

# "Stereoselektive Pharmakokinetik und CYP2C19-Genotypisierung als Prädiktoren des Therapieerfolges einer Omeprazol-Therapie bei Patienten mit GERD, Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens"



DISSERTATION



zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. (rerum naturalium)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Frau Ines Reiche**

geboren am 01. Februar 1982 in Merseburg

Gutachter /in:

1. Prof. Dr. S. M. Bode-Böger
2. Prof. Dr. A. Langner
3. Prof. Dr. P. Presek

Halle (Saale), den 02.05.2012

*„Inmitten der Schwierigkeit  
liegt die Möglichkeit.“*

*Albert Einstein*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Einleitung .....	7
1.2 Chiralität – Enantiomere – Racemat .....	9
1.3 Protonenpumpenhemmer .....	10
1.3.1 Omeprazol .....	10
1.3.2 Esomeprazol .....	12
1.3.3 Risiken und unerwünschte Ereignisse unter einer Protonenpumpenhemmer-Therapie.....	13
1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	14
1.4.1 Massenspektrometrie .....	15
1.4.2 Chromatographische Parameter der HPLC .....	18
1.5 Bisherige Methoden zur Bestimmung von Omeprazol.....	20
1.6 Das Cytochrom P450-Enzymsystem .....	21
1.6.1 Cytochrom P450 2C19.....	22
1.6.2 Cytochrom P450 3A4 .....	23
1.7 Die gastroösophageale Refluxkrankheit .....	23
1.7.1 Diagnostik und Klassifikationen der GERD.....	25
1.7.2 Die Ösophago-Gastro-Duodenoskopie.....	26
1.7.3 Die 24-Stunden-pH-Metrie von Ösophagus und Magen .....	26
1.8 Zielsetzung .....	28
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1 Geräte und Zubehör.....	29
2.2 Chemikalien.....	30
2.3 Herstellung von Lösungen.....	30
2.3.1 Omeprazol-Stammlösungen.....	30
2.3.2 Kalibrierlösung 1 und 2.....	30
2.3.3 Interner Standard (IS)-Stammlösung.....	31
2.3.4 IS-Arbeitslösung.....	31
2.3.5 Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 8,5).....	32
2.3.6 Laufmittel (mobile Phase).....	32
2.4 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite.....	32
2.4.1 Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion.....	32
2.4.2 Chromatographische Bedingungen .....	33
2.4.3 Einstellungen des Massenspektrometers .....	33
2.4.4 Peakintegration .....	34
2.4.5 Methodvalidierung .....	34

2.4.5.1	<i>Selektivität</i> .....	34
2.4.5.2	<i>Matrixeffekte</i> .....	35
2.4.5.3	<i>Linearität und Nachweisgrenze</i> .....	35
2.4.5.4	<i>Präzision und Richtigkeit</i> .....	35
2.4.5.5	<i>Wiederfindung der Analyten</i> .....	36
2.4.5.6	<i>Stabilität</i> .....	37
<b>2.5</b>	<b>Pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen</b> .....	<b>37</b>
2.5.1	Allgemeines Studiendesign .....	37
2.5.2	Ein- und Ausschlusskriterien .....	38
2.5.3	Ethische und gesetzliche Grundlagen .....	39
2.5.4	Studienmedikation.....	40
2.5.5	Versuchsdurchführung und Studienablauf.....	41
2.5.6	Genotypisierung .....	42
2.5.7	Pharmakokinetische Untersuchungen .....	43
2.5.8	Klinische Untersuchungen.....	44
2.5.9	Entnahme, Behandlung und Aufbewahrung der Blutproben .....	45
2.5.10	Bestimmung des CYP2C19- und CYP3A4-Phänotyps .....	46
2.5.11	Statistik und grafische Darstellung .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung einer enantioselektiven Methode für die simultane Bestimmung von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite</b> .....	<b>48</b>
3.1.1	Einstellungen des Massenspektrometers .....	48
3.1.1.1	<i>Omeprazol, D<sub>3</sub>-Omeprazol</i> .....	48
3.1.1.2	<i>5-Hydroxyomeprazol, D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol</i> .....	51
3.1.1.3	<i>Omeprazol-Sulfon</i> .....	53
3.1.2	Probenaufbereitung - Extraktion von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite	54
3.1.3	Entwicklung einer enantioselektiven chromatographischen Trennmethode ....	56
3.1.3.1	<i>Methodenentwicklung auf Supelco Chirobiotic R150 x 2,1 mm, 5 µm</i> .....	56
3.1.3.2	<i>Methodenentwicklung auf ReproSil Chiral-CA 250 x 2 mm, 5 µm</i> .....	61
3.1.4	Methodenvalidierung .....	67
3.1.4.1	<i>Selektivität</i> .....	67
3.1.4.2	<i>Übersprechen in andere Massenspuren</i> .....	67
3.1.4.3	<i>Matrixeffekte</i> .....	72
3.1.4.4	<i>Linearität und Nachweisgrenze</i> .....	73
3.1.4.5	<i>Präzision und Richtigkeit</i> .....	75
3.1.4.6	<i>Wiederfindung</i> .....	76
3.1.4.7	<i>Stabilität</i> .....	76
<b>3.2</b>	<b>Anwendung der entwickelten Methode in einer Klinischen Studie</b> .....	<b>77</b>
3.2.1	Demographische Patientencharakterisierung .....	77
3.2.2	Genotypisierung .....	78
3.2.3	Pharmakokinetische Auswertung .....	79
3.2.4	Auswertung der 24-Stunden-pH-Metrie .....	85
<b>3.3</b>	<b>Enantiomerenstabilität von Esomeprazol (S-Omeprazol)</b> .....	<b>89</b>

<b>3.4</b>	<b>Methodenanwendung bei der Detektion unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs) von Omeprazol / Esomeprazol .....</b>	<b>91</b>
3.4.1	Fall 1 – Esomeprazol-induzierte Rhabdomyolyse bei einem Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz.....	91
3.4.2	Fall 2 – Omeprazol-induzierter Husten bei einer Patientin mit gastroösophagealer Refluxkrankheit (GERD).....	93
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Analytik zur Quantifizierung von Omeprazol und seiner Metaboliten.....</b>	<b>96</b>
	Validierung .....	98
<b>4.2</b>	<b>Anwendung der entwickelten Methode .....</b>	<b>101</b>
4.2.1	Rekrutierung .....	102
4.2.2	Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Untersuchungen .....	103
4.2.3	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen.....	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>124</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme Hemmer
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation (Ionisation unter Atmosphärendruck durch Photonen)
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BMI	Body Mass Index
Chiral-CA	chirale Carboxylsäure
CK	Kreatininkinase
C <sub>max</sub>	maximaler Plasmaspiegel
CRP	C-reaktives Protein
CVVH	kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration
CYP	Cytochrom-P-450-Enzym
CYP2C19	Cytochrom-P-450-2C19 (Gen oder Enzym)
CYP2D6	Cytochrom-P-450-2D6 (Gen oder Enzym)
CYP3A4	Cytochrom-P-450-3A4 (Gen oder Enzym)
DAD	Diodenarray Detektor
DEA	Diethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	extensiver Metabolisierer
ERD	Erosive Refluxkrankheit
ESI	Elektrospray-Ionisation
EUDRA-CT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials (Register für klinische Studien)
GCP	Good Clinical Practice
GERD	Gastroesophageal reflux disease (gastroösophageale Refluxkrankheit)
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase

HER-2 Protein	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HWZ	Halbwertszeit
IM	intermediärer Metabolisierer
IS	Interner Standard
k	Retentionsfaktor (früher: Kapazitätsfaktor)
Konz.	Konzentration
KS-Test	Kolmogorow-Smirnow-Test
LC-MS/MS	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LA-A	Los-Angeles-Grad A
LA-B	Los-Angeles-Grad B
LA-C	Los-Angeles-Grad C
LA-D	Los-Angeles-Grad D
LDH	Laktat-Dehydrogenase
mAU	milli-absorption units
MCV	mean corpuscular volume (mittleres Erythrozyteneinzelvolumen)
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mt/mt	homozygoter langsamer Metabolisierer (PM)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis (Massenzahl pro Ladung)
n	Anzahl
N	Trennstufenzahl (Zahl der theoretischen Böden)
NERD	Nichterosive Refluxkrankheit
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
OH-OME	5-Hydroxyomeprazol
OME	Omeprazol
OMES	Omeprazol-Sulfon
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pKa	Maß für die Stärke einer Säure (negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante)
PM	poor metaboliser (langsamer Metabolisierer)

PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PTT	partial thromboplastin time (partielle Thromboplastinzeit)
Q	Quadrupol
R-OH-OME	R-5-Hydroxyomeprazol
R-OME	R-Omeprazol
RP	reversed phase (Umkehrphase)
SD	Standardabweichung
SNP	single nucleotide polymorphism
S-OH-OME	S-5-Hydroxyomeprazol
S-OME	S-Omeprazol
SOP	standard operating procedure (Standardvorgehensweise)
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TEA	Triethylamin
$t_m$	Totzeit der Trennsäule
$t_R$	Retentionszeit
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
TSQ	Triple Stage Quadrupole
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	ultraviolett
UV/ VIS	ultravioletter/ sichtbarer Bereich
wt/mt	heterozygoter extensiver Metabolisierer (IM)
wt/wt	homozygoter extensiver Metabolisierer (EM)



# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Die Entwicklung neuer Medikamente erschließt der Arzneimitteltherapie neue Möglichkeiten, Krankheitsbilder zu beeinflussen. Diesem Fortschritt in der medikamentösen Therapie stehen aber auch Schwierigkeiten, wie unerwünschte Arzneimittelwirkungen oder mangelnde Wirksamkeit bis hin zum Therapieversagen, gegenüber. Mögliche Gründe sind vielfältig, neben Faktoren wie dem Alter, dem Körpergewicht, der Nieren- und Leberfunktion, der Komedikation sowie krankheits-spezifischen Besonderheiten beruhen die interindividuellen Unterschiede auch auf der genetischen Variabilität der einzelnen Patienten. Diese kann die Wirkung von Arzneimitteln von der Absorption bis hin zur vollständigen Elimination beeinflussen [1]. Durch eine genetisch bedingte Allelvariation, einem so genannten Genpolymorphismus, kann es zum Beispiel zu einer Änderung der katalytischen Enzymaktivität kommen. Eine Vielzahl dieser Polymorphismen entstehen durch molekulare Mutationen verschiedener Allele. Sie können eine starke, schwache oder unter Umständen auch fehlende Metabolisierung bestimmter Arzneistoffe bedingen [2]. Die Bedeutung der Genpolymorphismen ist schon seit längerer Zeit bekannt.

So stellten zum Beispiel in den 50er Jahren Wissenschaftler zum ersten Mal interindividuelle Unterschiede in Enzymmustern als Ursache unerwünschter Wirkungen bei bestimmten Arzneimitteln fest. Sie beobachteten, dass das Antimalariamittel Primaquin bei manchen Afroamerikanern zu schweren Anämien durch Hämolyse führte. Als Ursache dieser Arzneimittelnebenwirkung wurde die Defizienz des Enzyms Glukose-6-Phosphatdehydrogenase gefunden [3].

Die Aufklärung der molekulargenetischen Basis der individuellen, angeborenen Merkmale begann Ende der 1980iger Jahre. Als erstes gelang die Klonierung und Charakterisierung des polymorphen Gens, welches das arzneistoffmetabolisierende Enzym Debrisoquin-Hydroxylase (CYP2D6) codiert [4]. Ein weiteres bedeutendes Enzym für die Pharmakokinetik vieler Arzneimittel ist das polymorphe Enzym CYP2C19 (S-Mephenytoin-Hydroxylase), welches unter anderem am Stoffwechsel von Protonenpumpenhemmern wie Omeprazol, aber auch an dem von Antidepressiva, Benzodiazepinen und Phenytoin beteiligt ist [5].

Demzufolge sind die Identifikation solcher Polymorphismen und die Kenntnisse anderer einflussnehmender Faktoren auf die Enzymaktivität, wie z. B. die Enzymhemmung oder die Enzyminduktion, ein zentrales Anliegen der modernen Arzneimitteltherapie. Phäno- und Genotypisierungen könnten hier eine wichtige Aufgabe übernehmen, um zukünftig eine sicherere und individuelle Arzneimitteltherapie zu ermöglichen.

Selbst bei bester konventioneller Diagnostik kann nicht immer sicher vorhergesagt werden, ob ein Patient adäquat auf die Standarddosis eines Medikaments reagiert. Zum Beispiel sprechen etwa 30 % aller Patienten mit einer gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) nicht auf die Therapie mit Protonenpumpenhemmern unter Verwendung der Standarddosierung an. Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig und neben einer mangelnden Compliance wird vor allem ein zu schneller Metabolismus vermutet. [6]

Die gastroösophageale Refluxkrankheit ist eine durch pathologischen Reflux von Mageninhalt ausgelöste entzündliche Erkrankung der Speiseröhre (Ösophagus) und in den westlichen Industrienationen weit verbreitet. Das Prinzip der medikamentösen Therapie besteht in einer dauerhaften Reduktion der Magensäureproduktion. Dabei wird eine pH-Wert Anhebung des Magens auf Werte von über vier angestrebt. Als Arzneimittel der Wahl haben sich seit Jahren Protonenpumpenhemmer wie Omeprazol bewährt. Omeprazol liegt als racemisches Gemisch aus R(+)-Omeprazol und S(-)-Omeprazol vor und wird enantioselektiv durch die Leberenzyme CYP3A4 und CYP2C19 des Cytochrom P450-Systems metabolisiert. Als Hauptmetabolite entstehen aus S-Omeprazol über CYP3A4 vorrangig Omeprazol-Sulfon und aus R-Omeprazol über CYP2C19 hauptsächlich 5-Hydroxyomeprazol [7]. Das Enzym CYP2C19 unterliegt dabei einem genetischen Polymorphismus. Dieser ist verantwortlich für die Ausprägung von langsamen (PM), intermediären (IM) und extensiven Metabolisierern (EM). Ferner ist bekannt, dass der Therapieerfolg von Protonenpumpenhemmern unter anderem von diesem CYP2C19-Phänotyp des Patienten abhängig ist. So haben schnelle Metabolisierer niedrigere Serumspiegel und somit zum Beispiel geringere *Helicobacter-pylori*-Eradikationsraten als langsame Metabolisierer [8].

Untersuchungen zum Metabolitenmuster von Omeprazol und seiner Stereoisomere wurden bisher nur für eine Gruppe von gesunden extensiven Metabolisierern publiziert [9]. Für kaukasische GERD-Patienten unter Omeprazol liegen bislang dagegen weder Daten hinsichtlich des Einflusses des Genotyps auf die Pharmakokinetik noch auf pharmakodynamische Parameter vor. Des Weiteren wurde bislang noch keine Methode veröffentlicht, welche es ermöglicht, enantioselektiv neben Omeprazol auch seine beiden Hauptmetabolite in Humanserum zu bestimmen.

## 1.2 Chiralität – Enantiomere – Racemat

Chiralität (Händigkeit, griech. von χεῖρ, ch[e]ir = Hand) nennt man die Eigenschaft bestimmter Systeme, sich wie Bild und Spiegelbild zu verhalten. Ein Molekül wird dann als chiral bezeichnet, wenn zwei Ausprägungen des Moleküls vorhanden sind und sich diese durch Drehungen nicht zur Deckung bringen lassen. Beide Formen (Bild und Spiegelbild) werden als Enantiomere (griech. ἐναντιοζ, enantios = entgegengesetzt) bezeichnet und besitzen ein Stereozentrum (asymmetrisches Zentrum). Zur Unterscheidung beider Enantiomere bedient man sich der R-S-Nomenklatur, mit welcher die räumliche Anordnung der Substituenten beschrieben wird. Enantiomere besitzen in achiraler Umgebung identische physikochemische Eigenschaften mit Ausnahme ihrer optischen Aktivität. Chemisch reine Enantiomere sind optisch aktiv, drehen demnach die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichts nach links bzw. rechts. Im Namen einer Verbindung wird dies durch das Voransetzen eines (-) bzw. eines (+) deutlich, z. B. S(-)-Omeprazol und R(+)-Omeprazol. Zudem können sich optische Isomere pharmakologisch aktiver Verbindungen im Bezug auf ihre physiologische Aktivität, ihren Wirkmechanismus, ihre Toxizität und Nebenwirkungen deutlich unterscheiden. Dies zeigt sich zum Beispiel bei dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Ibuprofen, bei welchem nur das S-Enantiomer analgetisch wirksam ist. Allerdings wird das R-Isomer in vivo nur in die Richtung des S-Isomers umgewandelt. [10]

Ein 1:1 Gemisch der Enantiomere wird als Racemat bezeichnet. Dieses ist optisch inaktiv und besitzt einen Drehwinkel von  $0^\circ$ , da sich die Auswirkungen der rechtsdrehenden und linksdrehenden Form aufheben.

Die meisten chiralen, pharmakologisch aktiven Substanzen sind als Racemate auf dem Markt [11]. Aufgrund der beschriebenen Möglichkeit, dass Enantiomere in Organismen unterschiedliche physiologische Effekte zeigen können, ist eine

Bestimmung beider Enantiomere bedeutsam. Eine für diesen Zweck geeignete und zudem hochselektive Methode stellt die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) dar [12].

### 1.3 Protonenpumpenhemmer

Die Gruppe der Protonenpumpenhemmer zählt zu den weltweit am häufigsten verordneten Medikamenten [13]. Sie spielen eine bedeutende Rolle sowohl in der akuten als auch in der Langzeit-Therapie von säurebedingten Magen-Darm-Erkrankungen. Dabei repräsentieren Protonenpumpenhemmer die Arzneimittel der ersten Wahl für die Behandlung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD), Helicobacter pylori Infektionen, gastro-duodenalen Ulzerationen bedingt durch die Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika und dem Zollinger-Ellison-Syndrom. In Deutschland sind bisher die Protonenpumpenhemmer Omeprazol, Esomeprazol, Pantoprazol, Lansoprazol und Rabeprazol auf dem Markt. Vor der Einführung des ersten Protonenpumpenhemmers Omeprazol im Jahre 1988 wurden vor allem  $H_2$ -Rezeptorantagonisten zur Behandlung säurebedingter intestinaler Beschwerden eingesetzt. Diese erreichen allerdings weder die Wirkstärke noch die Wirkdauer von Protonenpumpenhemmern [14].

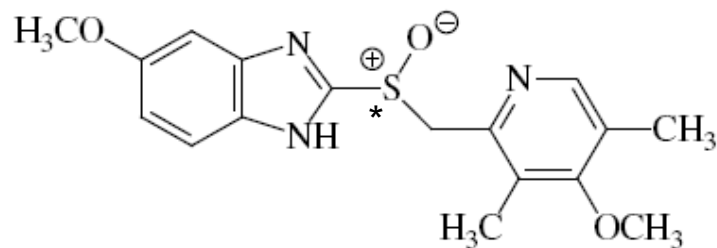
Alle Protonenpumpenhemmer sind substituierte Benzimidazolderivate, welche als inaktive Prodrugs aus dem Dünndarm resorbiert werden und über den Blutkreislauf in die gastrischen Parietalzellen gelangen. Als schwache Basen reichern sich die Protonenpumpenhemmer im sauren Milieu der intrazellulären Canaliculi der Parietalzelle an. Hier werden sie säurekatalysiert (nichtenzymatisch) zum aktiven Sulfenamidderivat umgewandelt, welches kovalent über eine Disulfidbrücke an der Sulfhydrylgruppe der  $H^+/K^+$ -ATPase (Protonenpumpe) bindet und deren Aktivität hemmt. Somit wird der letzte Schritt der Magensäuresekretion irreversibel blockiert. Die Wirkung hält über mehrere Tage an und wird erst durch die Neusynthese des Enzyms aufgehoben. [13]

#### 1.3.1 Omeprazol

Omeprazol (5-Methoxy-2-[(4-methoxy-3,5-dimethyl-pyridin-2-yl)methylsulfinyl]-1H-benzimidazol) gilt als Leitsubstanz für die Gruppe der Protonenpumpenhemmer und wurde 1988 als erster Vertreter dieser Gruppe auf dem europäischen Arzneimittelmarkt zugelassen. Es ist, wie alle anderen Protonenpumpenhemmer,

säurelabil und wird daher in magensaftresistenten Darreichungsformen verabreicht. Oral aufgenommen, findet die Resorption im Dünndarm statt, wobei maximale Plasmakonzentrationen ein bis drei Stunden nach der Applikation erreicht werden und die Plasmahalbwertszeit ca. 40 Minuten beträgt. Omeprazol besitzt ein chirales Zentrum am Schwefelatom (Abbildung 1-1) und liegt als Racemat aus dem S- und R-Enantiomer vor. Die Metabolisierung erfolgt extensiv hepatisch über die Enzyme CYP2C19 und CYP3A4 des Cytochrom P450-Systems. Die Bioverfügbarkeit einer oralen Einzeldosis von 20 mg Omeprazol beträgt ca. 35 % und steigt bei wiederholter Gabe auf rund 60 % an. Bei Patienten mit einer eingeschränkten Leberfunktion kann die Bioverfügbarkeit aufgrund des verringerten first-pass-Effekts auf über 90 % ansteigen. [15]

Omeprazol ist eine schwache Base mit einem Molekulargewicht von 345,42 g/mol und einem  $pK_a$ -Wert von 4 [16]. Es ist leicht löslich in Ethanol und Methanol und sehr schwer löslich in Wasser.

