

Zur Analytik und renalem Ausscheidungsverhalten von Pirisudanol (Stivane)

W. Gielsdorf¹ und E. Klug²

¹L.A.B.-MS Gesellschaft für pharmakologische Untersuchungen mbH, Brühlweg 23, D-7910 Neu-Ulm 4, Bundesrepublik Deutschland

²Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin, Hittorfstraße 18, D-1000 Berlin 33

Analytical Properties and Renal Excretion of Pirisudanole (Stivane)

Summary. The chromatographic and spectroscopic properties (TLC; UV; IR; ¹H-NMR; GC/MS) of the psychostimulant Stivane (dimaleate; I) are presented in detail, describing some analytic peculiarities of the pure substance as well.

Moreover, the results of the renal excretion studies are reported: after hydrolysis in each of the acidic and basic urine extracts a degradation product—but no unchanged drug—could be detected.

Key word: Pirisudanole-Stivane, analytical profile, detection in urine

Zusammenfassung. Die chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften (DC; UV; IR; ¹H-NMR; GC/MS) des Psychoanalepticums Stivane (= Dimaleat; I) werden zusammenfassend referiert, wobei auch auf einige analytische Besonderheiten eingegangen wird.

Anschließend wird über die bei den Ausscheidungsversuchen im menschlichen Harn erhaltenen Ergebnisse berichtet: nach salzsaurer Hydrolyse war im alkalischen und sauren Extrakt jeweils ein Abbauprodukt – nicht jedoch die unveränderte Ausgangsverbindung – nachweisbar.

Schlüsselwort: Pirisudanol-Stivane, analytische Kenndaten, Nachweis im Urin

Einführung

Das Psychopharmacon (Cerebralanalepticum; Stimulans) Pirisudanol (= Pyridoxol-3-[2-(dimethylamino)-ethylsuccinat];I) wird als Fertigarzneimittel Stivane

Sonderdruckanfragen an: Dr. W. Gielsdorf (Adresse siehe oben)

zur Behandlung verschiedener – vor allem durch Depressionen gekennzeichnete Erkrankungen – vertrieben¹ [1].

Im Hinblick auf das forensisch-toxikologische Interesse an dieser Verbindung (Verkehrsmedizin!), sollten deren analytisches Profil und Aussagen zum renalen Ausscheidungsverhalten erarbeitet werden, wie dies bereits für eine ganze Reihe derartiger Verbindungen geschehen ist, etwa u. a. für das Pemolin (Tradon) [2], Pentazocin (Fortral) [3], Isoaminil (Peracon) [4], Clobazam (Frisium) [5], Doxylamin [6] und Mefexamid [7a, b].

Methoden und Geräte

Drei gesunde, freiwillige, männliche Versuchspersonen nahmen ca. 1 h nach dem Frühstück jeweils zwei Kapseln (= 600 mg l-Dimaleat) Stivane ein. Der Harn wurde dann bis einschließlich 48 h nach der Einnahme gesammelt und dann sofort aufgearbeitet.

Geräte

Die benutzten Geräte und die allgemeine Arbeitsmethodik sind bei [3–7] beschrieben.

Aufarbeitung des Harns

Die Extraktion des Harns erfolgte jeweils vor und nach der Hydrolyse mit Salzsäure bei pH 2 und 10/11 mit Chloroform; ein Teil der Harnproben wurden zur Spaltung der Konjugate mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase (E. Merck, Darmstadt) versetzt. Insgesamt wurden ca. 1,8 l Harn je Proband aufgearbeitet.

Zur Hydrolyse der Reinsubstanz wurden 50 mg des Dimaleats, 50 ml Wasser und 50 ml konz. Salzsäure in einem Erlenmeierkolben auf einem Asbestnetz über der Bunsenflamme 6 min gekocht [3, 5, 6, 7a].

