methanol aufgenommen und direkt chromatographiert.

Zur *Spaltung der Konjugate* (salzsauer und enzymatisch mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase; Merck, Darmstadt, Art.Nr. 4114) wurde wie bei [1–4; 5] beschrieben verfahren, dann wurde — wie oben geschildert — extrahiert.

¹ Wasserfreies Natriumcarbonat (16,9 g) und Natriumhydrogencarbonat (54 g) werden gut gemischt und mit dest. Wasser zu einer 10%igen Lösung aufgefüllt

Zur *Dünnschichtchromatographie* (Fertigplatten HF₂₅₄, Merck) erwies sich das Fließmittelgemisch aus

Toluol/Ethanol/Ammoniak (250 g/l) 80 + 20 + 1 (v/v),

zur Detektion Dragendorff Reagenz (mod. nach Thies u. Reuther), mit Nachbesprühen einer 5%igen Eisen(III)-chlorid-Lösung, als am geeignetsten [1].

Die Bedingungen für die *GC/MS-Kombination* sind bei [1–7] beschrieben; abweichend davon wurde bei 210°C isotherm gaschromatographiert.

Die *Synthese* des Desmethyl-Mefexamids erfolgte wie bei [1].

Zur *Pharmakokinetischen Analyse* (Berechnung der Parameter, Bedeutung der verwendeten Symbole wie t , k_2 etc.) wurde nach [8] verfahren.

III. Ergebnisse und Diskussion

Unter den Bedingungen der Elektronenstoß-Ionisation (EI) liefern beide Verbindungen nur relativ wenig aussagefähige Massenspektren, die durch das α -Spaltprodukt m/e 86 gekennzeichnet sind [1]. Daher wurde die bei ähnlichen Problemstellungen erfolgreich eingesetzte Methode der chemischen Ionisation (CI) mit Ammoniak als selektivem Reaktandgas benutzt [1–4; 6–7]: die mit den verschiedenen Ionisierungsarten erhaltenen relativen Intensitäten der Molekül- bzw. Quasimolekülionen MH^+ (= m/e 280/281 bzw. m/e 266/267) sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Die hohen Intensitäten der MH^+ -Ionen führen zu einer *Erhöhung* der *Nachweisempfindlichkeit* (durch Unterdrückung der Ionisation im biologischen Material enthaltener Begleit- und Ballaststoffe, Säulenbluten etc.) und *Selektivität* (da im höheren und damit störungsfreien Massenbereich gemessen wird).

Der Nachweis von I und II gelingt so problemlos im Rahmen des Routinebetriebs (zyklischer scan) bis weit über 72 h nach Applikation des Medikaments hinaus; die (absolute) Nachweisgrenze (single ion detection) lag bei ca. 5 ng.

Zwischen den relativen peak-Flächen und den Harnkonzentrationen besteht eine lineare Abhängigkeit (im Bereich von 0,1–500 $\mu\text{g/ml}$); die in reiner Form leicht erhältlichen Verbindungen I und II können daher zur absoluten Eichung (als externe Standards) eingesetzt werden. Soll mit einem inneren Standard gearbeitet werden, bieten sich dazu Methaqualon und Propyphenazon an.

Die Spaltung der konjugiert ausgeschiedenen Anteile der Verbindungen muß enzymatisch erfolgen, da bei der salzsauren Hydrolyse die in Abb. 1 gezeigten Hydrolyseprodukte, die gleichzeitig die sauer extrahierten Metaboliten im Harn vor Hydrolyse darstellen [1], entstehen².

Das Verhältnis von frei zu konjugiert ausgeschiedenen Desmethyl-Mefexamid betrug etwa 1:1 [9].

Unter den beschriebenen *DC-Bedingungen* betragen die R_f -Werte von I und II 0,48 bzw. 0,36; die Nachweisgrenze mit Dragendorff-Reagenz liegt bei 0,2 μg (absolut).