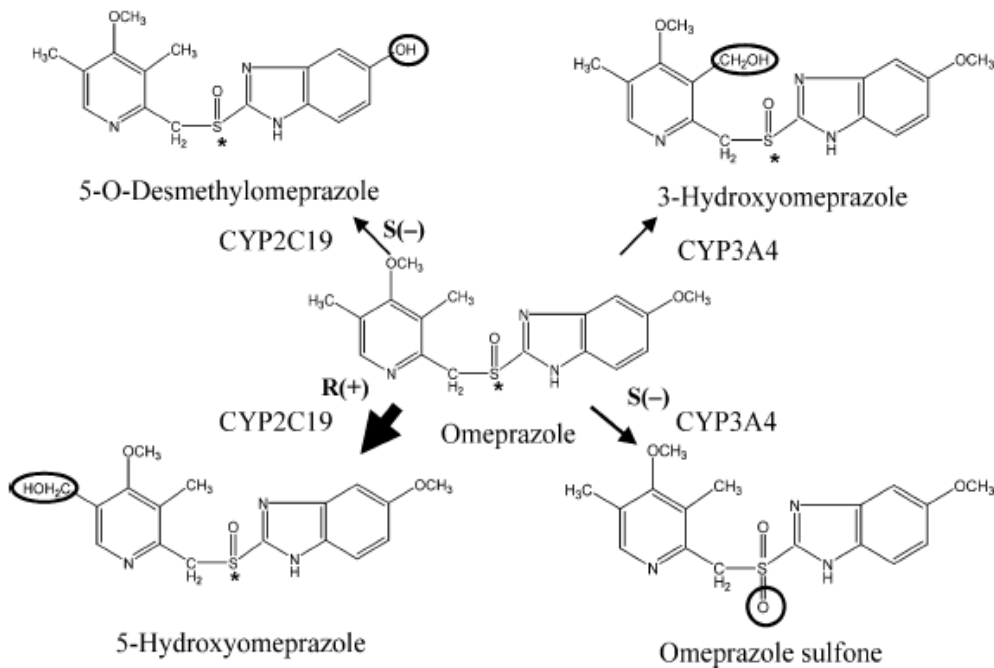


**Abbildung 1-1:** Strukturformel von Omeprazol

Omeprazol wird stereoselektiv hauptsächlich über die Enzyme CYP2C19 und CYP3A4 metabolisiert. Dabei wird S-Omeprazol vorrangig über CYP3A4 zu dem achiralen Omeprazol-Sulfon ( $M = 362$  g/mol) abgebaut, während aus R-Omeprazol über CYP2C19 bevorzugt R-5-Hydroxyomeprazol ( $M = 362$  g/mol) neben einem niedrigeren Anteil von S-5-Hydroxyomeprazol entsteht (Abbildung 1-2). In weitaus geringerem Maße werden ferner die Metabolite 5-O-Desmethylomeprazol (CYP2C19) und 3-Hydroxyomeprazol (CYP3A4) gebildet. Alle Metabolite sind pharmakodynamisch inaktiv. [7, 17]

Die stereoselektive Bestimmung von Omeprazol und seiner Metabolite und die anschließende Berechnung der pharmakokinetischen Parameter stellt eine geeignete Methode sowohl zur Beurteilung der CYP3A4- als auch der CYP2C19-Aktivität dar [17-19].

Untersuchungen an humanen Lebermikrosomen haben ferner gezeigt, dass die Metabolisierung von S-Omeprazol in beträchtlich geringerem Umfang und langsamer erfolgt als die von R-Omeprazol oder des Racemats [7]. Somit scheint CYP2C19 das entscheidende Enzym für den Abbau von Omeprazol zu sein.



**Abbildung 1-2:** Metabolisierungswege von Omeprazol (aus Kanazawa et al. [17])

### 1.3.2 Esomeprazol

Esomeprazol ist das linksdrehende S-Enantiomer von Omeprazol und seit 2002 als erster enantiomerenreiner Protonenpumpenhemmer auf dem Markt.

Die Plasmaeliminationshalbwertszeit beträgt nach wiederholter täglicher Gabe 1,3 Stunden, wobei maximale Plasmaspiegel nach ungefähr 1-2 Stunden erreicht werden.

Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt nach einer Einzeldosis von 40 mg Esomeprazol 64 % und erhöht sich nach wiederholter täglicher Einmalgabe auf 89 %. Für 20 mg Esomeprazol wurden entsprechende Werte von 50 % bzw. 68 % ermittelt. Des Weiteren erreichen Patienten mit einer eingeschränkten Leberfunktion niedrigere Metabolisierungsraten und somit höhere Plasmakonzentrationen als Gesunde. [20]

Die Metabolisierung erfolgt auch bei Esomeprazol über die Leberenzyme CYP2C19 und CYP3A4. Klinisch-pharmakokinetische Untersuchungen konnten zeigen, dass CYP2C19 insbesondere unter steady-state-Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle bei der Biotransformation und Elimination von Esomeprazol spielt [21].

Auch der Metabolismus von Esomeprazol erfolgt stereoselektiv, wobei vor allem Omeprazol-Sulfon (CYP3A4) und weniger Hydroxyomeprazol (CYP2C19) gebildet wird. Ferner konnte die chirale Stabilität von Esomeprazol in vivo demonstriert werden. Schnelle Metabolisierer von CYP2C19 (EM) verstoffwechselten Esomeprazol zudem langsamer als Omeprazol und erreichten somit höhere Bioverfügbarkeiten. [22]

### **1.3.3 Risiken und unerwünschte Ereignisse unter einer Protonenpumpenhemmer-Therapie**

Obwohl Protonenpumpenhemmer allgemein als gut verträglich und sicher angesehen werden, gibt es doch einige Risiken, gerade bei einer Langzeittherapie, zu beachten. Die häufigsten Nebenwirkungen unter einer Protonenpumpenhemmer-Therapie sind Kopfschmerzen, Unterbauchbeschwerden, Übelkeit, Obstipation, Blähungen und Diarrhö. Diese unerwünschten Effekte verlaufen gewöhnlich mild, sind selbstlimitierend und unabhängig vom Alter oder der Dosis. Allerdings besteht, vor allem in der Langzeittherapie, auch das Risiko andere u. a. auch schwerwiegende Nebenwirkungen zu erleiden. Zum Beispiel können, bedingt durch die verminderte Magensäure, Vitamin B12-Mangel sowie Kalziummangel, verbunden mit Osteoporose, auftreten oder die Absorption bestimmter Arzneimittel beeinflusst werden. [13]

Die Magensäure dient als Hauptabwehrmechanismus gegenüber aufgenommenen pathogenen Keimen, so dass der Verlust der normalen Magen-Azidität mit einem erhöhten Risiko für Infektionen, wie zum Beispiel Pneumonien [23], einhergeht. Mit dem erhöhten Einsatz von Protonenpumpenhemmern können zudem auch seltenere Nebenwirkungen auftreten, wie zum Beispiel Sehstörungen [24].

Ferner bestehen Interaktionsrisiken mit allen Arzneimitteln, die über dieselben Leberenzyme (CYP3A4, CYP2C19) abgebaut werden, die abermals zu unerwünschten Arzneimittelereignissen führen können [25].

Seit August 2009 bzw. Januar 2010 sind die Protonenpumpenhemmer Omeprazol und Pantoprazol aus der Verschreibungspflicht in die Apothekenpflicht entlassen worden. Folglich stehen diese Medikamente für jeden Patienten frei zur Verfügung, welches die Interaktionsproblematik weiter verstärkt. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen können die Folge sein.

Besorgniserregend ist ferner der potentiell übermäßige Gebrauch von Protonpumpeninhibitoren, der in verschiedenen Studien bestätigt werden konnte [26-27]. So werden Protonenpumpenhemmer unter anderem häufig für die Behandlung

von Stressulzera in der Intensivmedizin verordnet, trotz geringer Evidenz für den prophylaktischen Einsatz dieser Medikamente in diesem Bereich [28].

## 1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: high performance liquid chromatography; HPLC) ist ein chromatographisches Verfahren zur Trennung von chemischen Substanzen, welches sich für nichtflüchtige Substanzen im Bereich der Arzneimittelanalytik etabliert hat. Sie kann in verschiedene Trennverfahren wie Normalphasen-, Umkehrphasen-, Ionenaustausch- oder Größenausschluss-Chromatographie unterteilt und mit verschiedenen Detektoren (z. B. Massenspektrometer, Fluoreszenz- und UV/VIS-Detektoren) ausgestattet werden. Die HPLC liefert unmittelbar sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen.

Ein modernes HPLC-System besteht aus ein oder zwei Pumpen, einem Gradientenmischer, einem Autosampler mit Probeninjektionssystem, einer Trennsäule, einem Detektor und einem Computer mit geeigneter Software zur Auswertung der Chromatogramme.

Der eigentliche chromatographische Trennprozess findet in der Trennsäule statt. Eines der wichtigsten Materialien, die sich als stationäre Phase in der Trennsäule befindet, ist Silicagel. Es kann einerseits als sehr polare Phase direkt zur Chromatographie verwendet werden (Normalphasen-Chromatographie) oder andererseits als Trägermaterial für chemisch gebundene Phasen variierender Polarität dienen. Durch die Umsetzung des Silicagels mit langen Alkylketten entstehen unpolare stationäre Phasen, welche in der Reversed-Phase-Chromatographie (RP, Umkehrphasen-Chromatographie) Verwendung finden.

Aus diesen vielfältigen Möglichkeiten in der Wahl der stationären Phase resultiert ein weites Anwendungsspektrum der HPLC.

Das Prinzip der HPLC ist aus der klassischen Säulenchromatographie bzw. der Dünnschichtchromatographie bekannt. In der Normalphasen-HPLC bildet ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche die stationäre Phase. Die mobile Phase ist relativ apolar und wird mit Hilfe einer Pumpe durch die Anlage gepresst. Die Probeninjektion erfolgt durch den Injektor, wobei die mobile Phase die gelöste Probe in die Trennsäule transportiert. Bei einer Gradiententrennung ändert sich während der Analyse die Zusammensetzung des Fließmittels und somit dessen Polarität. Bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant, spricht man von einer isokratischen



Elution. Die Trennung erfolgt durch die unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an der stationären Phase, wobei polare Stoffe später eluiert werden als apolare Stoffe. Das Füllmaterial ist somit für die Art und Stärke der Wechselwirkungen und somit für den Trenneffekt verantwortlich. Die mobile Phase beeinflusst zusätzlich das jeweilige Verteilungs-Gleichgewicht. Die Wahl der mobilen Phase hängt einerseits von den Eigenschaften (Polarität) der zu trennenden Substanzen und andererseits von der stationären Phase ab. Über die Zusammensetzung der mobilen Phase lassen sich die Elution bzw. die Retentionszeiten von Substanzen steuern.

Der Detektor misst ständig die Zusammensetzung der mobilen Phase hinter der Säule. Verändert sich diese, wird eine veränderte Signalhöhe an den Schreiber gegeben und die Substanzpeaks entstehen im Chromatogramm. Die Zeit nach der das Signal erscheint, die Elutionszeit, ist unter den gewählten Bedingungen für jeden Stoff des Gemisches charakteristisch, wobei die Fläche eines jeden Signals proportional zur Menge des entsprechenden Stoffes ist. [29-30]

Es stehen unterschiedliche Detektoren für die Substanzanalyse zur Verfügung. Der UV/VIS-Detektor findet ein sehr breites Anwendungsgebiet und gehört praktisch zu der Standardausrüstung eines HPLC-Systems.

### **1.4.1 Massenspektrometrie**

Wegen ihrer Universalität nimmt die Massenspektrometrie eine besondere Stellung unter den verschiedenen Detektionssystemen ein. Sie ist empfindlich, selektiv und liefert zudem Aussagen zum Molekulargewicht. Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) trennt zusätzlich nach Molekülstruktur und bietet dadurch eine höhere Selektivität und den Vorteil einer geringen Probenvorbereitung. Sie ist somit hervorragend für die simultane quantitative Bestimmung von Arzneistoffen mit ihren Metaboliten in biologischen Matrices geeignet [31].

Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Die zu analysierende Probe wird in das Massenspektrometer eingebracht, verdampft und ionisiert. Dabei ist die Ionisation der neutralen Probenmoleküle die Voraussetzung für die Aufnahme eines Massenspektrums. Nachfolgend lassen sich die Ionen als bewegte geladene Teilchen in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) auftrennen und anschließend detektieren.

Für die Spezifität und Sensitivität einer HPLC gekoppelten Massenspektrometrie ist die Auswahl der Geräteparameter, wie die Ionisierungsart, die Massenübergänge, die Temperatur und die Spannung entscheidend.

In Abhängigkeit von der Polarität der Substanz werden zum Beispiel unterschiedliche Ionisierungsmethoden eingesetzt. Im Wesentlichen wird die HPLC heute mit der Elektrospray-Ionisation (ESI), der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) oder der Photonenionisation unter Atmosphärendruck (APPI) gekoppelt. ESI ist eine sehr sanfte Ionisierungsmethode und eignet sich für vorionisierte oder leicht ionisierbare, polare sowie thermolabile Substanzen. Dabei wird die Analytlösung aus einer feinen Kapillare unter Atmosphärendruck in ein starkes elektronisches Feld versprüht, ionisiert und desolvatisiert. APCI- und APPI-Ionenquellen sind in der Lage auch nicht vorionisierte und weniger polare Substanzen zu ionisieren und in die Gasphase zu überführen. Sie liefern stabilere Ionisationen und damit weniger ausgeprägte Matrixeffekte als ESI. [32] In einer APCI-Ionenquelle wird der aus dem chromatographischen Trennsystem ankommende Eluentenstrom durch ein Zerstäubungsgas (z. B. Stickstoff) fein zerstäubt und durch Heizelemente stark erhitzt. Hierbei verdampft der HPLC-Eluentenstrom schlagartig. Die weitgehend noch unzersetzten Analytmoleküle werden mit dem Trägergas in den Hochvakuumbereich des Gerätes transportiert. Auf dem Weg dorthin werden sie durch eine Metallnadel, an die wahlweise eine negative oder positive Spannung angelegt werden kann, ionisiert. Hierbei werden aufgrund der Koronaentladungen an der Metallnadel ionisierte Trägergasmoleküle generiert. Durch Zusammenstöße dieser ionisierten Gasmoleküle mit den Analyten werden Ladungen übertragen und somit die Ionisation der Analytmoleküle induziert. [33]

APPI stellt, durch die Fähigkeit auch Substanzen zu ionisieren, die weder mit ESI noch mit APCI ionisierbar sind, eine alternative Ionisationsmöglichkeit dar. APPI hat sich unter anderem bei einem großen Bereich von unpolaren Arzneistoffen und Arzneistoff-ähnlichen Substanzen bewährt und zeichnet sich dabei durch eine bessere Ionisationseffizienz und höhere Sensitivität aus. [34]

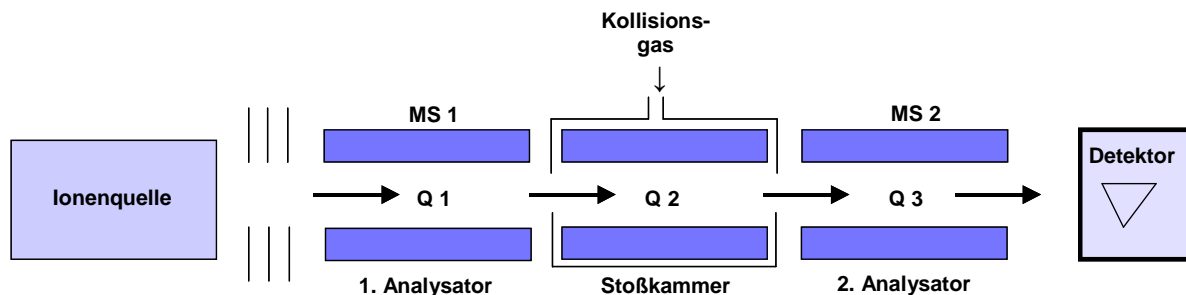
Der Aufbau der APPI-Ionenquelle entspricht weitestgehend dem der APCI-Quelle, wobei die Koronaentladungsnadel durch eine Vakuum-UV-Lampe ersetzt wurde. Diese emittiert Photonen, welche die Ionisation der Analyten bewirkt.

Um ausreichende Ionisationseffekte zu erreichen, ist es in der Regel notwendig zum Eluentenstrom ein Dopant, d.h. eine leicht zu ionisierende Substanz (häufig Toluol

oder Aceton) zuzugeben. Der Dopant wird durch die Absorption von Photonen ionisiert. Die so gebildeten Dopant-Kationen übertragen ihre Ladung auf die Analytmoleküle und steigern somit die Ionisierungseffizienz.

Die Typisierung eines Massenspektrometers erfolgt durch den eingesetzten Analysator. Da in dieser Arbeit ausschließlich ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet wurde, soll im Folgenden nur auf diesen Massenanalyserortyp eingegangen werden.

Ein Triple-Quadrupol (Abbildung 1-3) zeichnet sich durch drei unmittelbar hintereinander geschaltete Quadrupole (Q) aus. Dabei dient der erste Quadrupol zur Massenanalyse der Ionen, der zweite als Kollisionszelle und der dritte wiederum zum Scannen der Ionen. Diese Anordnung erlaubt neben der einfachen Massenspektrometrie (MS) auch die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).



**Abbildung 1-3:** Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

Bei der Tandem-MS sind zwei Massenspektrometer derart miteinander gekoppelt, dass die durch den ersten Massenfilter (MS1, Q1) selektierten Vorläufer-Ionen durch Stöße mit dem Kollisionsgas in der Stoßkammer (Q2) fragmentiert werden. Die entstehenden Produkt-Ionen können im nachgeschalteten Massenfilter (MS2, Q3) aufgetrennt und nachfolgend detektiert werden.

Bei der Produkt-Ionen-Analyse wird im Q1 ein Vorläufer-Ion selektiert, im Q2 fragmentiert und im Q3 werden die Massen der Fragmente analysiert. Diese Methode wird sehr häufig verwendet, vor allem für die Detektion und spezifische Quantifizierung in der HPLC.

Im Vergleich zu Single-Quadrupol-, Ionenfallen- und Flugzeit-MS, sind Triple-Quadrupol-Massenspektrometer weit verbreitet, vor allem wenn eine spezifische und sehr empfindliche Routinequantifizierung gefragt ist. [35-36]

### 1.4.2 Chromatographische Parameter der HPLC

Aus einem Chromatogramm können verschiedene Angaben zur Qualität und zur Optimierung der Trennung sowie der Säule geschlossen werden, wobei ein chromatographischer Peak durch mehrere Parameter charakterisiert werden kann.

Die Retentionszeit ( $t_R$ ) entspricht der Zeit von der Probeninjektion bis zum Erreichen des Peakmaximums. Neben den physikalischen Eigenschaften der Analyten ist die Retentionszeit von der Länge der Trennsäule und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase abhängig. Unter konstanten chromatographischen Bedingungen erscheint eine reine Substanz daher immer mit derselben Retentionszeit, welche folglich zur Identifizierung einer Substanz genutzt werden kann.

Die Totzeit ( $t_m$ ) entspricht der Zeit, welche die Moleküle der mobilen Phase benötigen, um die Säule ohne Wechselwirkungen zu passieren. Ist die Säule relativ lang oder strömt die mobile Phase langsam, so ist die Totzeit der Trennsäule groß und somit auch die Retentionszeit. Um Chromatogramme vergleichen zu können, welche an verschiedenen Säulen und bei unterschiedlicher Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase erhalten wurden, benötigt man folglich eine geeignetere Größe. Zu diesem Zweck dient der Retentionsfaktor ( $k$ , früher Kapazitätsfaktor), welcher durch die Umwandlung der Retentionszeit in eine dimensionslose Größe erhalten wird (Gleichung 1-1).

$$k = (t_R - t_m) / t_m$$

**Gleichung 1-1**       $k$ : Retentionsfaktor,  $t_R$ : Retentionszeit,  $t_m$ : Totzeit der Trennsäule

Der Retentionsfaktor, auch  $k$ -Wert genannt, ist sowohl von der Länge der Trennsäule als auch von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig, wobei Werte zwischen eins und fünf als optimal angesehen werden. Größere  $k$ -Werte bedeuten lange Analysenzeiten und bei kleineren  $k$ -Werten können ungenügende Auftrennungen resultieren.