Die abgekühlte Reaktionslösung wurde dann bei saurem und alkalischem pH-Wert mit Chloroform extrahiert.

Zur Dünnschichtchromatographie [8] wurden Fertigplatten HF₂₅₄ der Firma E. Merck, Darmstadt benutzt. Die getesteten Fließ- und Detektionsmittel finden sich in Tabelle 1.

Das UV-Spektrum der Verbindung zeigt Abb. 1:

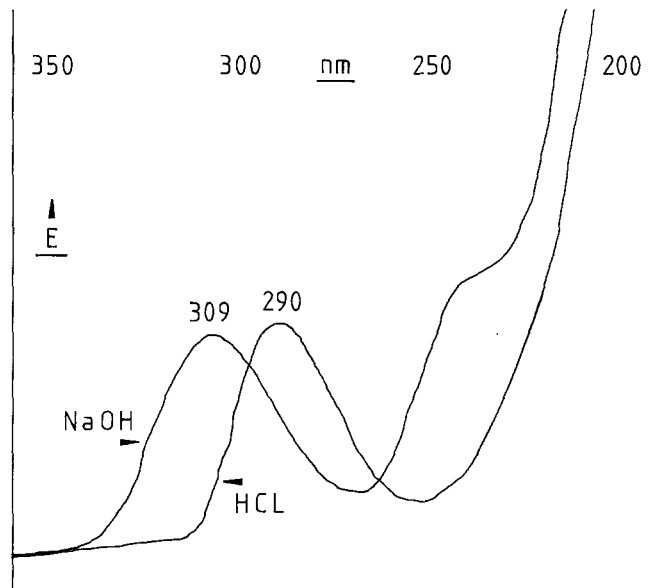
λ max. (nm)	Solvens
309	1 N NaOH
290	0,1 N HCl
286	Methanol

Das IR-Spektrum (Abb. 2) [9] zeigt bei 2975 und 2700 cm^{-1} die Banden für die OH- und NH-Streckschwingungen, ferner Banden bei 2830 und 2780 cm^{-1} (N,N-Dimethylaminogruppe), 1745 cm^{-1} (COO^- asym. Streckschwingung) und 1590 cm^{-1} (asym. Deformationsschwingung der NH_3 -Gruppe).

¹ U. a.: Lab. Beaufour S.A., Dreux, Dr. W. Schwabe, Karlsruhe

Tabelle 1. Die dünnschichtchromatographischen Kenndaten der nachgewiesenen Verbindungen und der Reinsubstanz

Fließmittel ^a	Reinsubstanz Rf-Wert	M1 (Hydr. sauer) Rf-Wert	M2 (Hydr. alkal.) Rf-Wert
Methanol 100 Ammoniak 1,5	Langgezogener Fleck		
Chloroform 80 Methanol 10 Ammoniak 1	0,70	0,75	0,57
Chloroform 90 Methanol 10 Ammoniak 1	0,36	0,42	0,36
Chloroform 80 Ethanol 15 Ammoniak 5	0,40	0,10	0,84
Detektion			
Dragendorff Reagenz + FeCl ₃	Rot - orange	Rot - orange	Braunrot - orange
Kaliumiodoplateat	—	—	—