Die o.g. Hydrolyseempfindlichkeit des Mefexamids und seine sehr schwach basischen Eigenschaften lassen für diese Verbindung einen hohen first-pass-effect

2 Diese Säureamid-Spaltung, die u.a. zur p-Methoxyphenoxiessigsäure bzw. deren Methylester (Artefakt!) führt [1], tritt auch schon wenige Tage nach Herstellung einer methanolischen Mefexamid-Lösung auf, wie sie etwa als Vergleichslösung zur DC bereitet wird

	Mefexamid (% relativer Intensität M^+ u. MH^+)	Desmethyl-Mefexamid (% relativer Intensität M^+ u. MH^+)
EI	<1	<1
CI- CH_4	17	22
CI- NH_3	76	63

Tabelle 1. Die mit den verschiedenen Ionisierungsarten erhaltenen relativen Intensitäten vom Molekül- bzw. Quasimolekülion des Ionenstroms des entsprechenden GC-peaks

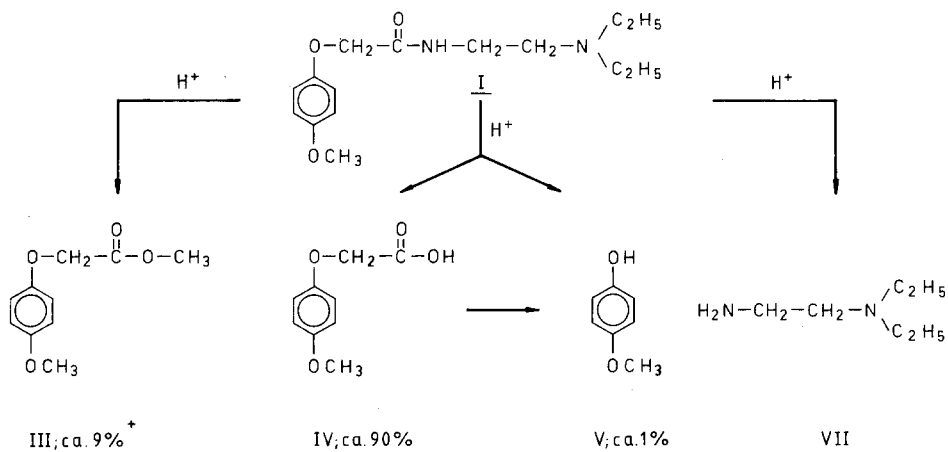


Abb. 1. Die Produkte der salzsauren Hydrolyse und die bei *saurer* Reaktion aus dem Harn extrahierten Metaboliten von Mefexamid (+ entsteht beim Aufnehmen der sauren Extraktionsrückstände mit Methanol als Artefakt)

(wie er beispielsweise auch für das Bisacodyl beschrieben ist [10]) und eine nicht zu vernachlässigende gastrale Resorption erwarten, mit den entsprechenden Auswirkungen auf Bioverfügbarkeit und Applikationsart. Die voraussehbar mangelnde Stabilität im Magen-Darm-Trakt führt dazu, daß die Resorptionsquote extrem unsicher sein wird: ein beträchtlicher Anteil I wird schon durch die Magensäure in II umgewandelt werden!

Die in den Ausscheidungsversuchen mit fünf Probanden gewonnenen analytischen und pharmakokinetischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt:

von besonderem Interesse erscheint, daß ca. 30% der verabreichten Dosis innerhalb 72 h als das Desmethyl-Derivat frei *und* konjugiert ausgeschieden werden sowie die kontinuierliche Änderung des Verhältnisses Ausgangsverbindung: Metabolit von 6:1 zu 1:1,3; ca. 10 h nach Einnahme stehen beide Verbindungen im Gleichgewicht.