Die Trennstufenzahl  $N$  (Zahl der theoretischen Böden) charakterisiert die Trennleistung einer Säule (Gleichung 1-2). Je höher die Trennstufenzahl, desto größer ist die Trennleistung und umso schmaler sind die Peaks. Die Trennstufenzahl ist umso größer, je besser die Säule gepackt wurde und je kleiner die Teilchen sind und damit je größer die Oberfläche der stationären Phase ist. Ferner wird sie umso

größer, je länger die Säule und je optimaler die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ist.

$$N = 5,54 * (t_R / W_{0,5})^2$$

**Gleichung 1-2**  $t_R$ : Retentionszeit, N: Trennstufenzahl,  $W_{0,5}$ : Peakbreite in halber Peakhöhe

Eine Säule mit einer hohen Trennstufenzahl kann auch Gemische trennen, welche sich in ihrem Selektivitätskoeffizient  $\alpha$  nur geringfügig unterscheiden.

Der Selektivitätskoeffizient oder auch Trennfaktor  $\alpha$  genannt, ist ein Maß für die Selektivität eines chromatographischen Systems (Gleichung 1-3). Er beschreibt die Lage eines Peaks in Bezug auf einen weiteren Peak und somit die Fähigkeit einer Methode, zwei Stoffe voneinander zu trennen.

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad \text{mit } k_2 > k_1$$

**Gleichung 1-3** k: Retentionsfaktor,  $\alpha$ : Selektivitätskoeffizient

Um eine Trennung zu erreichen muss  $\alpha > 1$  sein, ist  $\alpha = 1$  so werden die beiden Komponenten nicht getrennt, da ihre Retentionszeiten gleich groß sind. Der Selektivitätskoeffizient lässt sich durch die Temperatur und die Eigenschaften der mobilen und stationären Phase (pH-Wert, Polarität, Ionenstärke) beeinflussen. [29] Entscheidend für eine fehlerfreie quantitative Analyse ist ferner die Peaksymmetrie, welche mit Hilfe des Symmetriefaktors ( $S_S$ ) nach Gleichung 1-4 bestimmt wird.

$$S_S = b_{0,05} / (2A)$$

**Gleichung 1-4**  $S_S$ : Symmetriefaktor,  $b_{0,05}$ : Peakbreite bei 5 % Peakhöhe, A: Breite des Peaks vom Beginn bis zu seinem Maximum bei 5 % Peakhöhe

Im Idealfall folgen die erhaltenen Signale einer Gauß'schen Normalverteilungskurve ( $S_S = 1$ ). In der Praxis weichen die Peaks jedoch häufig von der idealen Symmetrie ab und erscheinen asymmetrisch. Eine Asymmetrie, bei welcher der Frontanstieg steiler ist als der Peakabfall, wird als Tailing ( $S_S > 1$ ) bezeichnet. Hingegen wird ein weniger steiler Anstieg als der Abfall als Fronting oder Leading ( $S_S < 1$ ) charakterisiert.

Die Peaksymmetrie ist ein wichtiges Indiz für die Qualität des Chromatogramms, wobei starke Asymmetrien Integrationsfehler bedingen können und somit die Quantifizierung erschweren.

## 1.5 Bisherige Methoden zur Bestimmung von Omeprazol

Für die chromatographische Bestimmung von Omeprazol in Humanplasma existieren eine Reihe von achiralen Methoden, wobei entweder Omeprazol allein oder zusammen mit seinen Hauptmetaboliten bestimmt wird. Für die Detektion wird entweder die UV-Detektion [18, 37-41] oder die Massenspektrometrie verwendet [42-46], wobei die massenspektrometrischen Nachweismethoden wesentlich selektiver sind.

Die chirale Trennung von Omeprazol und seiner Metaboliten bereitet beträchtlich mehr Schwierigkeiten. Für die enantioselektive Bestimmung von Omeprazol allein bzw. mit seinen Hauptmetaboliten gibt es verschiedene Möglichkeiten, z. B. die Normalphasen-Chromatographie, die Umkehrphasen-Chromatographie oder die Kapillarelektrophorese [47, 11]. Bonato et al. [47] und Karlsson et al. [11] stellten vor allem die Optimierung der chiralen Trennung in den Vordergrund, wobei die Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten, wie z. B. Serum, eine untergeordnete Rolle spielte und nicht validiert wurde. Kanazawa et al. [17] beschrieben eine enantioselektive Umkehrphasen-HPLC-Methode mit UV-Detektion und massenspektrometrischer Bestimmung der Substanzen, führten aber ebenfalls keine vollständige Validierung der Methode in biologischen Flüssigkeiten durch. Zudem erfolgte keine gleichzeitige Bestimmung von Omeprazol-Sulfon. Eine validierte Methode für die enantioselektive Bestimmung von Omeprazol ohne Metaboliten in Humanserum wurde von Cass et al. [48] entwickelt. Diese Methode bedient sich einer Säulenschaltung mit enantioselektiver Normalphasenseparation und UV-Detektion, wobei sehr lange Laufzeiten, breite Peaks der Analyten und Störungen durch endogene Substanzen nachteilig auffielen.

Eine weitere voll validierte chirale Normalphasenseparation für Omeprazol mit UV-Detektion wurde von Orlando und Bonato entwickelt [49]. Stenhoff et al. [12] beschrieben ferner eine hochselektive und schnelle enantioselektive Bestimmungsmethode für Omeprazol mit sehr niedriger Nachweisgrenze. Sie nutzten die massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse nach einer chiralen Normalphasentrennung von Omeprazol. Um bei dieser Methode eine ausreichende Ionisation der

Analyten zu gewährleisten und die Explosionsgefahr des Normalphasen-Elutionsmittels zu verhindern, führten sie eine Make-up-Flüssigkeit, bestehend aus Ethanol und wässrigem Puffer, nach der Säule aber vor Erreichen der Ionenquelle zu. Zusammenfassend ist zu sagen, dass bisher keine Methode beschrieben wurde, die in der Lage ist, simultan Omeprazol-Sulfon und enantioselektiv Omeprazol sowie Hydroxyomeprazol in Humanplasma zu bestimmen und zu quantifizieren.

## 1.6 Das Cytochrom P450-Enzymsystem

Die Cytochrom P450 (CYP) Proteine sind eine Superfamilie von Hämproteinen, welche ubiquitär im gesamten Tier- und Pflanzenreich sowie in Bakterien nachgewiesen werden konnten [50-51]. Eine wichtige Aufgabe dieser Enzyme besteht im Fremdstoffmetabolismus, wobei sie zur Verbesserung der Elimination lipophile Substrate in polarere Metabolite transformieren. Folglich nimmt das Cytochrom P450-System auch einen besonderen Stellenwert innerhalb des Metabolismus einer Vielzahl von Arzneimitteln ein. So wird geschätzt, dass es für 70-80 % aller Phase-I-Umwandlungen klinisch relevanter Pharmaka verantwortlich ist [52]. Martin Klingenberg gilt als Entdecker der Cytochrom P450-Enzyme im Jahre 1958. Er fand ein Kohlenmonoxid-bindendes Pigment in der mikrosomalen Fraktion von Rattenlebern, welches in seiner reduzierten Form ein Absorptionsmaximum von 450 nm besaß. Im Jahre 1962 konnten Omura und Sato dieses Pigment als Hämprotein identifizieren. Die standardisierte Nomenklatur der CYP-Enzyme richtet sich nach der Nomenklatur ihrer Aminosäuresequenzen. Alle Enzyme bekommen als erstes das Präfix „CYP“, gefolgt von einer arabischen Zahl, welche Auskunft über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Genfamilie gibt. Darauf folgt ein Buchstabe für die Subfamilie und abschließend eine weitere arabische Zahl, die das individuelle Enzym kennzeichnet. Für jedes Enzym erhält das häufigste oder auch das Wildtyp-Allel die Bezeichnung \*1. Alle weiteren Allelvarianten werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung bzw. Beschreibung durchnummeriert (\*2, \*3 etc.). [51, 53]

Häufig stellt die Verstoffwechslung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Eliminierung einer Substanz oder der Bildung aktiver Metabolite dar. Aus diesem Grund hat die Variabilität des enzymatischen Metabolismus einen entscheidenden Anteil an den interindividuellen Unterschieden in der Wirksamkeit bestimmter Arzneimittel. Primär wird die basale Metabolisierungsrate von der individuellen genetischen Konstitution bestimmt. Ferner spielen aber auch das Alter, das

Geschlecht sowie der Krankheitsstatus und die Einnahme weiterer Medikamente (Inhibitoren, Induktoren) eine Rolle. [54]

### 1.6.1 Cytochrom P450 2C19

Das hauptsächlich in der Leber exprimierte Enzym Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19) ist an der oxidativen Umwandlung zahlreicher Arzneistoffe beteiligt.

Die stark eingeschränkte Fähigkeit einzelner Individuen, das Antikonvulsivum Mephenytoin zu metabolisieren, führte 1979 zu einer der ersten Beschreibungen einer genetisch bedingten Variabilität im Arzneistoffmetabolismus [5]. Später konnten klinische Studien demonstrieren, dass die Hydroxylierung von Mephenytoin einem autosomal rezessiv vererbten genetischen Polymorphismus unterliegt, welcher bei rund 5 % der untersuchten Probanden eine defekte S-Mephenytoin-Hydroxylase zur Folge hatte [55]. Dieses defekte Enzym wurde im Jahre 1994 als CYP2C19 identifiziert [56-57]. Aus demselben Jahr stammt die Beschreibung der beiden häufigsten Allelvarianten CYP2C19\*2 und CYP2C19\*3. Der Mutation CYP2C19\*2 liegt eine Punktmutation (G→A) des Basenpaares 681 in Exon 5 zugrunde, welches zu einem frühzeitigen Stop-Codon führt. Hieraus resultiert ein verkürztes Protein aus lediglich 234 Aminosäuren mit fehlender Häm-Bindungsstelle und somit fehlender katalytischer Aktivität. Ein ähnlicher Mechanismus ist für das CYP2C19\*3 verantwortlich. Infolge einer Punktmutation des Basenpaares 636 (G→A) entsteht hier ein inaktives Protein aus 211 Aminosäuren. [58-59] Obwohl bis zum jetzigen Zeitpunkt bereits 25 verschiedene Allele beschrieben wurden, davon sieben mit fehlender und eins mit erhöhter Enzymaktivität [60], ist eine erniedrigte bzw. vollständig fehlende metabolische Aktivität fast ausschließlich durch CYP2C19\*2 oder \*3 bedingt.

Der größte Teil der kaukasischen Bevölkerung (ca. 70 %) zählt hinsichtlich des Enzyms CYP2C19 zu den extensiven Metabolisierern (EM) mit zwei funktionsfähigen Allelen (wt/wt). Hingegen gehören etwa 3 % zu den langsamen Metabolisierern (PM) ohne CYP2C19-Aktivität (mt/mt) und rund 30 % zu den intermediären Metabolisierern (IM) mit einem defizienten Allel (wt/mt). [61]

Hinsichtlich der Häufigkeit von CYP2C19-Genpolymorphismen bestehen erhebliche interethnische Unterschiede. So befinden sich zum Beispiel in der asiatischen Bevölkerung 12-22 % langsame Metabolisierer [62].

Einen sehr bedeutsamen Einfluss scheint der CYP2C19-Genotyp auf den Erfolg einer Protonenpumpenhemmer-Therapie zu haben. So konnten mit Lansoprazol in asiatischen Patienten mit einer gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) deutlich



höhere Heilungsraten bei PM im Vergleich zu EM erreicht werden [63-64]. Ferner zeigte sich in zahlreichen Studien eine signifikante CYP2C19-Genotyp-Abhängigkeit bei der Helicobacter pylori-Eradikation [65-68].

### **1.6.2 Cytochrom P450 3A4**

Das Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) ist eine der wichtigsten Cytochrom P450 Monooxygenasen und wird hauptsächlich in der Leber und dem Darm exprimiert. Es gehört zu der, mit durchschnittlich 30 % des gesamten P450-Gehaltes, wichtigsten humanen CYP-Subfamilie (CYP3A).

CYP3A4 metabolisiert ein sehr breites Spektrum an klinisch relevanten Arzneistoffen, unter anderem Makrolidantibiotika (Erythromycin), Antidepressiva (Mirtazapin, Venlafaxin), Immunsuppressiva (Cyclosporin) und Protonenpumpenhemmer. Insgesamt werden über 50 % aller eingesetzten Arzneistoffe zumindest teilweise über CYP3A4 verstoffwechselt [69].

Im Unterschied zu anderen humanen CYPs (z. B. CYP2C19, CYP2D6), für die schon längere Zeit genetische Polymorphismen bekannt sind, welche verschiedene Allele mit fehlender Enzymaktivität ausprägen, wurde für CYP3A4 erst vor einigen Jahren das erste und bisher einzige Allel mit fehlender Enzymaktivität beschrieben [70]. Die Häufigkeit dieser Allelvariante wurde gleichzeitig ermittelt und lag bei deutschen Kaukasiern bei < 0,06 %.

Nach heutigem Kenntnisstand ist die interindividuelle Variabilität der CYP3A4-Aktivität nur zu einem sehr geringen Teil durch Genpolymorphismen erklärbar, während nicht genetische Faktoren vermutlich einen weitaus entscheidenderen Einfluss haben [71].

## **1.7 Die gastroösophageale Refluxkrankheit**

Die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) ist durch einen gesteigerten gastroösophagealen Reflux mit konsekutiven organischen Komplikationen und/oder einer Beeinträchtigung der Lebensqualität definiert [72]. Sie ist mit einer Prävalenz von 10-20 % eine sehr häufige Erkrankung der westlichen Industrienationen mit weiterhin steigender Inzidenz. Parallel zur Zunahme der Refluxkrankheit wird ferner in wachsender Zahl eine mögliche, bisher seltene Folgeerkrankung, das Adenokarzinom des distalen Ösophagus, beobachtet. Dieses kann sich infolge eines Barrett-Ösophagus entwickeln, einer entzündlich bedingten, metaplastischen Umwandlung des normalen Plattenepithels der Speiseröhre in Zylinderepithel. [73-74]

Ein Pionier auf dem Gebiet der GERD war Asher Winkelstein, welcher 1935 die Refluxösophagitis als erster klinisch definierte. Er vermutete, dass durch den Reflux von gastraler Salzsäure und Pepsin die Ösophagusschleimhaut geschädigt wird und dieses zu einer Entzündung, der „peptischen Ösophagitis“, führt [75]. Philip Allison entwickelte diesen Gedanken weiter und beschrieb 1951 die Verbindung zwischen Refluxösophagitis und Hiatushernie [76-77].

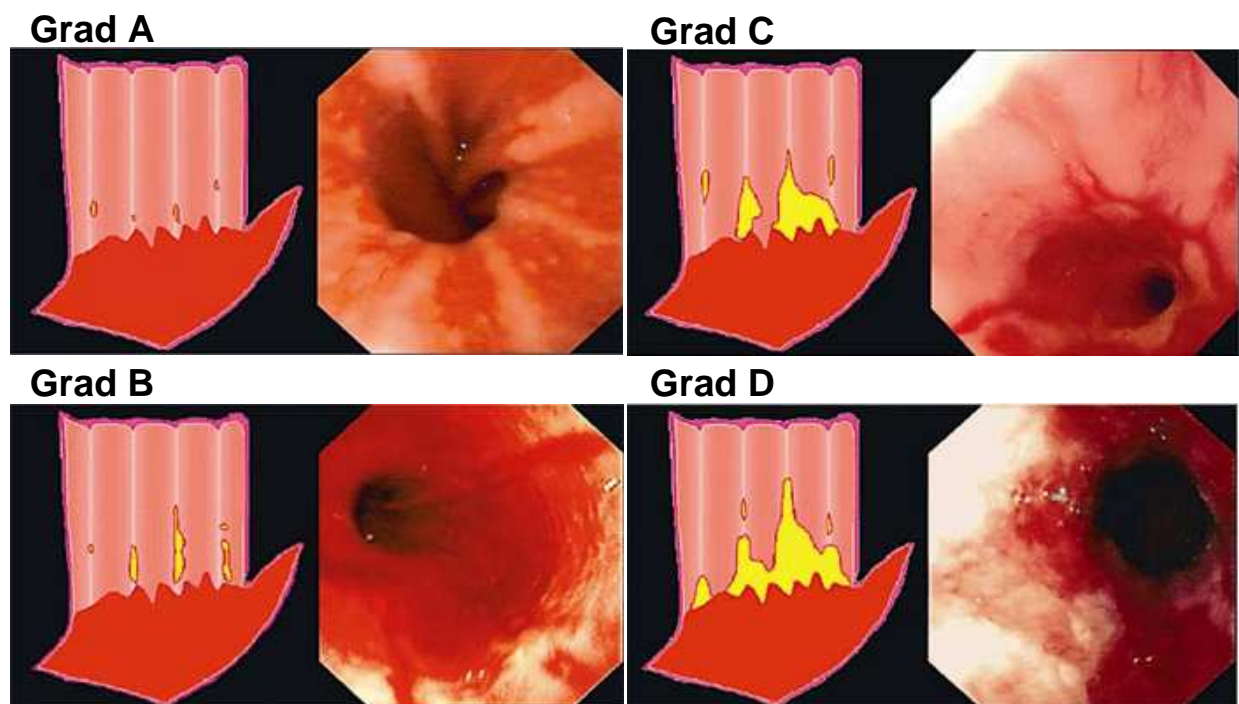
Lange Zeit wurde das Vorhandensein einer Hiatushernie als eine Voraussetzung für die Entstehung einer Refluxösophagitis angenommen [78]. Mit Hilfe der Entwicklung und Verbreitung verschiedener funktionsdiagnostischer Untersuchungsmethoden konnte dies jedoch nicht bestätigt, sondern nur ein mittelbarer Zusammenhang festgestellt werden. Durch neue Messmethoden erkannte man als Ursache eines pathologischen gastroösophagealen Refluxes vorwiegend eine Funktionsstörung des Verschlussmechanismus des unteren Ösophagusphinkters [79]. Hierbei handelt es sich nicht um einen anatomisch definierten Schließmuskel, sondern um eine mehrere Zentimeter lange Hochdruckzone am gastroösophagealen Übergang. Dieser untere Ösophagusphinkter stellt beim Menschen die wesentliche Barriere zwischen Magen und Speiseröhre dar. Im Ruhezustand ist der Sphinkter tonisch kontrahiert und verhindert damit den Reflux von Mageninhalt in den Ösophagus. Dieses geschieht allerdings nicht vollständig, denn auch gesunde Menschen haben, insbesondere postprandial, einen physiologischen Reflux [80]. Des Weiteren ist die Magenentleerung bei 43-57 % der GERD-Patienten verzögert, so dass von einigen Autoren ein Zusammenhang der Refluxkrankheit mit einer Motilitätsstörung des gesamten oberen Verdauungstraktes vermutet wird [81-82]. Die Pathogenese der GERD ist folglich sehr komplex und multifaktoriell. Zu den pathogenen Faktoren gehören ferner die Potenz des Refluates, eine gestörte ösophageale Clearance, eine verminderte Resistenz der Ösophagusschleimhaut, eine Hypersekretion von Magensäure und ein verminderter Speichelfluss [81].

Das Leitsymptom der GERD ist das Sodbrennen, welches in 75 % der Patienten zur Verdachtsdiagnose führt. Es präsentiert sich typischerweise als ein aus dem Epigastrium hinter dem Brustbein aufsteigendes brennendes Schmerzgefühl. Weitere Symptome sind saures Aufstoßen, Regurgitationen, Dysphagie und dyspeptische Oberbauchbeschwerden, wobei die Beschwerden bevorzugt nach der Nahrungsaufnahme auftreten. [83] Treten sie hingegen nachts oder nüchtern auf, liegt oftmals ein höherer Grad der Ösophagitis vor [84]. Aus klinisch-endoskopischer Sicht werden

drei Entitäten unterschieden, die Nichterosive- (NERD) und Erosive-Refluxkrankheit (ERD) sowie der Barrett-Ösophagus. Die NERD ist durch typische Refluxsymptome und eingeschränkte Lebensqualität, jedoch im Gegensatz zu der ERD ohne endoskopisch nachweisliche Läsionen der Ösophagealschleimhaut, gekennzeichnet. Ziel der Therapie ist es demnach, sowohl bei der NERD als auch bei der ERD, Beschwerdefreiheit zu erreichen. Zusätzlich wird bei der ERD eine Abheilung der Läsionen angestrebt, in der Hoffnung, spätere Komplikationen zu vermeiden. Die etablierteste, weil effektivste Therapie ist die konservative Behandlung der GERD mittels Protonenpumpenhemmern.