^a v/v; Ammoniak 25%**Abb. 1.** UV-Spektrum des Stivane

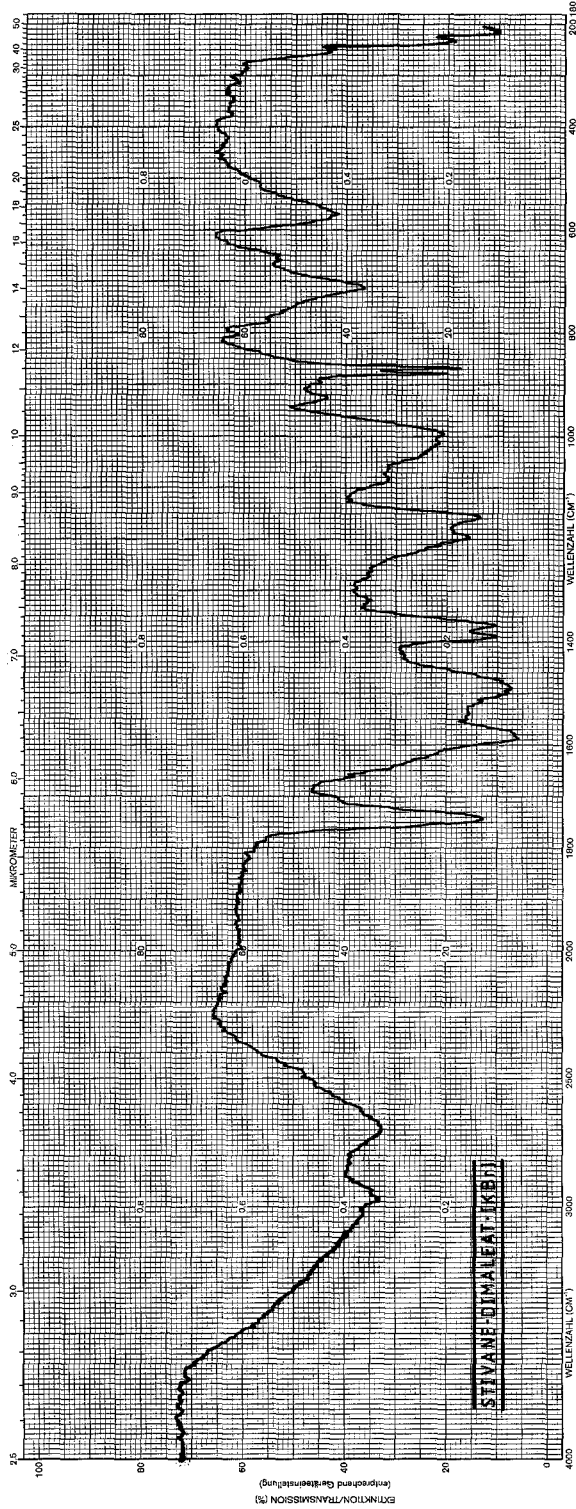


Abb. 2. IR-Spektrum des Stivane

Tabelle 2. GC/MS der Reinsubstanz als Dimaleat; Zersetzungsprodukte

	m/e; % rel. Int.	
	EI	CI-NH ₃
S1	151 (100); 122 (48); 108 (4); 94 (14); 82 (8); 79 (2); 67 (3)	152 (100); 138 (37); 124 (31); 108 (3)
S2	209 (43); 194 (52); 101 (3); 72 (15); 58 (100)	218 (35); 152 (100); 138 (37); 124 (22); 115 (18); 100 (11)
S3	207 (100); 151 (5); 122 (2); 58 (54)	190 (MH ⁺ -H ₂ O; 65); 166 (12); 152 (100); 138 (43); 124 (25)
S4	281 (11); 207 (18); 189 (100); 161 (20); 58 (28)	190 (100)
S5	331 (4); 281 (8); 253 (15); 207 (31); 189 (7); 161 (3); 58 (100)	226 (14); 190 (100)
S6	405 (28); 327 (15); 264 (3); 190 (16); 71 (26); 58 (100)	261 (100); 190 (19); 146 (22)
S7	215 (100); 214 (48); 205 (38); 186/ 176 (18); 58 (21)	216 (100); 206 (15); 176 (12); 166/ 136 (3)
S8	326 (18); 310 (26); 284 (100); 254 (92); 188 (6); 160 (15); 136 (32); 71 (51); 58 (85)	206 (12); 190 (58); 164 (32); 154 (15); 138 (91); 122 (100); 108 (95)

Die Verbindung liegt offenbar als inneres Salz (Zwitterion) vor, wobei die breiten Absorptionsbanden der Dicarbonsäure das Aussehen des Spektrums charakterisieren.