Ausblick

Weitere Untersuchungen werden klären müssen, wie die Auswirkungen der Biotransformation auf die Arzneimittelwirkung aussehen: so muß u.a. geklärt

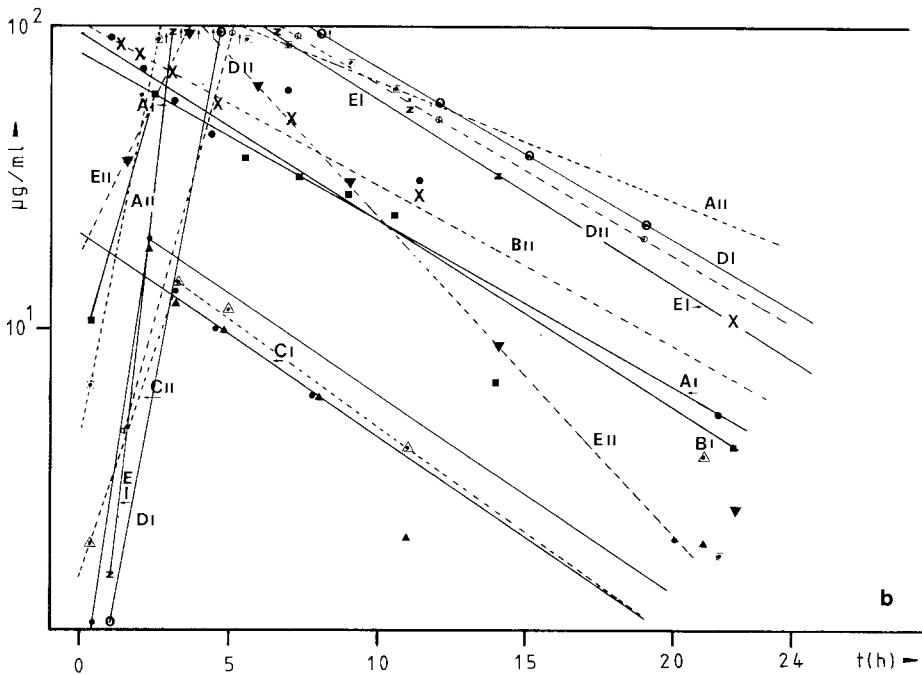
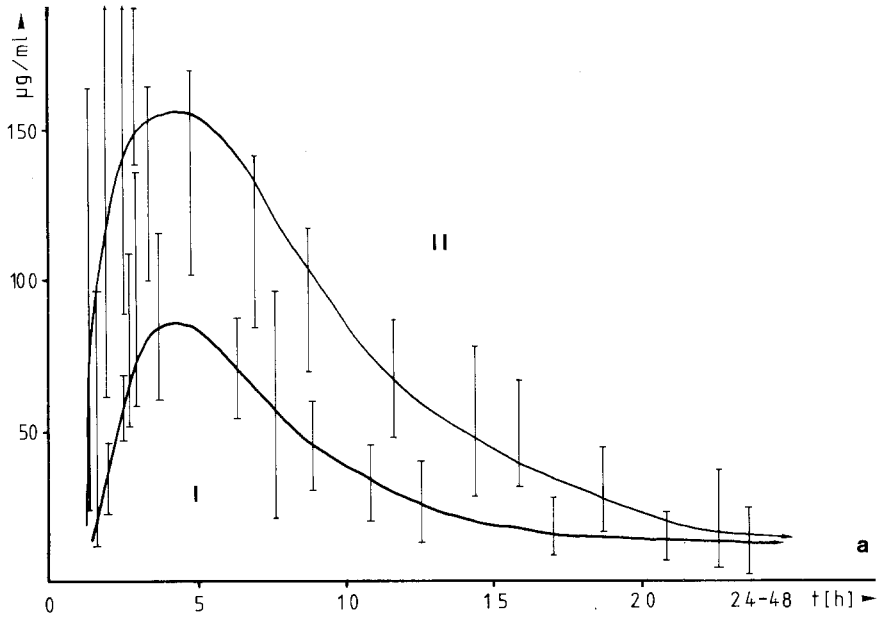


Abb. 2a, b. Mefexamid (I)- und Desmethyl-Mefexamid (II)-Konzentration im Harn von fünf Versuchspersonen nach Einnahme von 400 mg Mefexamidhydrochlorid. a Numerische; b halb-logarithmische Darstellung