### 1.7.1 Diagnostik und Klassifikationen der GERD

Das Erheben von objektiven Befunden ist entscheidend für die Diagnostik des häufig subjektiven Beschwerdebildes der GERD und sollte dementsprechend immer standardisiert erfolgen. Die Endoskopie als bildgebendes Verfahren erlaubt eine solche Objektivierung der GERD-Manifestation.



**Abbildung 1-4:** Los-Angeles-Klassifikation der Refluxösophagitis (Grad A-D) mit korrespondierendem endoskopischen Beispiel und schematischer Grafik (aus [85])

Zur Einteilung des Schweregrades der Refluxösophagitis stehen dabei mit der Savary-Miller-, MUSE- und Los-Angeles-Klassifikation drei Schemata zur Verfügung. Inzwischen hat sich international die Los-Angeles-Klassifikation durchgesetzt mit einer

guten Korrelation zwischen dem endoskopischen Befund und der klinischen Symptomatik [83]. Sie unterteilt, wie in Abbildung 1-4 dargestellt, die Refluxösophagitis in Grad A bis D. Im erste Stadium, welches als Los-Angeles-Grad A (LA-A) bezeichnet wird, sind eine oder mehrere isolierte Mukosaläsionen unter 5 mm zu diagnostizieren. Los-Angeles-Grad B (LA-B) weist eine oder mehrere Schleimhautläsionen über 5 mm auf, die jedoch die Spitzen zweier Mukosalängsfalten nicht überschreiten. Als Los-Angeles-Grad C (LA-C) werden ein oder mehrere Schleimhautläsionen bezeichnet, welche mehrere Mukosafalten überschreiten, wobei jedoch noch keine zirkulären Defekte auftreten. Sind zirkuläre Defekte nachweisbar, spricht man vom Los-Angeles-Grad D (LA-D).

Ferner konnte in mehreren Arbeiten eine enge Korrelation zwischen dem Ausmaß der Refluxösophagitis bzw. dem Vorhandensein einer Barrett-Mukosa und der Schwere des pH-metrisch nachgewiesenen sauren Reflux gezeigt werden [86-88].

### **1.7.2 Die Ösophago-Gastro-Duodenoskopie**

Die Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) stellt den Goldstandard zur Differenzierung von nichterosiver Refluxkrankheit (NERD) und erosiver Refluxkrankheit (ERD) dar. Sie ermöglicht die makroskopische Schleimhautbeurteilung und somit die oben beschriebene Graduierung der Refluxkrankheit sowie den Nachweis bzw. den Ausschluss einer Barrett-Schleimhaut. Ferner können der Magen sowie Hiatushernien beurteilt und andere Erkrankungen, insbesondere Malignome, ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist eine ÖGD vor jedem operativen Eingriff in diesem Bereich obligat. Eine routinemäßige Biopsieentnahme ist nicht erforderlich, jedoch bei einem makroskopisch nicht sicher einzuordnenden Befund oder dem Verdacht auf eine Schleimhautmetaplasie indiziert. [83]

### **1.7.3 Die 24-Stunden-pH-Metrie von Ösophagus und Magen**

Der primäre Effekt einer Therapie mit Protonenpumpenhemmern ist die Suppression der Magensäuresekretion, welches für die Heilung der GERD und anderer magensäurebedingter Erkrankungen entscheidend ist [89].

Eine sehr hilfreiche Methode, die individuelle Wirksamkeit von Protonenpumpenhemmern zu überprüfen und antisekretorische Therapien zu vergleichen, ist die intragastrale pH-Metrie, welche die direkte Abschätzung der Säuresuppression ermöglicht [90]. Ferner kann die quantitative Bestimmung der ösophagealen Säureexposition standardisiert an einem definierten Punkt unter Berücksichtigung des

zirkadianen Rhythmus, körperlicher Aktivitäten, Lageänderungen und Nahrungsaufnahme erfolgen.

Erstmals berichtete Spencer 1969 darüber, wie mit einer im Ösophaguslumen platzierten Glaselektrode über einen längeren Zeitraum hinweg gastroösophageale Refluxe registriert werden können [91]. Johnson und DeMeester führten dann die 24-Stunden-pH-Metrie in die Klinik ein und quantifizierten den gastroösophagealen Reflux sowohl bei Gesunden („physiologischer Reflux“) als auch bei Patienten mit einer Refluxerkrankung [92-93].

Üblicherweise besteht ein pH-Metrie-Messsystem aus einem pH-Messkatheter mit Glas- oder Antimonelektrode und einem tragbaren Gerät zur Datenspeicherung. Dabei können auf einem Messkatheter mehrere Messpunkte platziert werden. Ferner wird eine Software zur computergestützten Auswertung benötigt. Durch dieses sehr praktikable Messsystem lassen sich Messungen ohne großen Aufwand und unter normalen Lebensbedingungen durchführen. Die 24-Stunden-pH-Metrie ist damit vor allem für den ambulanten Sektor die Methode der Wahl.

Die Messelektrode wird 5 cm oberhalb des unteren Ösophagussphinkters und bei einer 2-Punkt-Messung zusätzlich 5 cm unterhalb des unteren Ösophagussphinkters platziert. Die Positionierung kann entweder manometrisch oder mittels pH-Sprung Methode erfolgen, wobei bei der zweiten Variante die unterschiedlichen pH-Werte des Magens und des Ösophagus ausgenutzt werden. Auch diese Methode ist ausreichend genau [94].

Für die Diagnose und Bewertung der GERD mittels pH-Metrie existieren verschiedene Analysenmöglichkeiten. Das System von Johnson und DeMeester bewertet sechs Variablen aus welchen der DeMeester-Score errechnet wird: die prozentualen Anteile der Zeit mit pH kleiner 4 für die gesamte Messung sowie für die Messung in aufrechter und die Messung in liegender Position, die Anzahl der Refluxepisoden mit einer Dauer von  $\geq 5$  min, die Dauer des längsten Refluxes und die Gesamtzahl der Refluxepisoden [95]. Mit Hilfe einer mathematischen Formel wird jede dieser sechs Variablen verrechnet. Dabei gehen der ermittelte Patientenwert sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der entsprechenden Variablen eines definierten gesunden Probandenkollektives in die Formel ein. Durch Addition der Scorewerte aller sechs Variablen wird der DeMeester-Score gebildet. [96]

Der DeMeester-Score ist folglich ein umfassender Score, welcher in den meisten kommerziellen Auswertungssystemen enthalten ist. Allgemein kann ab einem

DeMeester-Score von größer 14,72 von einer pathologischen Säurebelastung ausgegangen werden [97].

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung der Messgröße des prozentualen Anteils der Zeit im Ösophagus mit einem pH-Wert kleiner als 4, welche die höchste Sensitivität und Spezifität besitzt [98].

### **1.8 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung einer Methode zur enantioselektiven Quantifizierung von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite, Omeprazol-Sulfon und 5-Hydroxyomeprazol, in Humanserum. Mit Hilfe dieser Methode sollte in einer Pilotstudie der Therapieerfolg von Omeprazol bei Patienten mit einer GERD im Hinblick auf deren CYP2C19-Geno- und -Phänotyp bewertet werden. Im Rahmen dieser Studie sollten einerseits enantioselektiv die Abbauraten von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite bestimmt und andererseits der pharmakodynamische Effekt mittels 24-Stunden-pH-Metrie im Magen und Ösophagus beurteilt werden.

Ferner sollte die Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol in vivo überprüft werden.

Mit Hilfe der durchgeführten Studie sollte geklärt werden, ob eine anhand des CYP2C19-Genotyps optimierte individuelle Dosierung des Protonenpumpenhemmers Omeprazol zu einem besseren pharmakodynamischen Effekt (pH-metrische Säuresuppression) führt. Dieser Surrogatparameter hat sich als prädiktiv für den klinischen Erfolg (Heilung der Refluxösophagitis) erwiesen. Durch den Vergleich einer Kontrollgruppe mit Standarddosierung gegen die Interventionsgruppe mit den zwei wesentlichen genotypischen Populationen mit angepasster Arzneimitteldosierung sollten darüber hinaus der CYP2C19-Geno- und -Phänotyp (Pharmakokinetik) auf Kongruenz ihrer Aussagekraft überprüft werden. Dabei erhielten die Patienten mit einem genetisch bedingten schnellen Arzneimittelabbau (EM) eine höhere Dosierung als Patienten mit einem genetisch bedingten verzögerten Abbau (PM, IM). Diese Fragestellungen wurden nach einer 14-tägigen Therapiedauer untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Zubehör

- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System: Agilent Flüssigkeitschromatograph der Serie 1100 (Waldbronn, Deutschland) bestehend aus einem binärem Pumpensystem (2 Doppelkolbenpumpen zur Mischung der Lösungsmittel), einem Autosampler, einem thermostatisierbaren Säulenofen und einem UV/VIS-Detektor mit Diodenarray (DAD)
- HPLC-Säulen:
  - Supelco Chirobiotic R 150 x 2,1 mm; Partikelgröße 5 µm
  - ReproSil Chiral-CA 250 x 2 mm; Partikelgröße 5 µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland)
- Vorsäulenfilter (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) ausgestattet mit einem Silizium-Filter
- Thermo Scientific TSQ Discovery Max Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (San Jose, CA, USA) ausgestattet mit einer APPI-Ionenquelle mit einer Krypton UV-Lampe (PhotoMate<sup>®</sup>, Syagen, Tustin, CA, USA)
- Thermo Scientific Xcalibur Software, Version 1.2
- Waters OASIS<sup>®</sup> HLB 1 ml Extraktionskartuschen mit 30 mg Sorptionsmittel (Waters, Eschborn, Germany)
- Vakuumstation für Kartuschen (Waters, Milford, USA)
- Autosampler-Vials mit Einsatz
- Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Univapo 150 ECH – Vakuumzentrifuge (UNIEQUIP Laborgerätebau)
- Abbott - Tischzentrifuge (Abbott, Leipzig, Deutschland)
- pH 537-pH-Meter (Wtw GmbH, Weilheim, Deutschland)
- Easypure UV D7402 - Reinstwasseranlage (Werner, Frankfurt/Oder, Deutschland)
- Laborwaage R 180D-D1 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Laborwaage BA 310 S/OD2 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Reax 2000 Vortexer (Heidolph, Kelheim, Deutschland)
- verschiedene Pipetten und Spitzen der Marke Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- BD Vacutainer<sup>®</sup> Blutentnahmesysteme, Blutröhrchen mit EDTA (lila) und ohne Zusätze (rot) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Venenverweilkanülen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Spritzen (5 ml, 10 ml); Aufziehkanülen; 3 Wegehähne Discifix (Braun, Melsungen, Deutschland)

## 2.2 Chemikalien

- Omeprazol als racemisches Gemisch (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- Enantiomerenreines S-Omeprazol: Nexium® Pulver zur Herstellung einer Injektions-/Infusionslösung, wobei 45 mg des Pulvers 40 mg S-Omeprazol entsprechen (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland)
- Racemisches D<sub>3</sub>-Omeprazol (CDN-Isotopes, Augsburg, Deutschland)
- Racemisches 5-Hydroxyomeprazol (SynFine Research, Ontario, Canada)
- Racemisches D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol (SynFine Research, Ontario, Canada)
- Omeprazol-Sulfon (SynFine Research, Ontario, Canada)
- n-Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol, Gradient Grade für die Flüssigkeitschromatographie (LiChrosolv)
- Methanol (Riedel-de Haën, CHROMASOLV)
- Acetonitril (Riedel-de Haën, CHROMASOLV)
- Ammoniumacetat (SigmaUltra, SIGMA, Deisenhofen, Deutschland)
- 1-Methylpiperidin
- Essigsäure 100 %, reinst (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ammoniaklösung 25 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Reinstwasser, eigene Herstellung
- Triethylamine (TEA), (Fluka, Duchs, Schweiz)
- Diethylamin  $\geq 99,5$  % (DEA), (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)

## 2.3 Herstellung von Lösungen

### 2.3.1 Omeprazol-Stammlösungen

- Omeprazol-Stammlösung 1: 5,0 mg Omeprazol in 50 ml Isopropanol  
(entspricht einer Konzentration von 100 µg/ml)
- Omeprazol-Stammlösung 2: 1,0 mg Omeprazol-Sulfon in 5 ml Isopropanol  
(entspricht einer Konzentration von 200 µg/ml)
- Omeprazol-Stammlösung 3: 1,0 mg 5-Hydroxyomeprazol in 5 ml Isopropanol  
(entspricht einer Konzentration von 200 µg/ml)

### 2.3.2 Kalibrierlösung 1 und 2

Kalibrierlösung 1: 100 µl Omeprazol-Stammlösung 1 + 25 µl Omeprazol-Stammlösung 2 + 25 µl Omeprazol-Stammlösung 3 werden gemischt und mit 10 µl TEA und 840 µl Reinstwasser verdünnt.

Die Kalibrierlösung 1 besitzt eine Omeprazol-Konzentration von 10 µg/ml und eine Omeprazol-Sulfon- und 5-Hydroxyomeprazol-Konzentration von jeweils 5 µg/ml.



Kalibrierlösung 2: 100 µl Kalibrierlösung 1 werden mit 10 µl TEA und 890 µl Reinstwasser verdünnt.

Die Kalibrierlösung 2 besitzt eine Omeprazol-Konzentration von 1 µg/ml und eine Omeprazol-Sulfon- und 5-Hydroxyomeprazol-Konzentration von jeweils 0,5 µg/ml.

Als Kalibriermatrix wurde Leerserum für Forschungszwecke aus der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Magdeburg verwendet. Dieses wurde bis zu seiner Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die Kalibrierfunktionen wurden mit Kalibrierproben aus humanem Leer-Plasma in den folgenden Konzentrationen erstellt (Tabelle 2-1):

**Tabelle 2-1:** Konzentrationen der Kalibrierproben von R- und S-Omeprazol (OME), R- und S-5-Hydroxyomeprazol (OH-OME) und Omeprazol-Sulfon (OMES)

Probe	Level der Qualitätskontrolle	R-OME [ng/ml]	S-OME [ng/ml]	R-OH-OME [ng/ml]	S-OH-OME [ng/ml]	OMES [ng/ml]
1	niedrig	5	5	2,5	2,5	5
2		10	10	5	5	10
3		25	25	12,5	12,5	25
4	mittel	50	50	25	25	50
5		100	100	50	50	100
6		250	250	125	125	250
7		500	500	250	250	500
8	hoch	750	750	375	375	750

Der Konzentrationsbereich lag für R- und S-Omeprazol sowie für Omeprazol-Sulfon zwischen 5 und 750 ng/ml und für R- und S-5-Hydroxyomeprazol zwischen 2,5 und 375 ng/ml. Die Wahl des Konzentrationsbereiches ergab sich aus den zu erwartenden Konzentrationen in späteren Patientenproben.

### 2.3.3 Interner Standard (IS)-Stammlösung

1 mg D<sub>3</sub>-Omeprazol und 0,5 mg D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol werden in 10 ml 2-Propanol gelöst.

### 2.3.4 IS-Arbeitslösung

50 µl der IS-Stammlösung werden mit 10 µl TEA und 940 µl Reinstwasser verdünnt.

### 2.3.5 Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 8,5)

0,771 g Ammoniumacetat werden in 100 ml Reinstwasser gelöst und mit einer 25 %igen Ammoniak-Lösung auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt.

### 2.3.6 Laufmittel (mobile Phase)

Laufmittel A: 2,5 ml Diethylamin (DEA) + 10 ml Essigsäure + 250 ml 2-Propanol

Laufmittel B: n-Hexan

## 2.4 Methodenentwicklung zur Bestimmung von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite

Die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Omeprazol und seiner Metabolite aus humanem Serum war Teil der vorliegenden Arbeit. Infolgedessen wird in diesem Methodenteil nur auf die Durchführung der endgültigen Methode eingegangen. Alle weiteren Details werden im Ergebnisteil erläutert.

Die Methodenentwicklung erfolgte mittels HPLC-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) an einem HPLC-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland). Dieses bestand aus einem Autosampler mit programmierbarer Injektion, einem thermostatisierbaren Säulenkompartiment, einer binären Pumpe und einem UV/VIS-Detektor mit Diodenarray (DAD). Zur chromatographischen Enantiomerentrennung wurde eine ReproSil Chiral-CA Säule mit Vorsäulenfilter verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem TSQ Discovery Max Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, welches mit einer Atmosphärendruck-Photoionisations-Ionenquelle (APPI-Ionenquelle) ausgestattet war. Die Systemsteuerung, Datenaufnahme und chromatographische Auswertung erfolgte über die Xcalibur-Software (Version 1.2).

Für die Quantifizierung der Wirkstoffpeaks wurden die jeweiligen Peakflächen herangezogen.

### 2.4.1 Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion

Zur Extraktion von Omeprazol und seiner Metabolite aus humanem Serum wurden OASIS HLB 1 ml Extraktionssäulen verwendet. Die Extraktion wurde mit Hilfe einer Vakuumstation für Kartuschen mit einer Durchflussrate von 1 ml/min durchgeführt.

Konditionierung: 1 x 1 ml Methanol  
1 x 1 ml Reinstwasser

Probe auftragen:	als Gemisch aus: 250 µl Patientenprobe bzw. Kalibrierprobe + 20 µl IS-Arbeitslösung + 500 µl Ammoniumacetatpuffer
Waschen:	1 x 1 ml Ammoniumacetatpuffer 1 x 1 ml Ammoniumacetatpuffer/Methanol-Gemisch (70 %/30 %)
Eluieren:	1 x 1 ml Methanol

Das Eluat wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingedampft und danach mit 10 µl 2-Propanol mit 1 % TEA und 90 µl n-Hexan aufgenommen und in braune Autosamplergläschen überführt.

### 2.4.2 Chromatographische Bedingungen

Mit Hilfe des Autosamplers wurden 10 µl der aufbereiteten Probe in das chromatographische System des Agilent 1100 Flüssigkeitschromatographen injiziert. Die enantioselektive chromatographische Trennung erfolgte sodann mittels Gradientenelution im Normalphasen-Modus. Die mobile Phase A setzte sich aus Isopropanol, Essigsäure und Diethylamin (DEA) im Verhältnis 100:4:1 (v/v/v) zusammen, wobei die mobile Phase B rein aus Hexan bestand. Mit einer konstanten Flussrate von 0,35 ml/min startete der Gradient mit einer Zusammensetzung aus 10 % mobiler Phase A und 90 % mobiler Phase B. Innerhalb von zehn Minuten wurde der Anteil an mobiler Phase A auf 15 % angehoben und eine Minute konstant gehalten. Anschließend erfolgte ein einminütiger Waschschrift mit einem Anteil von 25 % mobiler Phase A. Nach diesem Waschschrift wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase zurück auf die Anfangsbedingungen eingestellt.

Ein Schaltventil leitete alle HPLC-Eluate innerhalb einer Laufzeit von 5 - 15,9 Minuten zum Massenspektrometer weiter, wobei alles außerhalb dieser Zeitspanne zum Abfallbehälter gelangte. Ein kompletter chromatographischer Zyklus dauerte inklusive Reäquilibration der Säule 19 Minuten.

Die Säulentemperatur wurde die gesamte Zeit konstant bei 20 °C gehalten.

### 2.4.3 Einstellungen des Massenspektrometers

Als Detektor diente ein TSQ Discovery Max Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit APPI-Ionenquelle. Die Ionisierung der Analytmoleküle wird bei diesem System durch Photonen induziert, die von einer Krypton UV-Lampe erzeugt werden, welche zwei Emissionslinien mit einer Energie von 10,0 eV und 10,6 eV ausstrahlt. Die

Zerstäubungs- und Kapillartemperatur wurde auf 300 °C bzw. 220 °C eingestellt. Als Mantel- und Hilfsgas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 41 bzw. 8 Geräteeinheiten verwendet. Unter diesen Bedingungen wurden die Analyten ausschließlich zum einfach-protonierten Molekülion  $[M + H]^+$  ionisiert. Um die Fragmentierung der protonierten Molekülionen zu erreichen, wurde Argon als Kollisionsgas mit einem Druck von 1,0 mTorr eingesetzt. Folgende Übergänge vom einfach-protonierten Molekülion zum Fragmention wurden zur Detektion der Analyten und des internen Standards verwendet (Tabelle 2-2):

**Tabelle 2-2** Massen der einfach-protonierten Molekülionen und Fragmentionen sowie Kollisionsenergien zur MS/MS-Detektion der Analyten und des internen Standards

Substanz	Masse des einfach-protonierten Ions [m/z]	Kollisionsenergie [eV]	Masse des Produktes [m/z]	Chromatographisches Zeitfenster [min]
OME	346	14	198	5 - 16
D3-OME	349	14	198	5 - 16
OH-OME	362	14	214	8,75 - 16
D3-OH-OME	365	14	217	8,75 - 16
OMES	362	18	298	5 - 8,75

#### 2.4.4 Peakintegration

Alle LC-MS/MS-Peaks wurden automatisch durch die Quantifizierungssoftware Xcalibur (Version 1.2) integriert. Alle Chromatogramme wurden visuell überprüft und falls notwendig manuell nachintegriert. Zur Quantifizierung wurde der Peakflächen-Quotient von Analyt und internem Standard verwendet.