¹H-NMR-Spektrum

Die in DMSO gelöste Probe zeigte folgende Signale (in ppm; interner Standard TMS; S = Singulett; M = Multiplett):

2,42 (S; 3H; Pyridin-CH₃); 2,85 (S; 6H; -N(CH₃)₂); 2,66, 4,74 und 5,18 (S; 4H; 2H; 2H; 4 × CH₂-); 3,38 und 4,38 (M; 2H; 2H; 2 × CH₂-); 8,0 (S; 1H; Pyridin-H) sowie 6,17 (S; 4H; -CH=CH-) und 8,94 (S; breit) für die Maleinsäure.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Summenformel:

C₁₆H₂₄N₂O₆; MG = 340 (freie Base)

C₂₄H₃₂N₂O₁₄; MG = 572 (Dimaleat)

Wird das Dimaleat in Methanol gelöst und direkt in den GC injiziert, lassen sich eine ganze Reihe von Zersetzungsprodukten nachweisen, deren massenspektrometrische Kenndaten in Tabelle 2 aufgeführt sind (S1–S8).

Das entsprechende Gaschromatogramm (TIC = total ion current) zeigt Abb. 3.

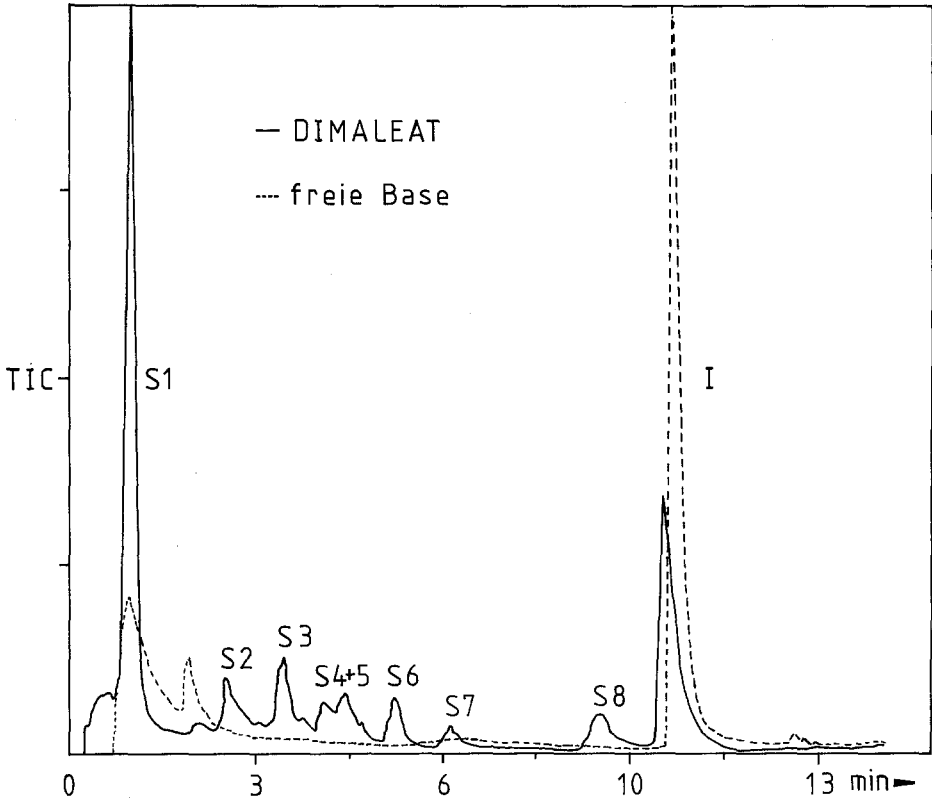


Abb. 3. Gaschromatogramm (Totalionenstromchromatogramm, TIC) des Pirisudanol-Dimaleats

Diese Zersetzungserscheinungen treten auch dann auf, wenn die Probe über den Direkteinlaß (DE) in das Massenspektrometer eingeführt wird: im Probenröhrchen findet sich dann immer ein harziger, dunkelbrauner Rückstand.