Tabelle 2. Die in den Ausscheidungsversuchen mit fünf Personen gewonnenen analytischen und pharmakokinetischen Daten

Versuchsperson		A	B	C	D	E
Eliminationshalbwertzeit $t_{1/2}$ (in h)	I	6,2	4,0	3,8	5,4	4,2
	II	6,7	4,9	4,2	5,8	4,6
Eliminationskonstante k_2 (in h^{-1})	I	0,11	0,17	0,18	0,13	0,16
	II	0,10	0,14	0,16	0,12	0,15
Mit dem Harn innerhalb 72 h ausgeschiedene Menge in % der eingenommenen Dosis an „freier“ Verbindung	I	6	10,3	4,9	12,4	9,8
	II	17	16	10,7	16,5	16,8
Verhältnis von I zu II (0 bis 72 h nach Einnahme)		6,8:1	2,8:1	2,7:1	3,8:1	4,6:1
		→	→	→	→	→
		1:1,3	1:1,3	1:1,4	1:1,3	1:1,4
DC-Nachweis von I und II möglich		Bis einschließlich 72 h nach Medikament- Einnahme				
Extraktionsrate		68%				
Variationskoeffizient (VK) — GC/MS —		5,8%				
Höchste Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) nach Stunden (h)						
($\mu\text{g/ml}$)		59	94	19	129	110,6
(h)	I	2,5	1,05	2,1	4,2	3,9
($\mu\text{g/ml}$)		186	119	58	206	216
(h)	II	2,5	1,05	2,1	4,2	2,65

werden, ob es sich bei II um einen Metaboliten mit geringer oder hoher Wirkung handelt, ob I damit nur die „pro-drug“ mit geringer Wirkung und II die eigentlich wirksame Verbindung darstellt und wie das Wirkprofil des Metaboliten, etwa in Bezug auf Neben- und toxische Wirkungen oder die Kumulation (Lidocain!), aussieht [8].

Die Biotransformationsforschung kann somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis pharmakologischer Zusammenhänge und Wirkungsmechanismen leisten und damit auch erfolgversprechend in die *gezielte* Arzneimittelforschung miteinbezogen werden.

Literatur

1. Gielsdorf W (1981) Beitrag zu Biotransformation und Analytik des Psychopharmacons Mefexamid. *Z Rechtsmed* 87:117-127
2. Gielsdorf W, Toffel-Nadolny P (1981) Zur Biotransformation von Zipeprol (Mirsol) beim Menschen: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen mit Ammoniak als selektivem Reaktandgas. *J Clin Chem Clin Biochem* 19:25

3. Gielsdorf W, Holz H (1980) Isoaminil als Ausweichdroge. Untersuchungen zu Stoffwechsel und Analytik. Dtsch Apoth Z 120:1353
4. Gielsdorf W, Herper M (1980) Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen zur Analytik von Clobazam (Frisium). Z Rechtsmed 85:295
5. Broschüre „Extrelut“ — Neues Verfahren zur Extraktion lipophiler Stoffe. E Merck, Darmstadt
6. Gielsdorf W, Klug E (1981) Neues Rauschmittel auf dem Drogenmarkt: 2,5-Dimethoxy-4-bromamphetamin (DOB). Dtsch Apoth Z 121:1003
7. Toffel-Nadolny P, Gielsdorf W (1981) Zum Metabolismus des Eftapan. Arzneimittelforsch (Drug Res) 31 (I):719
8. Pfeifer S, Borchert H-H (1980) Pharmakokinetik und Biotransformation. Eine Einführung. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin
9. Forrist AA, Pulliam AL, Kaiser DG (1974) N-2(Diethylamino)ethyl-2-(p-hydroxyphenoxy)-acetamide, a metabolite of Mefexamide in man. Res Comm Chem Pathol Pharmacol 8(2):385
10. Blume H (1978) Ausscheidung von Pharmaka mit der Galle und Bedeutung des enterohepatischen Kreislaufs. Pharm in uns Zeit 7:163

Eingegangen am 14. Mai 1981