#### 2.4.5 Methodvalidierung

##### 2.4.5.1 Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metabolite, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [99].

Zur Überprüfung der Selektivität wurden drei extrahierte Leerplasma-Proben analysiert. Ferner wurden Leerproben jeweils einzeln mit Omeprazol, 5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon sowie mit D<sub>3</sub>-Omeprazol zusammen mit

D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol aufgestockt und hinsichtlich eines Übersprechens in andere Massenspuren analysiert.

#### **2.4.5.2 Matrixeffekte**

Unter Matrixeffekten versteht man die direkte oder indirekte Änderung des Messsignals durch die Anwesenheit unbeabsichtigter Analyten oder anderer interferierender Substanzen in der Probe. Dabei sind sowohl Unterdrückungen als auch Verstärkungen des Messsignals möglich. [99]

Trotz Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion können störende Matrixsubstanzen nicht vollständig ausgeschlossen werden, so dass eine Untersuchung des Matrixeffektes erfolgen muss.

Hierfür wurden drei, ohne internen Standard extrahierte Leerplasma-Proben untersucht, indem die IS-Stammlösung (1:10 verdünnt) mit einer Flussrate von 5 µl/min über ein T-Stück nach der HPLC-Säule in den Eluatstrom zudosiert wurde.

#### **2.4.5.3 Linearität und Nachweisgrenze**

Die Linearität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Messergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind [100]. Zur Überprüfung der Linearität wurden Kalibriergeraden aus den entsprechenden Kalibrierproben erstellt. Dabei basiert die Berechnung der 1/x gewichteten Kalibriergeraden auf den Quotienten der Peakflächen von Analyt und internem Standard.

Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probe, bei der die Identifizierungskriterien erfüllt sind [99]. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden Kalibrierstandards aus humanem Leer-Plasma hergestellt und das Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt. Die Nachweisgrenze ist hierbei die niedrigste Konzentration des Analyten in der Probenmatrix, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 3:1 beträgt [99].

#### **2.4.5.4 Präzision und Richtigkeit**

Als Präzision oder Genauigkeit bezeichnet man die Übereinstimmung zwischen zwei oder mehreren unabhängigen Tests bzw. Messungen unter gleichen Bedingungen. Die Präzision einer Messreihe gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Probenaufbereitung und der Probenmessung. Die Präzision wurde mit Hilfe der Gleichung 2-1 berechnet.

$$\text{Präzision einer Messreihe} = \frac{\text{Standardabweichung der Ist-Konzentration}}{\text{mittlere Ist-Konzentration}} \times 100 \% ; \text{ in } [\%]$$

**Gleichung 2-1**

Die Übereinstimmung zwischen dem Messergebnis und dem tatsächlichen Gehalt bezeichnet man als Richtigkeit. Sie wird als mittlere Abweichung in Prozent angegeben und nach der Gleichung 2-2 berechnet. Die Richtigkeit einer Messreihe gibt Aufschluss über mögliche systemische Fehler in der Probenaufbereitung und Probenmessung.

$$\text{Richtigkeit einer Messreihe} = \frac{(\text{mittlere Ist-Konz.}) - (\text{Soll-Konz.})}{\text{Soll-Konzentration}} \times 100 \% ; \text{ in } [\%]$$

**Gleichung 2-2**

Für die Bewertung der Präzision und der Richtigkeit wurden zehn Proben in drei unterschiedlichen Konzentrationen gemeinsam an einem Tag aufbereitet und in einer Messequenz bestimmt und ausgewertet (Präzision in Serie). Des Weiteren fanden Bestimmungen in drei unterschiedlichen Konzentrationen an fünf verschiedenen Tagen statt (Wiederholpräzision).

**2.4.5.5 Wiederfindung der Analyten**

Als Wiederfindung bezeichnet man das Detektorsignal einer der Matrix zugesetzten Substanzmenge nach Aufbereitung der Probe im Vergleich zum Detektorsignal einer direkt aus einer wässrigen Standardlösung gemessenen Substanzmenge.

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden je vier Messungen der wässrigen Standardlösung bei niedriger und hoher Konzentration durchgeführt. Ferner wurden je fünf Matrixproben der gleichen Substanzmenge extrahiert, vermessen und mit den mittleren Ist-Konzentration der wässrigen Standardlösung nach der Gleichung 2-3 in Relation gesetzt.

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\text{mittlere Ist-Konzentration (Matrix)}}{\text{mittlere Ist-Konzentration (wässrig)}} \times 100 \% ; \text{ in } [\%]$$

**Gleichung 2-3**

Da die Probenaufbereitung achiral erfolgt und um Matrixeffekte im Massenspektrometer auszuschließen, wurde zur Untersuchung der Wiederfindung die achirale Bestimmungsmethode von Shimizu et al. [40] mittels UV-Detektion bei 302 nm verwendet.

### 2.4.5.6 Stabilität

Die Stabilität bezeichnet die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter bestimmten Bedingungen für gegebene Zeitintervalle, wobei die Stabilität eines Analyten vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abschluss der Analyse gewährleistet sein sollte. Hingegen ist die Stabilität während der Lagerung und während eventuell wiederholtem Einfrieren und Auftauen methodenunabhängig, so dass entsprechende Stabilitätsdaten aus der Literatur übernommen werden können. [101]

Die Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol wurde überprüft, indem drei Leerserumproben mit 200 µg/ml S-Omeprazol angereichert, extrahiert und analysiert wurden.

## 2.5 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen

### 2.5.1 Allgemeines Studiendesign

Den Untersuchungen liegt eine prospektive, randomisierte, offen kontrollierte klinische Studie mit Parallelgruppendesign zugrunde. Die Studie war als Pilotstudie für 32 Patienten mit endoskopisch diagnostizierter gastroösophagealer Refluxkrankheit (GERD) (Kapitel 2.5.8) der Stadien A und B laut Los-Angeles-Klassifikation konzipiert. Die Zahl der einzuschließenden Patienten orientierte sich demnach an der für klinische Pilotstudien üblichen Zahl von 15 bis 20 einzuschließenden Probanden.

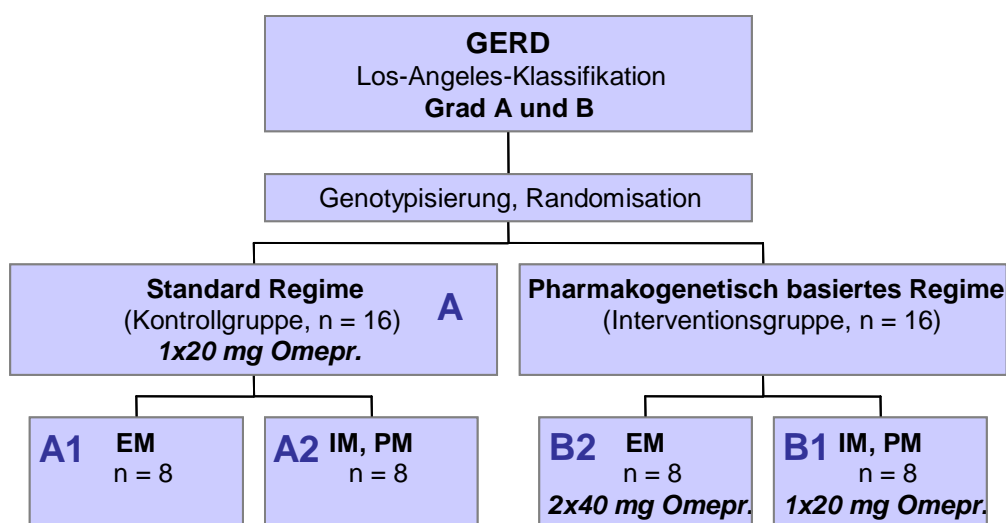


Abbildung 2-1: Studiendesign

Entsprechend der Genotypisierung (Kapitel 2.5.6) für CYP2C19 wurden die Patienten randomisiert der Kontrollgruppe A [n = 8 wt/wt (EM); n = 8 wt/mt (IM) bzw. mt/mt (PM)] oder einer der beiden Interventionsgruppen B1 (n = 8 wt/mt bzw. mt/mt) und B2 (n = 8 wt/wt) zugeordnet (Abbildung 2-1).

Die Stratifizierung der Patienten erfolgte auf der Grundlage, dass bei einem statistisch zu erwartenden Anteil von ca. 33 % IM und PM in der kaukasischen Bevölkerungspopulation für das gewählte Studiendesign, im Umfang von 32 Patienten, für die Pilotstudie eine Fallzahl von bis zu 48 Patienten zu randomisieren war. Die Randomisierung erfolgte mit der Software Rancode Version 3.6. als Blockrandomisierung mit n = 4. Drop-outs wurden entsprechend ersetzt.

Die Dosierungen für die einzelnen Studiengruppen von 1 x 20 mg bis 2 x 40mg Omeprazol pro Tag wurden in Anlehnung an das empfohlene Dosierung-Eskalationsschema für Protonenpumpenhemmer festgelegt. Dieses Schema findet sich in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten [102].

### **2.5.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg. Einschlusskriterien waren: eine kaukasische Herkunft, ein Alter zwischen 20 und 70 Jahren, ein Gewicht zwischen 50 und 85 kg sowie eine nachgewiesene gastroösophageale Refluxkrankheit der Stadien A oder B nach Los-Angeles-Klassifikation. Die Diagnosesicherung erfolgte durch eine Gastroskopie. Die Patienten sollten ferner unauffällige Befunde in der Einschlussuntersuchung sowie dem Routine-Laborscreening aufweisen.

Als Ausschlusskriterien galten schwere Erkrankungen des Patienten (z. B. des Zentralnervensystems, psychische Erkrankungen, chronische oder akute Infektionen), insoweit diese im Widerspruch zu den Einschlusskriterien standen sowie eine unbehandelte oder innerhalb der letzten drei Monate behandelte *Helicobacter pylori* Infektion. Da die Einnahme bestimmter Medikamente die Aktivität der Cytochrom-Enzyme CYP2C19 und CYP3A4 beeinflussen, mussten diese mindestens zwei Wochen vor Studienbeginn abgesetzt werden, wobei eine einmalige Applikation 48 Stunden vor Studienbeginn möglich war. Einen Überblick über die Arzneistoffe mit einem klinisch relevanten Interaktionspotential für CYP2C19 und CYP3A4 gewährt Tabelle 2-3. Ebenso kann ein übermäßiger Alkohol- oder Nikotinkonsum Einfluss auf



die hepatische und renale Elimination haben, so dass Patienten mit einem Alkoholkonsum von mehr als 40 g/d ( $\approx$  2 Flaschen Bier) und einem Nikotinkonsum von mehr als drei Zigaretten pro Tag ausgeschlossen wurden. Darüber hinaus konnten keine Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die innerhalb der zurückliegenden drei Monate vor Studienantritt an einer anderen Arzneimittelstudie teilgenommen oder aber acht Wochen vor Studienbeginn Blut gespendet hatten. Eine anamnestisch festgestellte bekannte Arzneimittelallergie gegen Protonenpumpenhemmer oder H<sub>2</sub>-Blocker sowie allgemeine klinische Befunde, die eine Teilnahme an der Studie hätten beeinträchtigen können, führten ebenso wie eine vorliegende Schwangerschaft zum Ausschluss.

**Tabelle 2-3:** Arzneistoffe mit einem klinisch relevanten Interaktionspotential für CYP2C19/CYP3A4

<b>Arzneistoffe mit einem klinisch relevanten Interaktionspotential für CYP2C19 und CYP3A4</b>					
Alprazolam	Clarithromycin	Fluconazol	Lidocain	Paroxetin	Sertralin
Amiodaron	Clomipramin	Fluoxetin	Loratadin	Phenytoin	Simvastatin
Amitriptylin	Cyclophosphamid	Fluvastatin	Lovastatin	Pravastatin	Tacrolimus
Amlodipin	Cyclosporin	Fluvoxamin	Miconazol	Prednison	Tamoxifen
Atorvastatin	Dexamethason	Hexobarbital	Midazolam	Primidon	Teniposid
Azitromycin	Diazepam	Imipramin	Moclobemid	Progesteron	Terfenadin
Buspiron	Diltiazem	Indinavir	Nelfinavir	Proguanil	Testosteron
Carbamazepin	Erythromycin	Indomethacin	Nifedipin	Propranolol	Ticlopidin
Chinidin	Esomeprazol	Itraconazol	Nimodipin	Rifampicin	Triazolam
Cimetidin	Felodipin	Ketoconazol	Nitrendipin	Ritonavir	Verapamil
Citalopram	Fentanyl	Lansoprazol	Norethindron	Saquinavir	Zolpidem

### 2.5.3 Ethische und gesetzliche Grundlagen

Die Untersuchungen waren Bestandteil der Studie IKP 102/2006: „Stereoselektive Pharmakokinetik und CYP2C19-Genotypisierung als Prädiktoren des Therapieerfolges einer Omeprazol-Therapie bei Patienten mit GERD – eine Pilotstudie“ (EUDRA-CT Nummer: 2006-002346-11). Diese wurde am Institut für Klinische Pharmakologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik und der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt. Die Ethik-Kommission der

Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität gab ein positives Votum zur Durchführung der Studie.

Alle Patienten wurden vor Beginn der Untersuchung über den Inhalt und über mögliche Gefahren der Studie vollständig aufgeklärt. Dies geschah entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen des AMG §§ 40 und 41 sowie der Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen (GCP-Verordnung) vom 09. August 2004. Die Empfehlungen der Deklaration von Helsinki, in der Fassung von Tokio 2004, wurden beachtet.

Jeder Patient erhielt hierzu eine Patienteninformation und hatte sein Einverständnis zur Teilnahme an der Studie sowie die erfolgte verständliche Aufklärung schriftlich zu bestätigen. Ein Ausscheiden aus der Studie war den Patienten ohne Angabe von Gründen jederzeit möglich.

Zur Bestimmung der Enantiomerenstabilität wurden drei Patienten aus der Studie IKP 103/2008 „Stereoselektive Pharmakokinetik und CYP2C19-Genotypisierung als Prädiktoren des Therapieerfolges einer Esomeprazol-Therapie bei Patienten mit GERD – eine Pilotstudie“ (EUDRA-CT Nummer: 2008-001302-16) untersucht. Alle methodischen Voraussetzungen und Vorgehensweisen waren in beiden Studien absolut identisch.

#### **2.5.4 Studienmedikation**

Die Protonenpumpenhemmer Omeprazol von STADApHarm und Esomeprazol (Nexium<sup>®</sup> mups) von AstraZeneca wurden in den Dosierungen 20 und 40 mg über die Zentralapotheke des Universitätsklinikums Magdeburg bezogen. Es handelt sich hierbei um magensaftresistente Kapseln (Omeprazol) bzw. magensaftresistente Tabletten (Esomeprazol), die in Abhängigkeit der Randomisierung entweder einmal täglich 20 mg (Gruppe A, B1) oder zweimal täglich 40 mg (Gruppe B2) appliziert wurden. Jeder Patient erhielt einen für ihn individuell abgeteilten und beschrifteten Dosierspender.

Chargen-Bezeichnung: Omeprazol STADA<sup>®</sup> 20mg - 9561 (01/2008), 3073 (07/2009)

Omeprazol STADA<sup>®</sup> 40mg - 1562 (03/2008), 6674 (10/2009)

Nexium<sup>®</sup> mups 20mg – IM 17271 B1 (11/2010)

Nexium<sup>®</sup> mups 40mg – IM 11521 A1 (11/2010)

### 2.5.5 Versuchsdurchführung und Studienablauf

Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten, wurden nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung einer ambulanten Einschlussuntersuchung unterzogen. Diese Untersuchung bestand aus einem Arztgespräch, der Vervollständigung des Anamnesebogens, einer eingehenden körperlichen Untersuchung sowie der Messung von Körpergröße, Gewicht, diastolischem und systolischem Blutdruck im Liegen, einer Besprechung der Begleitmedikation sowie einer klinisch-chemischen Laboruntersuchung. Im Rahmen dieser Laboruntersuchung wurde ein kleines Blutbild mit Bestimmung von Hämoglobin, MCV, Thrombozyten- und Leukozytenzahl durchgeführt sowie die Elektrolyte, TSH, ALAT, ASAT,  $\gamma$ -GT, AP, Quick-Wert, PTT, Albumin, gesamtes Bilirubin, Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin und Glucose ermittelt. Ferner erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung des individuellen genetischen Status für die Ausbildung des Enzyms CYP2C19. Anhand dieser Genotypisierung wurden die Patienten randomisiert einer Kontrollgruppe A oder einer der beiden Interventionsgruppen B1 und B2 zugeordnet. Bis zum Vorliegen des Genstatus konnte eine Initialbehandlung mit maximal zweimal täglich 40 mg Famotidin erfolgen. Am 1. Tag der Omeprazol-Behandlung gelangten die Patienten ca. 7.30 Uhr nüchtern in die Ambulanz der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Hier wurde der transnasale Zwei-Punkt-Messkatheter (Ösophagus, Magen) der 24-Stunden-pH-Metrie gelegt und die erste Blutprobe der Single Dose-Pharmakokinetik entnommen. Die Applikation von Omeprazol und weitere zehn Blutabnahmen erfolgten über 24 Stunden auf der Probandenstation des Instituts für Klinische Pharmakologie. Nach 24 Stunden wurde der Messkatheter der 24-Stunden-pH-Metrie entfernt, die letzte Blutprobe entnommen und Omeprazol für den 2. Tag appliziert. Die weitere insgesamt 14-tägige Omeprazol-Einnahme fand durch den Patienten selbständig zu Hause statt. Die Einnahme der Kapseln erfolgte jeweils morgens nüchtern, d.h. etwa 20 min vor dem Frühstück. In der Behandlungsgruppe B2 musste zusätzlich eine Kapsel abends ca. 20 min vor dem Abendessen eingenommen werden

Die Untersuchungsabfolge des 15. Tages war analog der des 1. Tages. Es wurde eine Multiple Dose-Pharmakokinetik und eine 24-Stunden-pH-Metrie des Magens und des Ösophagus durchgeführt.

Zur Compliance-Kontrolle der häuslichen Einnahme der Studienmedikation hatten die Patienten den Zeitpunkt der täglichen Einnahme in ein Patiententagebuch zu

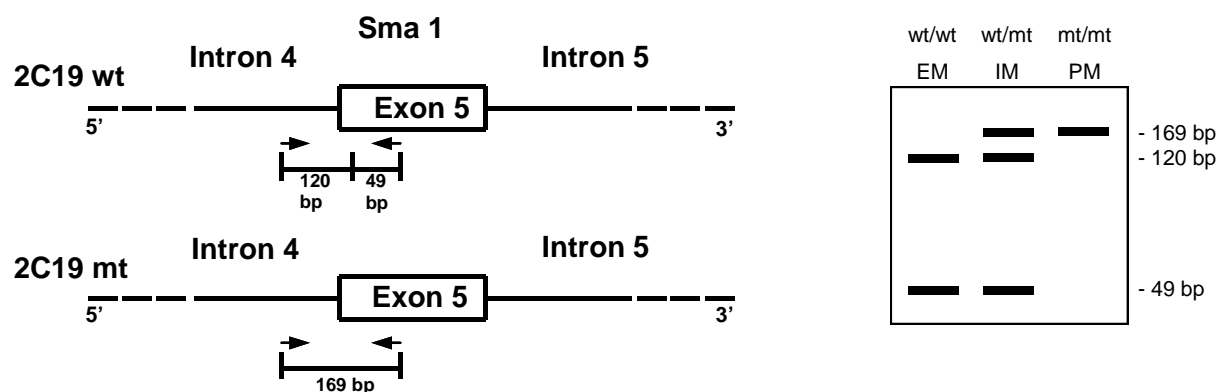
protokollieren. Ferner erfolgte eine Sichtkontrolle der Dosierspender am 15. Tag der Behandlung.

## 2.5.6 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte durch das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Magdeburg. Dabei wurden die Allele CYP2C19\*2 und CYP2C19\*3 nach der Methode von DeMoraes et al. [58] untersucht.

Die Mutation des CYP2C19\*2-Allels besteht in einem einfachen Basenaustausch in der codierenden Sequenz im Exon 5 des CYP2C19-Gens, der zu einem vorzeitigen Stop-Codon und folglich zu einem Verlust der Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sma 1 führt. Die PCR-Strategie ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

Zur Genotypisierung des CYP2C19\*2-Allels wurde DNA aus einer EDTA-Blutprobe des Patienten extrahiert und mit spezifischen Primern für Teile von Intron 4 und Exon 5 amplifiziert. Nachfolgend wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym Sma 1 gespalten und auf einem Agarose-Gel analysiert.