Diese Zersetzungsprodukte entsprechen den Fragmentationen, die auch beim Abbau der Reinsubstanz im Massenspektrometer entstehen: eine Beobachtung, die schon bei der Aufnahme der Massenspektren verschieden anderer Arzneistoffe von uns gemacht wurde [4, 6, 7]. Im Gegensatz dazu zeigt das Chromatogramm der freien Base² nur einen (Haupt-)peak: als Molekülion M^+ tritt bei der Elektronenstoß-Ionisation (EI) das M-14-Ion, als base-peak m/e 58 ($H_2C=N^+(CH_3)_2$) auf (Abb. 4).

Auch mit Hilfe der chemischen Ionisation (CI) [3, 4, 6, 7, 10-12] mit verschiedenen Reaktandgasen gelang es nicht, eine eindeutige Molekulargewichtszuordnung zu erzielen: mit Ammoniak als Reaktandgas wird als Ion mit der höchsten Masse m/e 397 erhalten, den base-peak liefert m/e 210; weitere Ionen finden sich bei m/e 190 (28% rel. Int.), 138 (45), 122 (28) und 108 (18). Für massenspektrometrische Untersuchungen erscheint die Substanz daher weniger geeignet.

² 10 mg Dimaleat werden mit 1 ml Puffer pH 8,9 und 9 ml Ether versetzt und geschüttelt; ca. 2 μ l der etherischen Phase werden direkt in den GC injiziert

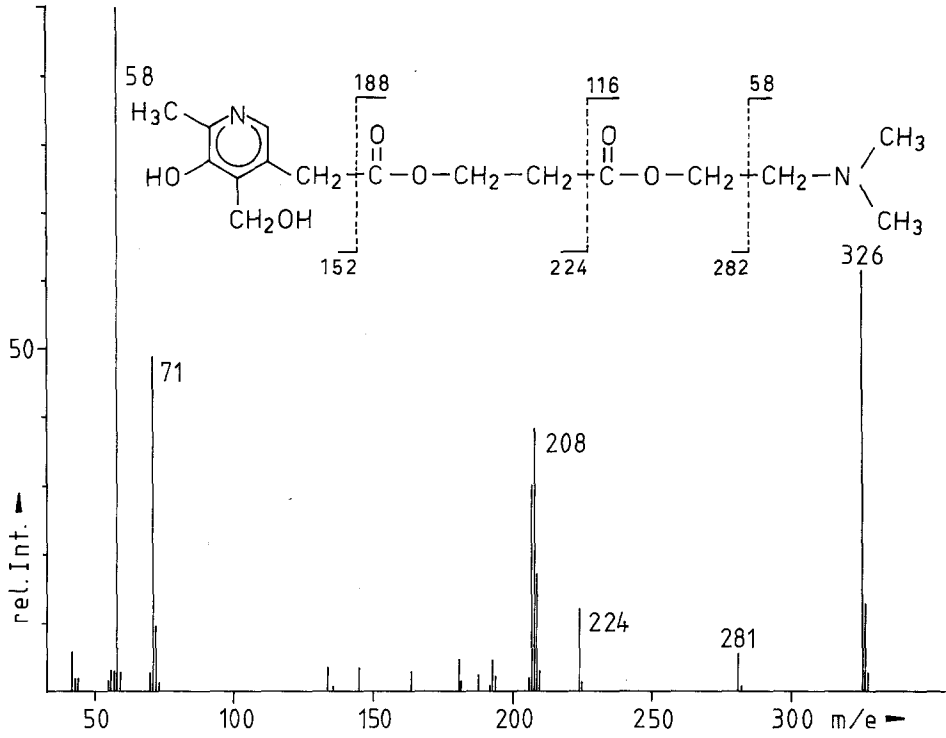


Abb. 4. Elektronenstoß-Ionisation (EI)-Massenspektrum der freien Base

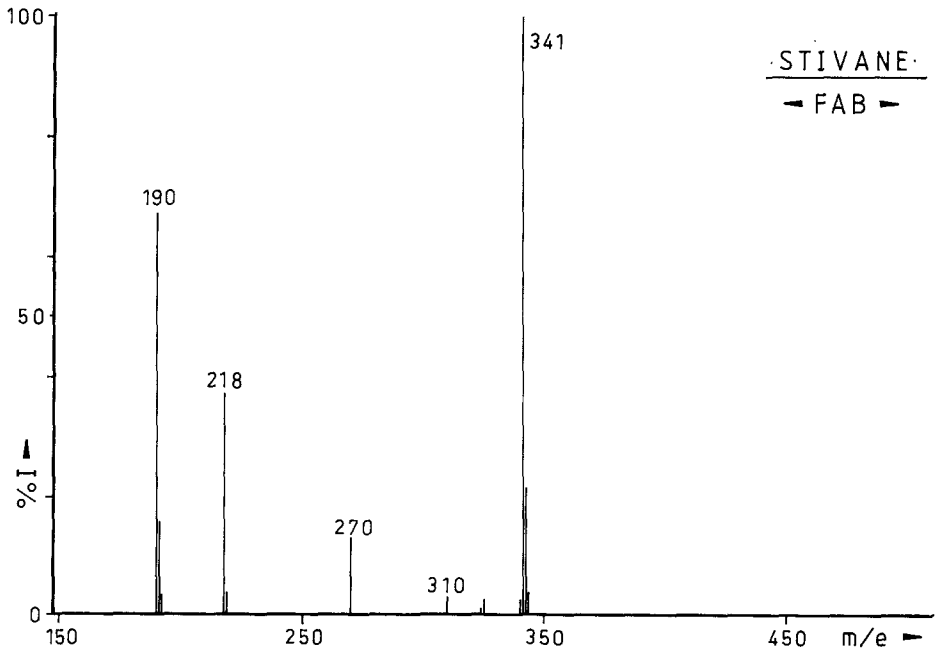
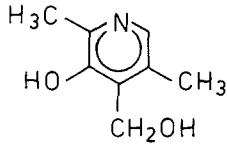


Abb. 5. FAB-Massenspektrum des Pirisudanol-Dimaleats



$C_8H_{11}NO_2$; MG 153

Abb. 6. Struktur eines Pyridoxol-Derivats

Der Nachweis der unveränderten Ausgangsverbindung gelingt jedoch dann massenspektrometrisch, wenn die Probe direkt in die Ionenquelle verdampft wird und schonend ionisiert (d. h. thermisch nicht belastet wird): so gelang es mit der erst kürzlich kommerziell erhältlichen FAB (= Fast Atom Bombardment)-Technik [3, 11, 13, 14], deren Quasi-Molekülion $MH^+ = 341$ mit einer relativen Intensität von 100% darzustellen. Die Nachweisgrenze lag bei 200 pg absolut. Abbildung 5 zeigt das entsprechende FAB-Massenspektrum des Pirisudanol-Dimaleats.

Bedingungen für die FAB-Messungen

Bombarding gas: Argon

Druck in der Ionenquelle: 3×10^{-6} m bar

Energie der Ar-Atome: 8 kV

Scan: 10 s/dec

Lösungsmittel: Glycerin

Die Spektren wurden mit einem VG MM 7035 GC/MS-System aufgenommen.

Allgemeine Daten

Die weißen Hart-(Steck-)Kapseln (L ca. 19,1 mm; Durchm. ca. 6,6 mm; Gew. ca. 480 mg) enthalten 300 mg Pyrisuccideanol als Dimaleat.