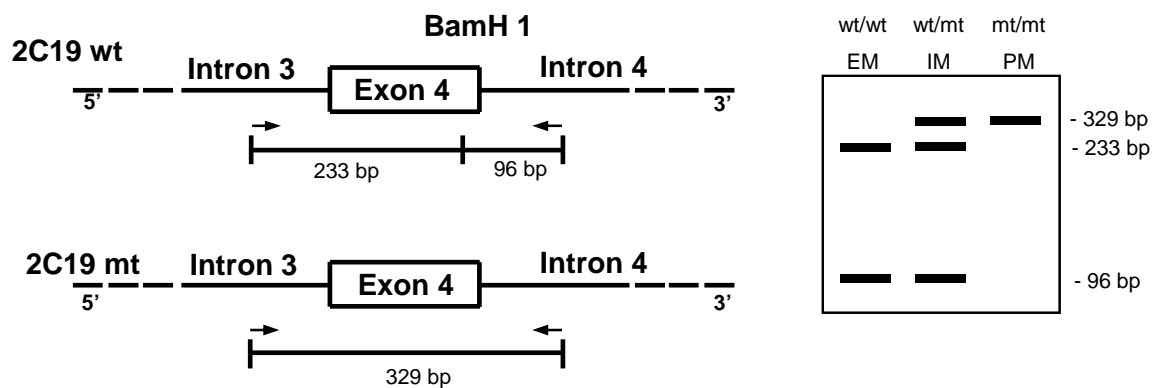
**Abbildung 2-2:** PCR-Strategie zum Nachweis des CYP2C19\*2-Allels und die zu erwartenden DNA-Fragmente der verschiedenen Genotypen

Beim CYP2C19\*2 Wildtyp-Gen (wt/wt) wird das 169 bp PCR-Produkt in die beiden Fragmente 120 und 49 bp gespalten. Ist das Individuum hingegen homozygot für CYP2C19\*2 (mt/mt) steht für das Restriktionsenzym Sma 1 keine Schnittstelle zur Verfügung, so dass das Fragment 169 bp nicht gespalten werden kann und als alleinige Bande erscheint. Bei heterozygoten Personen (wt/mt) werden alle drei Banden (49 bp, 120 bp und 169 bp) sichtbar.

Die Mutation des CYP2C19\*3-Allels besteht ebenfalls in einem Basenaustausch jedoch in der codierenden Sequenz im Exon 4 des CYP2C19-Gens, der durch ein

frühzeitiges Stop-Codon zum Verlust der Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamH 1 führt. In Abbildung 2-3 ist die dazugehörige PCR-Strategie dargestellt.

Zur Genotypisierung des CYP2C19\*3-Allels wurde DNA extrahiert und mit spezifischen Primern für Exon 4 amplifiziert. Nachfolgend wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym BamH 1 gespalten und auf einem Agarose-Gel analysiert. Beim CYP2C19\*3 Wildtyp-Gen (wt/wt) spaltet das Restriktionsenzym BamH 1 das 329 bp PCR-Produkt in die beiden Fragmente 233 und 96 bp. Ist das Individuum indes homozygot für CYP2C19\*3 (mt/mt) steht für das Restriktionsenzym keine Schnittstelle zu Verfügung, so dass das Fragment 329 bp als alleinige Bande erscheint. Bei heterozygoten Personen (wt/mt) werden alle drei Banden (96 bp, 233 bp und 329 bp) sichtbar.



**Abbildung 2-3:** PCR-Strategie zum Nachweis des CYP2C19\*3-Allels und die zu erwartenden DNA-Fragmente der verschiedenen Genotypen

### 2.5.7 Pharmakokinetische Untersuchungen

Für die Single und Multiple dose-Pharmakokinetik wurden an den Untersuchungstagen Blutproben jeweils 10 min vor sowie 20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 5 h, 8 h, 12 h und 24 h nach der Applikation von Omeprazol entnommen. Die einzelnen Messwerte der Blutkonzentrationen von R- und S-Omeprazol und seiner Metabolite wurden in pharmakokinetischen Parametern zusammengefasst. Einer dieser Parameter, der besonders zur Charakterisierung der Pharmakokinetik nach oraler Dosierung dient, ist die AUC (area under the curve = Fläche unter der Kurve). Sie ist das Integral der Konzentration über die Zeit und dient als Messgröße für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit.

Weitere verwendete Parameter sind der maximale Plasmaspiegel ( $C_{\max}$ ) und die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ). Dabei ist die Halbwertszeit diejenige Zeitspanne, in der die Konzentration eines Pharmakons um die Hälfte gesunken ist.

Die AUC,  $C_{\max}$  und  $t_{1/2}$  wurden aus den Ergebnissen der Serumkonzentrationsbestimmungen mit Hilfe einer Kompartiment-freien-Analyse mit dem Programm Kinetica<sup>®</sup> (Version 4.4, Thermo Electron Corporation) bestimmt. Die AUCs wurden dabei nach der Trapezregel mit Extrapolierung gegen unendlich bestimmt.

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden mit Excel 2000 (Microsoft Corporation) errechnet.

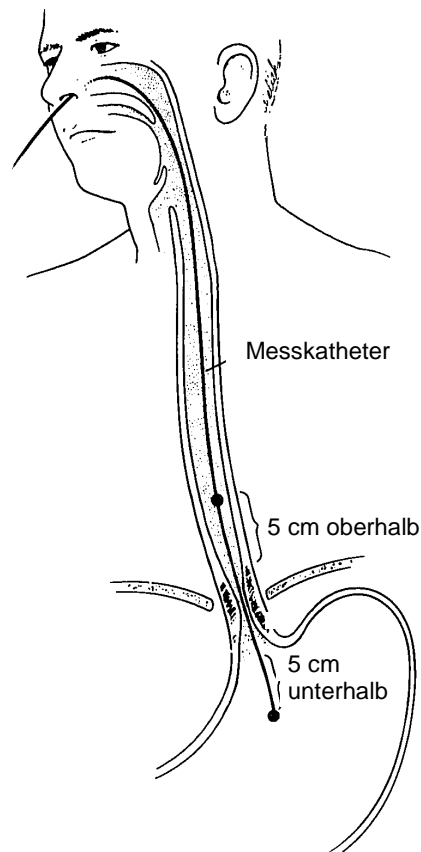
### **2.5.8 Klinische Untersuchungen**

Die **Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD)** erfolgte ambulant in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Untersuchung des Schweregrades der GERD. Die Patienten wurden vor der Untersuchung über den Ablauf und die Untersuchungstechnik mündlich und mit Hilfe einer Patienteninformation ebenfalls schriftlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die ÖGD ist eine minimalinvasive Untersuchungsmethode, bei welcher ein etwa 110 cm langer und 0,9 cm dünner elastischer Schlauch durch die Mundhöhle, in den Ösophagus, den Gaster bis zum Duodenum vorgeschoben wird.

Die **24-Stunden-pH-Metrie** erfolgte ebenfalls in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, wobei die Patienten vor der Untersuchung mündlich und schriftlich über den Ablauf der Untersuchung aufgeklärt wurden und schriftlich ihr Einverständnis erklärten.

Bei der kombinierten Langzeit-pH-Metrie von Ösophagus und Magen wurde, wie in Abbildung 2-4 dargestellt, ein sehr dünner Plastikkatheter mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm durch ein Nasenloch in den Magen gelegt. Für die Messung wurde der Messkatheter so platziert, dass die zwei Antimonelektroden des Katheters sich jeweils 5 cm oberhalb und 5 cm unterhalb des unteren Ösophagussphinkters befanden.



**Abbildung 2-4:** Platzierung des Messkatheters oberhalb und unterhalb des unteren Ösophagus sphinkters bei der kombinierten pH-Metrie von Ösophagus und Magen (aus [103])

Nach seiner Positionierung wurde der Messkatheter mit einem Pflaster an der Nase befestigt und verblieb für 24 Stunden im Magen und Ösophagus. Er war mit einem tragbaren Aufzeichnungsgerät verbunden, welches die Daten über den gesamten Zeitraum speicherte. Nach erfolgter 24-stündiger Messung wurden die Daten auf einen Computer übertragen und mittels Polygram Net<sup>®</sup> Software (Medronic, Dänemark) ausgewertet. Im Rahmen dieser Auswertung wurde auch der DeMeester-Score berechnet, wobei ein Wert größer 14,72 als pathologisch angesehen wird [97]. Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden mit Hilfe der Software Excel 2000 (Microsoft Corporation) errechnet.

### 2.5.9 Entnahme, Behandlung und Aufbewahrung der Blutproben

Die Blutproben wurden mit einer kleinlumigen Flügelkanüle mit Schlauchverbindungsstück des Vacutainersystems (Becton Dickinson, Heidelberg), Kaliber 21 Gauge (grün, 0,8 mm) bzw. mit einer Venenverweilkanüle, Kaliber 21 Gauge, entnommen und in Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgenommen.

Die Aufnahme der Blutproben für die pharmakokinetische Untersuchung erfolgte in Vacutainer-Serumröhrchen. Nach der Koagulation wurden die Serumröhrchen bei mindestens 2100 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde gewonnen, in Kryoröhrchen überführt und bei - 20 ° C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die Aufnahme der Blutprobe für die CYP2C19-Genotypisierung erfolgte in EDTA-Blutröhrchen, welche unmittelbar nativ zur DNA-Isolierung in das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Magdeburg befördert wurden.

### **2.5.10 Bestimmung des CYP2C19- und CYP3A4-Phänotyps**

Der CYP2C19-Phänotyp und damit die CYP2C19-Aktivität (Hydroxylations-Index) kann mit Hilfe der Hydroxylierung von Omeprazol bestimmt werden. Dazu wird der Quotient aus der Serumkonzentration von Omeprazol und 5-Hydroxyomeprazol drei Stunden nach der Einnahme von Omeprazol mit Hilfe der Gleichung 2-4 gebildet.

$$\text{CYP2C19-Aktivität} = \frac{\text{Konzentration von Omeprazol nach 3h}}{\text{Konzentration von 5-Hydroxyomeprazol nach 3h}}$$

#### **Gleichung 2-4**

Die Aktivität von dem Enzym CYP3A4 wird mit Hilfe des Quotienten aus der AUC von Omeprazol und der AUC von Omeprazol-Sulfon nach Gleichung 2-5 bestimmt.

$$\text{CYP3A4-Aktivität} = \frac{\text{AUC von Omeprazol}}{\text{AUC von Omeprazol-Sulfon}}$$

#### **Gleichung 2-5**

Für beide Enzyme gilt: je kleiner der Wert, desto größer die Aktivität.

Die CYP2C19- und CYP3A4- Aktivität wurde in dieser Arbeit nach Gleichung 2-4 und 2-5 berechnet. Aus den ermittelten Ergebnissen wurden dann, durch einen Vergleich des gesamten Patientenkollektivs, der CYP2C19- und der CYP3A4-Phänotyp abgeschätzt. Dabei wurden Patienten mit CYP2C19-Aktivitätswerten größer als 1,2 am 1. Tag der Omeprazol-Behandlung als intermediäre Metabolisierer bezüglich CYP2C19 betrachtet.



### **2.5.11 Statistik und grafische Darstellung**

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software SPSS Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt, wobei nach eingehender statistischer Beratung nachfolgende statistische Tests erfolgten.

Zur Feststellung, ob die verschiedenen Parameter signifikant von der Normalverteilung abweichen, wurde für alle Gruppen der auch für kleine Stichproben geeignete Kolmogorow-Smirnow-Test (KS-Test) durchgeführt.

Der Vergleich der verschiedenen Parameter zwischen den Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) und einem Test auf Homogenität der Varianzen.

Die mittleren pH-Werte des Magens wurden mittels t-Test verglichen.

Der Vergleich der mittleren AUCs zwischen den Gruppen wurde hingegen, wegen fehlender Homogenität der Varianzen, mittels Kruskal-Wallis-Test und Mediantest durchgeführt. Bei einem vorhandenen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen erfolgte der Mann-Whitney-U-Test zwischen jeweils zwei Stichproben.

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen Alter und BMI der Gruppen wurde ebenso der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert  $< 0,05$  angesehen.

Die Analysen erfolgten ausnahmslos nach dem intention-to-treat Prinzip.

Alle in dieser Arbeit enthaltenen Grafen wurden mit SigmaPlot Version 8.02 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Entwicklung einer enantioselektiven Methode für die simultane Bestimmung von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite

##### 3.1.1 Einstellungen des Massenspektrometers

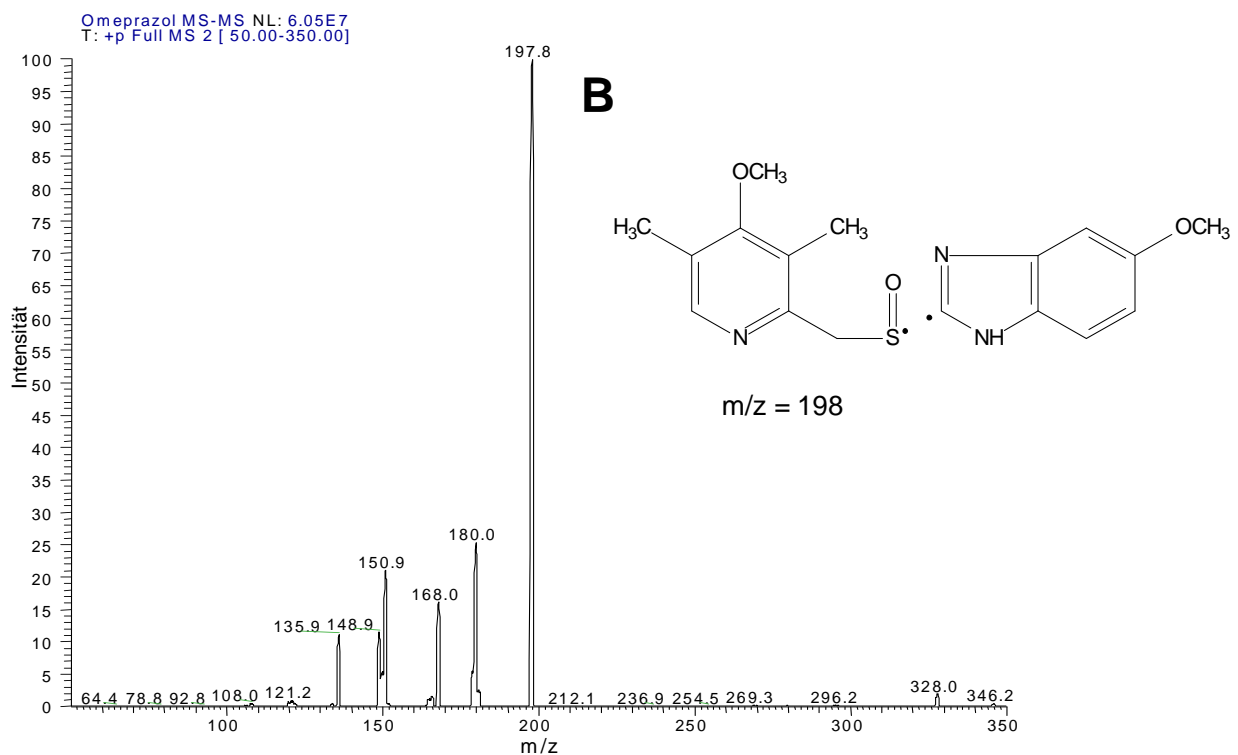
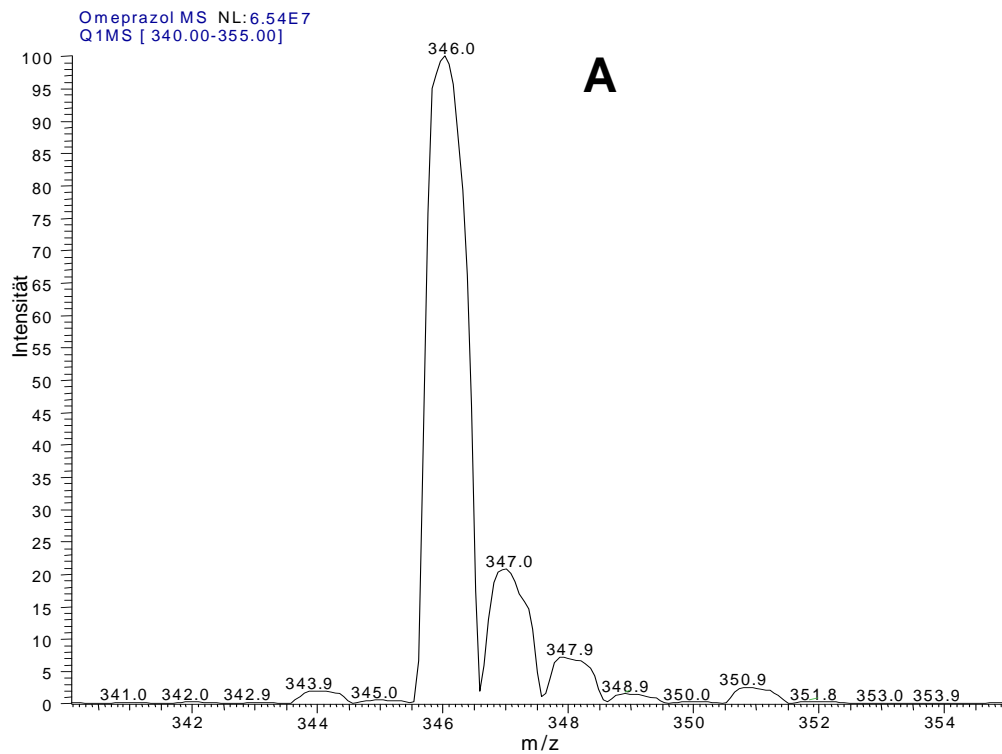
Am Anfang der Entwicklung einer HPLC-Tandem-Massenspektrometrie-Methode (LC-MS/MS) steht die Einstellung des Massenspektrometers. Zu Beginn musste getestet werden, ob sich die Analyten ionisieren lassen und analytisch verwertbare Fragmente produzieren. Um die Molekülonen zu detektieren, wurden die jeweiligen Stamm-lösungen mit Hilfe einer Spritzenpumpe und einer Flussrate von 5 µl/min zwischen HPLC-Gerät und Massenspektrometer injiziert. Für Moleküle mit basischen Zentren eignet sich die hier gewählte Ionisation im positiven Ionenmodus. Dabei werden Protonen auf die Analytmoleküle übertragen und ergeben protonierte Molekülonen.

##### 3.1.1.1 Omeprazol, D<sub>3</sub>-Omeprazol

Im MS-Spektrum von Omeprazol konnte das einfach-protonierte Molekülon  $[M+H]^+$  einwandfrei bei einem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von 346 detektiert werden.