Schmelzpunkt: 134° C (Dimaleat)

Löslichkeit: gut in Methanol und Ethanol, schlecht in Aceton und Chloroform.

Ergebnisse des Ausscheidungsversuchs

Nach Einnahme einer einmaligen Dosis von 600 mg Stivane konnten im menschlichen Harn nach Hydrolyse mit Salzsäure im sauren und alkalischen Extrakt je ein Abbauprodukt nachgewiesen werden, die unveränderte Ausgangsverbindung selbst dagegen nicht. Die Extrakte ohne Hydrolyse lieferten keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein körperfremder Substanzen.

Das im sauren Extrakt nach Hydrolyse nachgewiesene Abbauprodukt M1 besitzt ein Molekulargewicht von 410:

MS (EI): 410 (6); 367 (4); 341 (15); 231 (5); 203, 191, 161 u. 55 (6); 149 (8); 137 (24); 121, 95 (12); 81 (48); 69 (100)

CI-NH₃: 428 (= M · NH₄; 42); 411 (= MH⁺; 38); 329 (12); 275, 151, 126 (36); 261, 231, 163 (26); 137 (100)

Der starke M-69-peak deutet auf eine alizyklische Verbindung hin, weiterhin besteht ein enger Zusammenhang mit den bei der salzsauren Hydrolyse der Reinsubstanz erhaltenen Verbindungen mit den Molekulargewichten 394, 412 und 414.

Zur Ableitung von Strukturvorschlägen müssen diese Verbindungen synthetisiert werden, zumal nicht ausgeschlossen werden kann, daß es sich um Verunreinigungen (Nebenprodukte) aus der Synthese, Aufarbeitungsartefakte oder um bei der GC/MS-Analyse – im Einspritzblock – entstehende thermische Reaktionsprodukte handelt.

Für das im alkalischen Extrakt nach Hydrolyse nachgewiesene Abbauprodukt M2 läßt sich aufgrund der vorliegenden Massenspektren die Struktur eines Pyridoxol-Derivats ableiten (Abb. 6).

Neben einer Genese als genuiner Metabolit steht die eines Metabonats [15], etwa durch Wassereleminierung und nachfolgende Reduktion aus dem entsprechenden Pyridoxol (Vit. B₆).

Diese, einer Benzylspaltung (mit McLafferty-Umlagerung) gleichkommende Fragmentierung, tritt auch im Massenspektrum der Reinsubstanz (als Ion m/e 151) auf und ist charakteristisch für derartig substituierte Pyridine [10].

Das CI-Spektrum zeigt als MH⁺-Ion und base-peak m/e 154, weitere intensive Ionen finden sich bei m/e 152 (96), 150 (18), 135 (8) und 132 (4).

Diskussion

Der (forensisch-)toxikologische Nachweis einer Stivan-Einnahme im Urin (da uns nur in Ausnahmefällen Blut oder Serum zur Verfügung steht, beschränkt sich unsere Untersuchung auf den Harn), bietet einige analytische Probleme: da sich die Verbindung bei der (gaschromatographisch-)massenspektrometrischen Analyse zersetzt, erscheint sie – ebenso wie ihre „Metabolite“ – für diese Methode weniger geeignet.

Lediglich mit Hilfe der erst seit kurzen verfügbaren FAB-Massenspektrometrie [3, 11, 13, 14] gelingt die eindeutige Festlegung des Molekulargewichts und liefert so die zur Identifizierung unbekannter Verbindungen wohl wichtigste Erst-Information [16].

Da jedoch erst wenige Laboratorien über diese relativ aufwendige (und teure!) Analysentechnik verfügen, müssen zur Überprüfung/Screening des Harns andere Nachweismethoden eingesetzt werden, in diesem Falle vorzugsweise die Dünnschichtchromatographie.