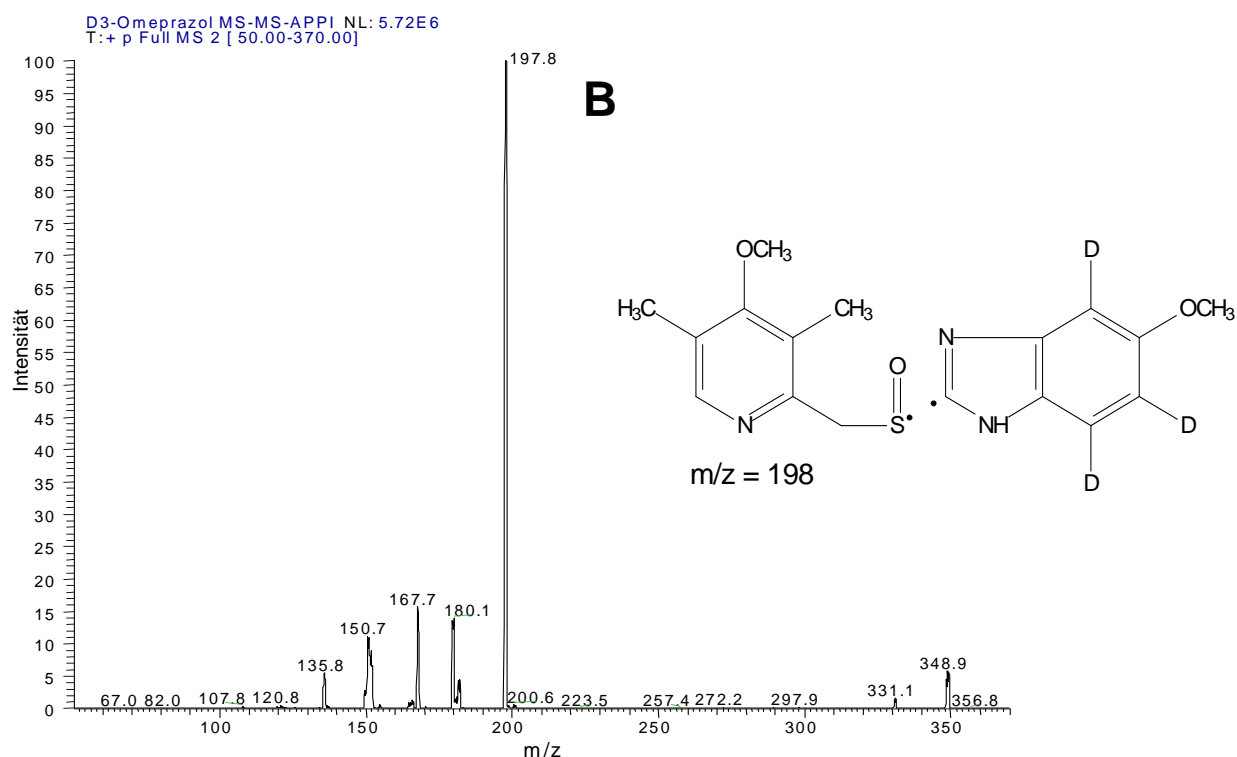
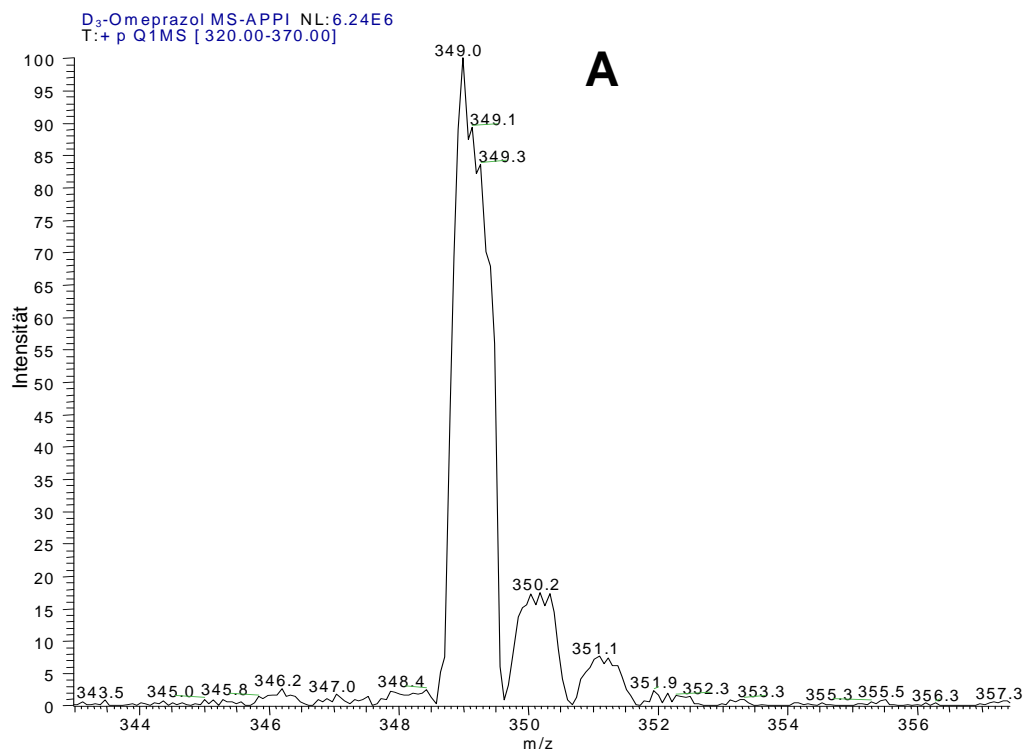
Bei Betrachtung des Massenspektrums von Omeprazol (Abbildung 3-1, A) fallen kleine Peaks bei den nächsthöheren Massenzahlen  $m/z$  347 und 348 auf. Diese Signale spiegeln das Isotopenmuster von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Atomen (relative Häufigkeit 1,1 %) wider ( $m/z$  347: 1 x  $^{13}\text{C}$ ;  $m/z$  348: 2 x  $^{13}\text{C}$ ) und stimmen mit den der Auftrittswahrscheinlichkeit entsprechenden Intensitäten überein. Bei 17 C-Atomen, wie bei Omeprazol, ergibt sich eine Auftrittswahrscheinlichkeit von einem C-13 Atom im Molekül zu  $17 \cdot 1,1$  %.

Das protonierte Molekülon der Masse  $m/z$  346 wurde durch Stoß mit inerten Argon-Atomen fragmentiert, wobei sich ein analytisch verwertbares Fragment mit  $m/z$  198 bildete (Abbildung 3-1, B). Dies bedeutet einen Massenverlust von 148 und gibt einen Hinweis auf die Abspaltung des 5-Methoxybenzimidazol-Rings.



**Abbildung 3-1:** A: MS-Massenspektrum von Omeprazol  
B: MS/MS-Fragmentspektrum von Omeprazol

Mit Hilfe des automatischen Optimierungstools der Xcalibur Software wurden die Parameter des Massenspektrometers hinsichtlich der Empfindlichkeit weiter optimiert. Nachfolgend wurde der interne Standard D<sub>3</sub>-Omeprazol analysiert.

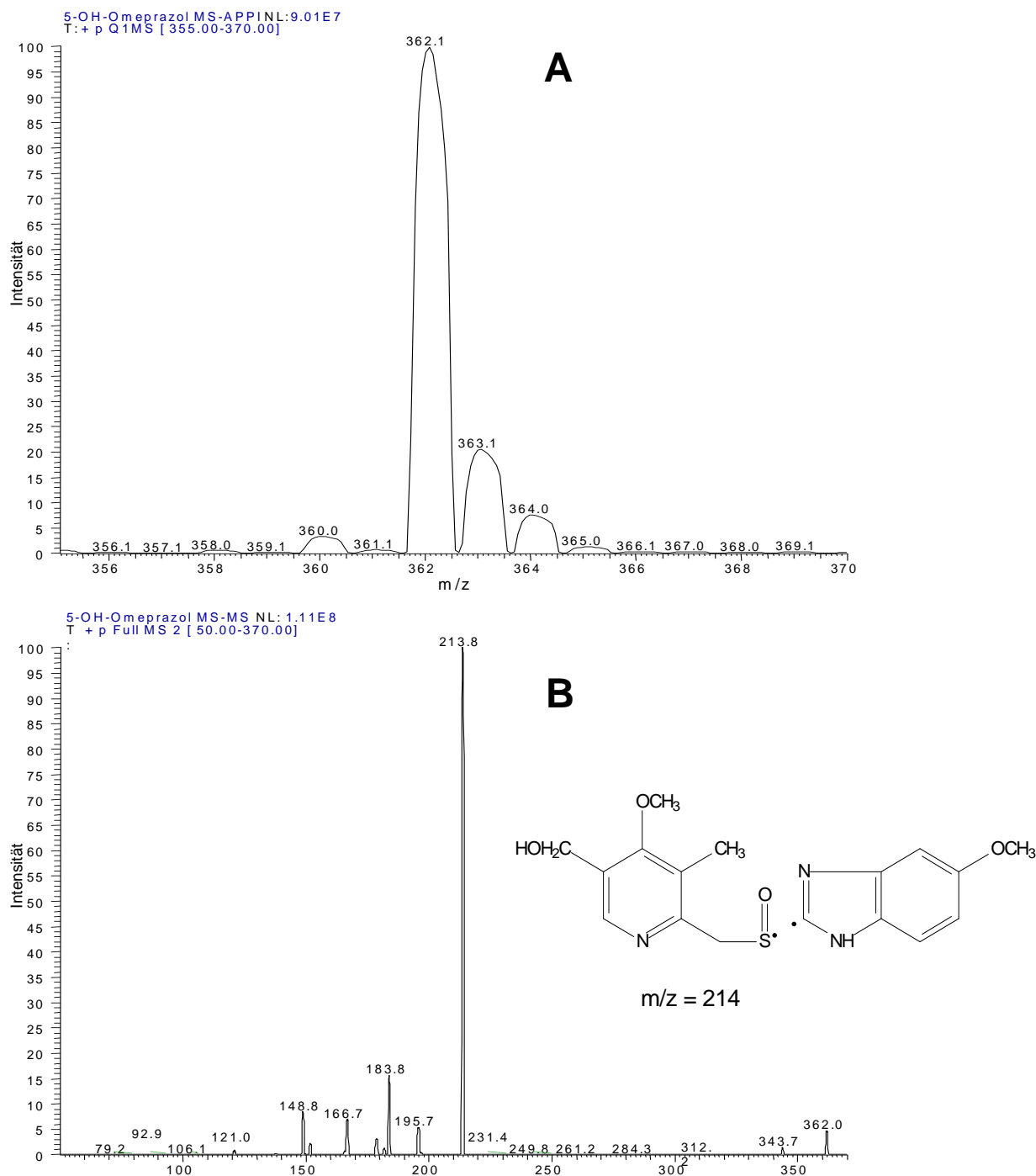


**Abbildung 3-2:** A: MS-Massenspektrum von D<sub>3</sub>-Omeprazol  
B: MS/MS-Fragmentspektrum von D<sub>3</sub>-Omeprazol

Im positiven Ionenmodus konnte das protonierte Molekülion  $[M+H]^+$  einwandfrei bei  $m/z$  349 detektiert werden (Abbildung 3-2, A). Bei der anschließenden Fragmentierung bildete sich ein analytisch verwertbares Fragment mit einem Masse-Ladungsverhältnis von 198 (Abbildung 3-2, B). Dies entsprach einem Masseverlust von  $m/z$  151 und deutet auf die Abspaltung des dreifach deuterierten 5-Methoxybenzimidazol-Rings hin.

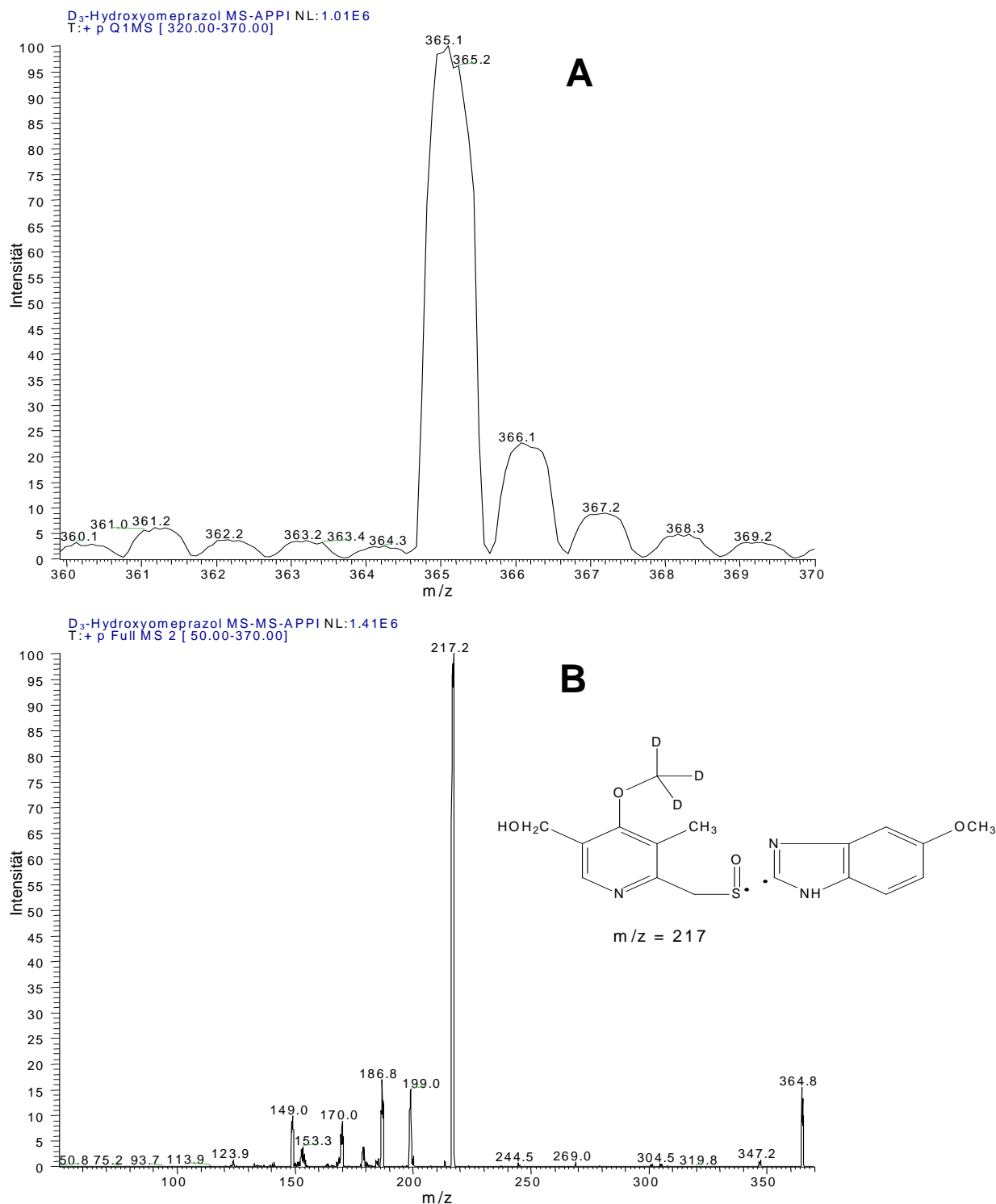
### 3.1.1.2 5-Hydroxyomeprazol, D3-5-Hydroxyomeprazol

Analog zu Omeprazol wurde 5-Hydroxyomeprazol und dessen interner Standard  $D_3$ -5-Hydroxyomeprazol untersucht. Im positiven Ionenmodus konnte das protonierte Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  362 detektiert werden (Abbildung 3-3, A). Bei der anschließenden Fragmentierung bildete sich ein analytisch verwertbares Fragment mit einem Masse-Ladungsverhältnis von 214 (Abbildung 3-3, B), welches ebenfalls einem Massenverlust von 148 entsprach.



**Abbildung 3-3:** A: MS-Massenspektrum von 5-Hydroxyomeprazol  
B: MS/MS-Fragmentspektrum von 5-Hydroxyomeprazol

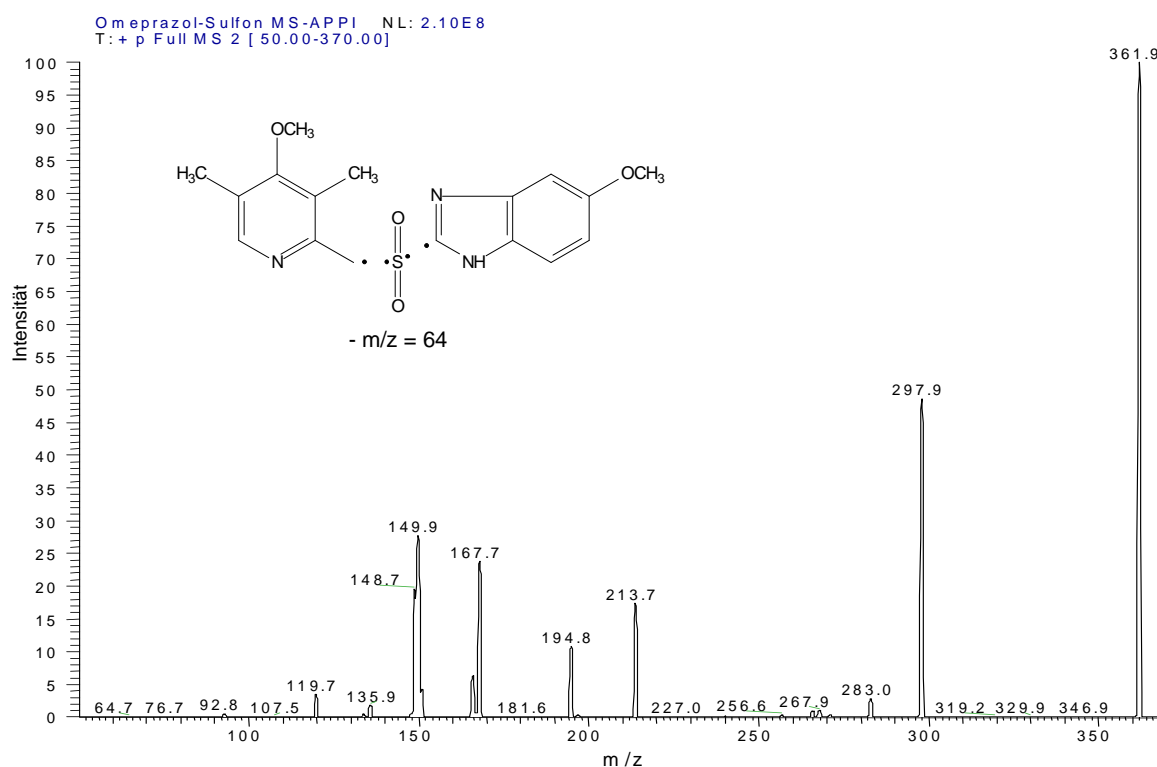
Die Analyse des internen Standards D<sub>3</sub>-5-Hydroxymeprazol ergab ein protoniertes MolekÜlion [M+H]<sup>+</sup> bei m/z 365 (Abbildung 3-4, A) sowie ein analytisch verwertbares Fragment mit einem Masse-Ladungsverhältnis von 217 (Abbildung 3-4, B). Dieses Fragment entstand durch einen Massenverlust von m/z 148 und bildete sich vermutlich durch die Abspaltung des 5-Methoxybenzimidazol-Rings.



**Abbildung 3-4:** A: MS-Massenspektrum von D<sub>3</sub>-5-Hydroxymeprazol  
B: MS/MS-Fragmentspektrum von D<sub>3</sub>-5-Hydroxymeprazol

### 3.1.1.3 Omeprazol-Sulfon

Angesichts der identischen Summenformeln von Omeprazol-Sulfon und Hydroxyomeprazol wurden identische Massenspektren erwartet. Tatsächlich wurde für Omeprazol-Sulfon das protonierte Molekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  362 detektiert. Die anschließende Fragmentierung ergab ein analytisch verwertbares Fragment mit einem Masse-Ladungsverhältnis von 298 (Abbildung 3-5). Dies entsprach einem Massenverlust von  $m/z$  64 und ließ auf die Abspaltung von Schwefeldioxid schließen.



**Abbildung 3-5:** MS/MS-Fragmentspektrum von Omeprazol-Sulfon

Wie in der Abbildung 3-5 ersichtlich, blieb trotz Fragmentierung ein beträchtlicher Anteil der ursprünglichen Substanz erhalten, welches auf eine höhere Stabilität des Schwefelzentrums hinweist, begründet durch seine höhere Oxidationsstufe in diesem Molekül. Höhere Fragmentierungsenergien, die das protonierte Molekülion effektiv fragmentierten, führten zu einer Vielzahl von Fragmenten mit sehr kleiner Massenzahl. Die Fragmentierungsenergie wurde so optimiert, dass eine möglichst hohe Intensität des Fragmentions  $m/z$  298 entstand.

Anhand der ermittelten Masse-Ladungsverhältnissen der protonierten Molekülionen  $[M+H]^+$  und der analytisch verwertbaren Fragmente konnten nun die Einstellungen für das Massenspektrometer erfolgen.

Es wurden fünf zu beobachtende Massenspuren eingestellt. Für Omeprazol wurde ( $m/z$  346  $\rightarrow$  198) beobachtet, für dessen deuterierten internen Standard  $D_3$ -Omeprazol ( $m/z$  349  $\rightarrow$  198), für 5-Hydroxyomeprazol ( $m/z$  362  $\rightarrow$  214), für Omeprazol-Sulfon ( $m/z$  362  $\rightarrow$  298) und die fünfte Massenspur beobachtete den deuterierten internen Standard  $D_3$ -5-Hydroxyomeprazol ( $m/z$  365  $\rightarrow$  217).

Mittels automatischem Optimierungstool der Xcalibur Software konnten die optimierten Kollisionsenergien ermittelt werden. Mit Ausnahme von Omeprazol-Sulfon (18 eV) betrug diese für alle Substanzen 14 eV.

### **3.1.2 Probenaufbereitung - Extraktion von Omeprazol und seiner Hauptmetabolite**

Um die Analyten der chiralen HPLC-Trennung zuführen zu können, müssen sie aus den Serumproben extrahiert werden. Gleichzeitig ist es günstig, wenn innerhalb dieses Extraktionsschrittes Störsubstanzen abgetrennt und die Konzentration an Analytmolekülen angereichert werden können.