Die salzsaure Hydrolyse der Reinsubstanz liefert eine ganze Reihe von Reaktionsprodukten, deren Massenspektren jedoch ebenfalls relativ wenig aussagekräftig blieben: fast 100% des Totalionenstroms entfallen auf drei Verbindungen, die alle Molekülonen zeigen, die um 54, 72 und 74 Masseneinheiten höher (!) liegen als die Ausgangsverbindung.

Die Molekulargewichte (M^+ = 394, 412 und 414) konnten durch die CI-NH₃-Massenspektren abgesichert werden; weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit ein sinnvoller Zusammenhang mit der Ausgangsverbindung besteht.

Danksagung. Wir danken Herrn M. Herper, Direktion Polizeitechnische Untersuchungen, Berlin und Frl. P. Hidde, L.A.B. Gesellschaft für pharmakologische Untersuchungen mbH, Neu-Ulm, für ihre wertvolle Unterstützung bzw. Mitarbeit.

Literatur

1. Dictionaire Vidal (1982) The Merck Index, 9. edn
2. Goenechea S, Eckhardt G, Gielsdorf W (1978) Untersuchung der Biotransformation von Pemolin im menschlichen Organismus. *Fresenius Z Anal Chem* 289 : 110-111
3. Gielsdorf W, Klug E, Tümmers MH (1982) Zum Nachweis von Pentazocin (Fortral) im menschlichen Harn: Gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen. *Z Rechtsmed* 89 : 181-189
4. Gielsdorf W, Holz H (1980) Isoaminil als Ausweichdroge. Untersuchungen zu Stoffwechsel und Analytik. *Dtsch Apotheker Z* 120 : 1353-1355
5. Gielsdorf W, Herper M (1980) Gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen zur Analytik von Clobazam (Frisium). *Z Rechtsmed* 85 : 295-303
6. Gielsdorf W, Schubert K (1981) Zum Stoffwechsel des Doxylamin. Isolierung, Identifizierung und Synthese einiger Metaboliten. *J Clin Chem Clin Biochem* 19 : 485-490
- 7a. Gielsdorf W (1981) Beitrag zu Biotransformation und Analytik des Psychopharmakons Mefexamid. *Z Rechtsmed* 87 : 117-127
- 7b. Gielsdorf W, Herper M (1981) Die quantitative Bestimmung von Mefexamid und dessen Hauptmetaboliten Desmethyl-Mefexamid im menschlichen Harn nach Einnahme einer therapeutischen Dosis. *Z Rechtsmed* 87 : 297-303
8. Merck E (1980) Anfärbereagentien für die Papier- und Dünnschichtchromatographie. Merck, Darmstadt
9. Günzler H, Böck H (1975) IR-Spektroskopie. Verlag Chemie, Darmstadt
10. Waller GR, Dermer OC (1980) Biochemical applications of mass spectrometry, suppl vol I. Wiley, New York
11. Gielsdorf W (1982) Fortschritte in der massenspektrometrischen Analysentechnik: FAB, CI, NCI, SIR. Int Symp „Entwicklung und Fortschritte der forensischen Chemie“, Hamburg, 19.-20. 03. 1982
12. 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 : 25-30
13. Gielsdorf W, Farrow P (1982) FAB (Fast Atom Bombardment)-Massenspektrometrie, eine neue Untersuchungsmethode in der Hand des (forensischen) Toxikologen. *Z Rechtsmed* 89 : 191-195
14. Fenwick RG, Eagles J, Self R (1982) The fast atom bombardment mass spectra of glucosinolates and glucosinolate mixtures. *Org Mass Spectrom* 17 : 544-546
15. Pfeifer S, Borchert HH (1980) Pharmakokinetik und Biotransformation. Verlag „Volk und Gesundheit“, Berlin (Ost)
16. McLafferty F (1980) Interpretation of mass spectra, 3. edn. University Science Books, Mill Valley

Eingegangen am 13. Januar 1983