Es ist bekannt, dass Omeprazol im sauren pH-Bereich instabil wird und hydrolysiert. Folglich war es für eine präzise Quantifizierung wichtig, den sauren pH-Bereich während des gesamten Probenverarbeitungsprozesses zu meiden. Dies wurde entweder durch einen geringen Zusatz der organischen Base Triethylamin (TEA) oder durch die Pufferung mit Ammoniumacetat auf einen pH-Wert von 8,5 erreicht.

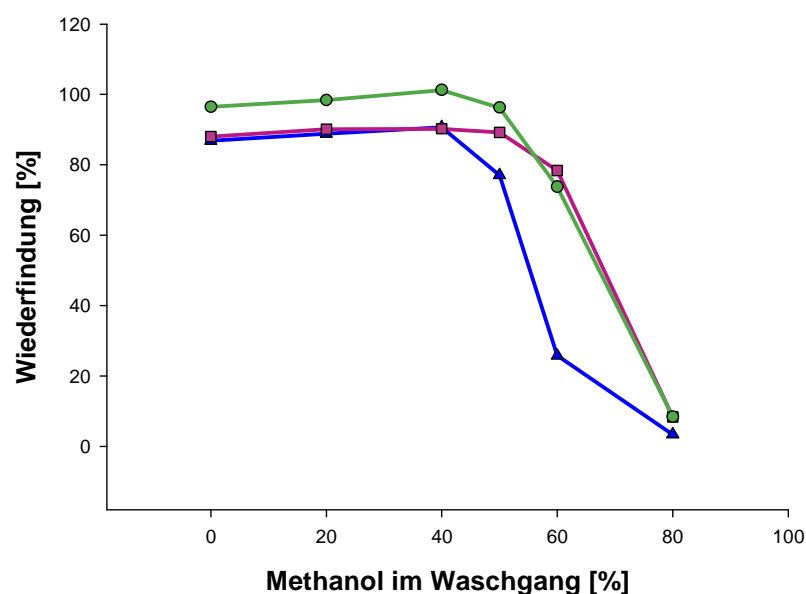
Zur Extraktion von Omeprazol nebst seiner Metabolite aus humanem Serum wurde die Festphasenextraktion (englisch: solid phase extraction, SPE) gewählt und die Water Oasis<sup>®</sup> HLB Extraktionskartuschen ausgesucht. Das HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) Füllmaterial ist ein pH-stabiles Copolymer, welches hohe reproduzierbare Wiederfindungsraten für saure, basische und neutrale Substanzen bietet, die weniger polar sind.

Die Extraktion wurde weitestgehend gemäß Herstellerangaben auf einer Vakuumstation für Extraktionskartuschen durchgeführt. Die Konditionierung erfolgte eingangs mit 1 ml Methanol gefolgt von 1 ml Wasser. Anschließend wurden die Kartuschen mit den gepufferten Proben, welche zudem mit dem internen Standard ( $D_3$ -Omeprazol,  $D_3$ -5-Hydroxyomeprazol) versehen wurden, beladen. Der erste Waschschrift wurde mit 1 ml Ammoniumacetatpuffer durchgeführt, um Störsubstanzen wie Proteine und Salze von der SPE-Kartusche zu entfernen. Der zweite Waschschrift sollte mit einem Anteil an organischem Lösemittel, hier Methanol, erfolgen, um weitere polare Störsubstanzen zu eluieren. Hierbei ist ein Kompromiss zwischen einer



möglichst effektiven Entfernung von Störsubstanzen und der Vermeidung von einer vorzeitigen Elution der Zielanalyten zu finden. Um die optimale Zusammensetzung der zweiten Waschlösung zu ermitteln und somit den Extraktionsprozess zu optimieren, wurde ein Elutionsprofil, wie in Abbildung 3-6 dargestellt, aufgenommen. Hierzu wurden reine Lösungen der Analyten, welche einer 100 %igen Extraktionsausbeute entsprachen, mit den tatsächlichen Extrakten nach den verschiedenen Waschgängen verglichen.

Für den Extraktionsprozess war noch keine Enantioselektivität erforderlich, so dass die Extraktionsprodukte mit Hilfe eines achiralen HPLC-Systems mit UV-Detektion bei 302 nm nach der Methode von Shimizu et al. [40] analysiert werden konnten.



**Abbildung 3-6:** Oasis®HLB Kartuschen: Wiederfindungsraten von Omeprazol (—■—) 5-Hydroxyomeprazol (—▲—) und Omeprazol-Sulfon (—◻—) mit variierendem Anteil an Methanol im Waschgang

Anhand der Grafik 3-6 wird ersichtlich, dass es bis zu einem Anteil von 40 % Methanol in der Waschlösung zu keiner vorzeitigen Elution und somit zu keinem Verlust der Analyten kam. Bei 50 % Methanolanteil wurden erste Verluste von 5-Hydroxyomeprazol deutlich, wobei bei 60 % und mehr Methanol im Waschschrift alle Analyten zu einem bestimmten Grad vorzeitig eluierten. Ein Gemisch aus 30 % Methanol und 70 % Ammoniumacetatpuffer lieferte ausreichend reine Extrakte ohne die Gefahr eines Analytenverlustes. Folglich wurde dieses Gemisch für den zweiten Waschschrift gewählt. Unter den gewählten Bedingungen war die Extraktionsausbeute annähernd quantitativ.

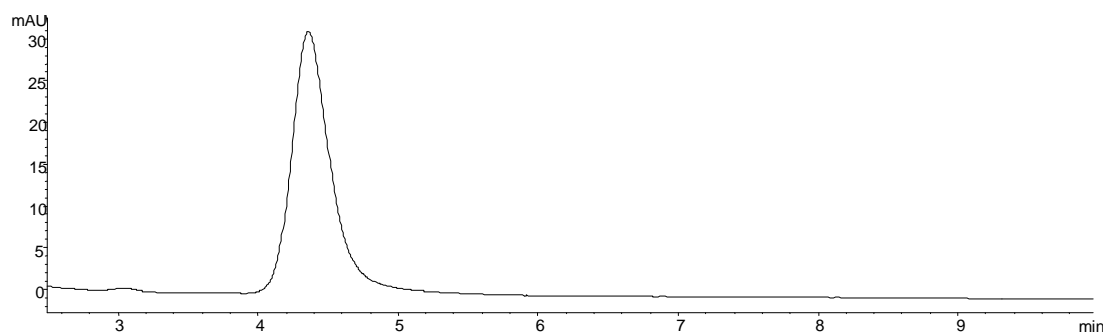
### 3.1.3 Entwicklung einer enantioselektiven chromatographischen Trennmethode

#### 3.1.3.1 Methodenentwicklung auf Supelco Chirobiotic R150 x 2,1 mm, 5 $\mu$ m

Die Säule Supelco Chirobiotic R150 x 2,1 mm mit einer Teilchengröße von 5  $\mu$ m wurde ausgesucht, weil diese im Umkehrphasen (RP)-Modus trennt, welches die bevorzugte Methode in der Massenspektrometrie darstellt.

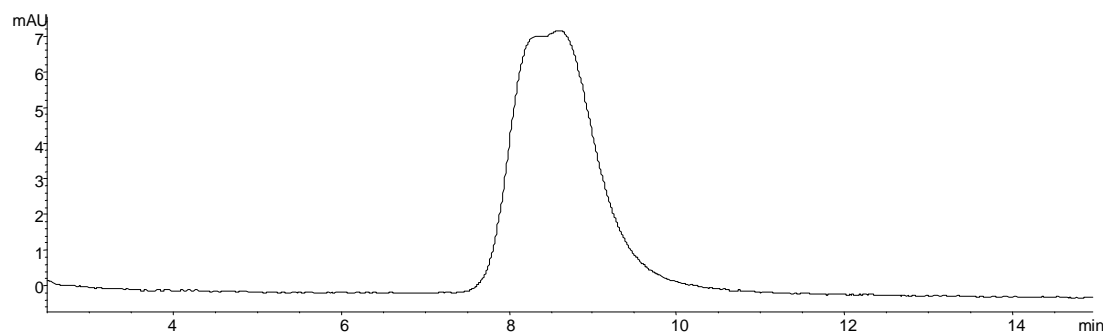
Um eine Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol bei möglichst einfachen Bedingungen zu erreichen, wurde im ersten Schritt die isokratische Elution untersucht. Dabei wurden verschiedene Zusammensetzungen des Laufmittels erprobt. Die Detektion erfolgte in allen Vorversuchen mit Hilfe der UV-Detektion bei 303 nm.

Bei einer Laufmittelzusammensetzung von 50 % Methanol und 50 % TEA-Essigsäure-Puffer (pH 6) zeigte sich keine Enantiomerentrennung (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7:** HPLC-Chromatogramm (UV, isokratisch), keine Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, Laufmittel 50 % Methanol/ 50 % TEA –Essigsäure-Puffer

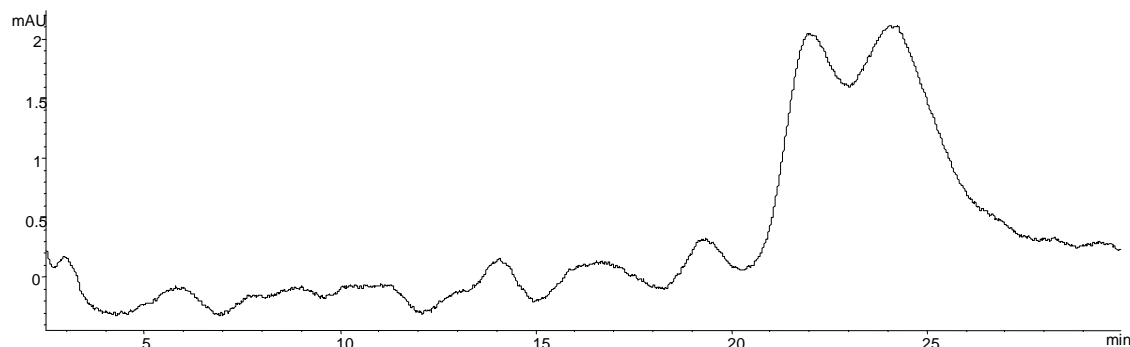
Bei einer Reduktion von Methanol auf 35 % im Laufmittel konnte ansatzweise eine Enantiomerentrennung beobachtet werden (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8:** HPLC-Chromatogr. (UV, isokrat.), ansatzweise Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, Laufmittel 35 % Methanol/ 65 % TEA –Essigsäure-Puffer

Der Anteil an Methanol im Laufmittel wurde weiter gesenkt. Die mobile Phase setzte sich nun aus 25 % Methanol und 75 % TEA-Essigsäure-Puffer (pH 6) zusammen. Der

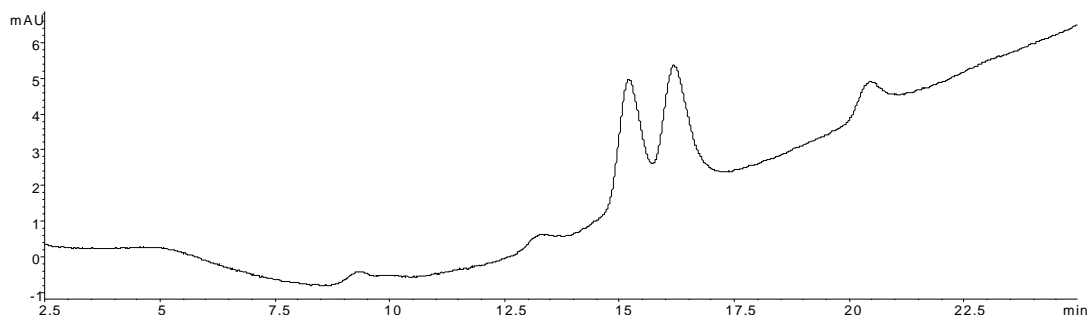
Ansatz einer Enantiomerentrennung wurde deutlicher, jedoch war dies mit extrem langen Retentionszeiten verbunden (Abbildung 3-9).



**Abbildung 3-9:** HPLC-Chromatogr. (UV, isokrat.), ansatzweise Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, Laufmittel 25 % Methanol/ 75 % TEA –Essigsäure-Puffer

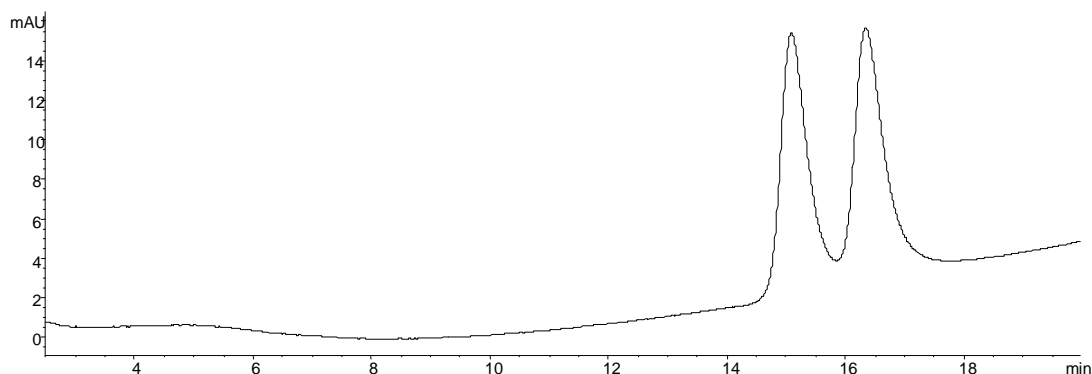
Schnell wurde deutlich, dass akzeptable Retentionszeiten nur mit einer Gradiententrennung erreichbar wären.

Als erstes wurde ein Gradientengemisch von anfänglich 15 % Methanol und 85 % TEA-Essigsäure-Puffer gewählt, welches innerhalb von 20 min auf einen Methanolgehalt von 45 % eingestellt wurde (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, Gradient 15 % MeOH/ 85 % TEA–Essigsr.-Puffer, in 20 min auf 45 % MeOH

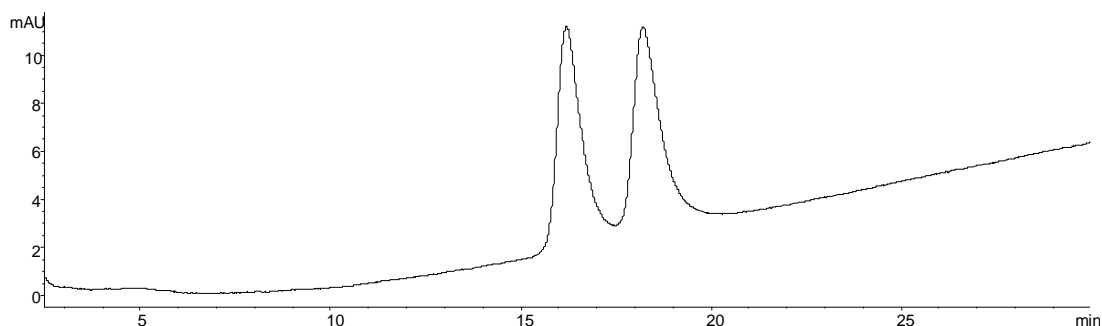
Um die Trennung weiter zu optimieren wurde der anfängliche Methanolgehalt weiter auf 10 % reduziert (Abbildung 3-11).



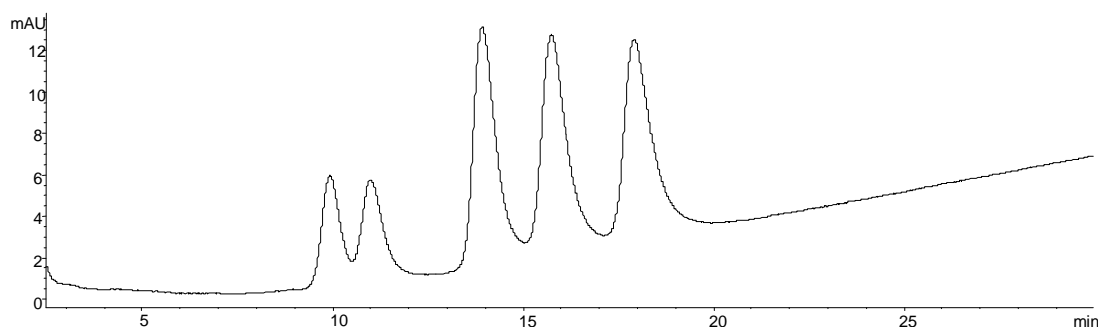
**Abbildung 3-11:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, Gradient 10 % MeOH/ 90 % TEA–Essigsr.-Puffer, in 20 min auf 45 % MeOH

Aus den Versuchen wurde deutlich, dass das Gradientenprogramm mit wenig organischem Modifier gestartet werden muss, um eine effektive Trennung der Omeprazol-Enantiomere zu erreichen.

Das Gradientenprogramm wurde weiter verfeinert (Abbildung 3-12), so dass innerhalb von 25 min ausgehend von 10 % ein Methanolgehalt von 32,5 % erreicht wurde. Nachfolgend konnte diese Methode dann für Omeprazol zusammen mit seinen Hauptmetaboliten getestet werden (Abbildung 3-13).

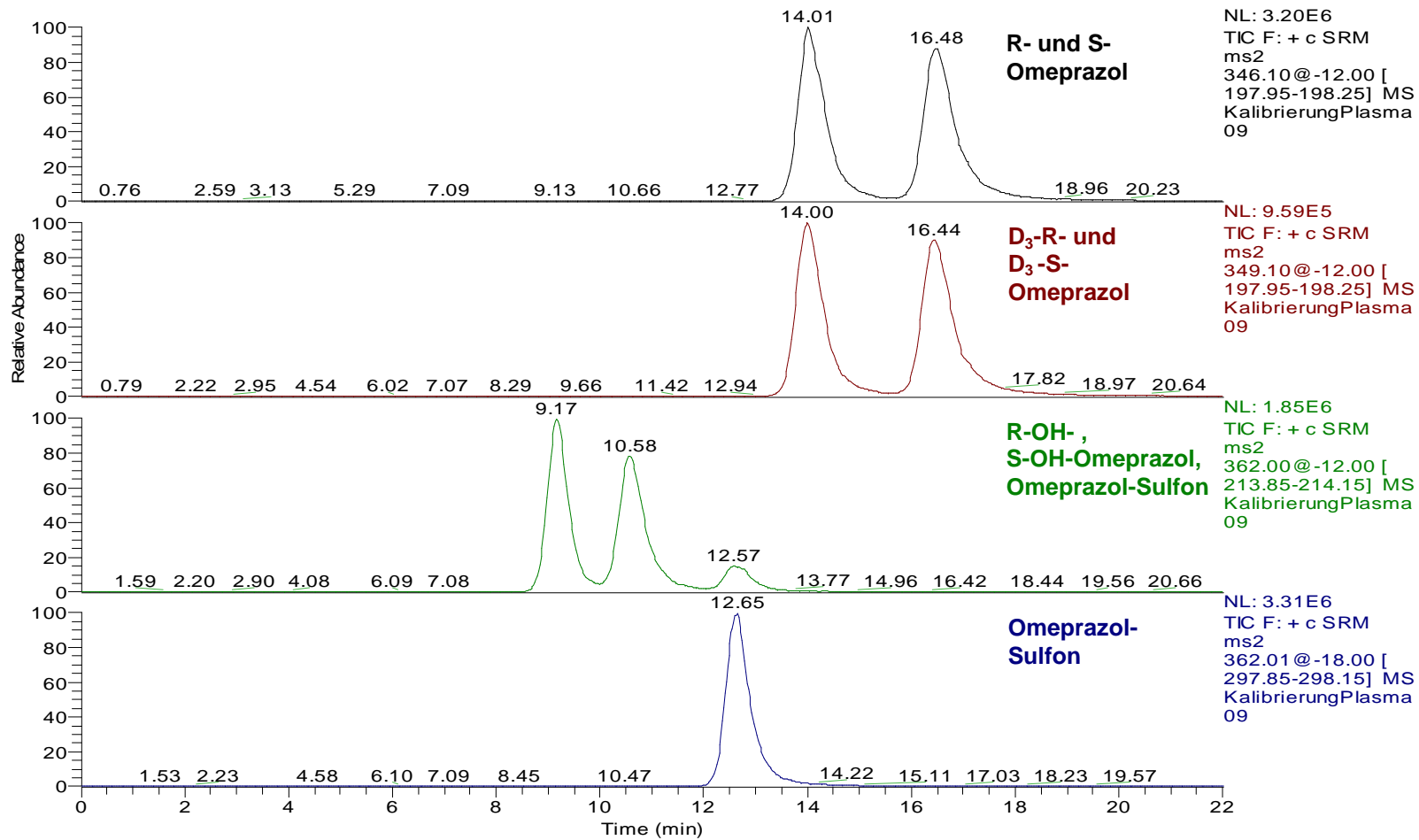


**Abbildung 3-12:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomertrennung von R/S-Omeprazol, Gradient 10 % MeOH/ 90 % TEA–Essigsr.-Puffer, 25 min auf 32,5 % MeOH

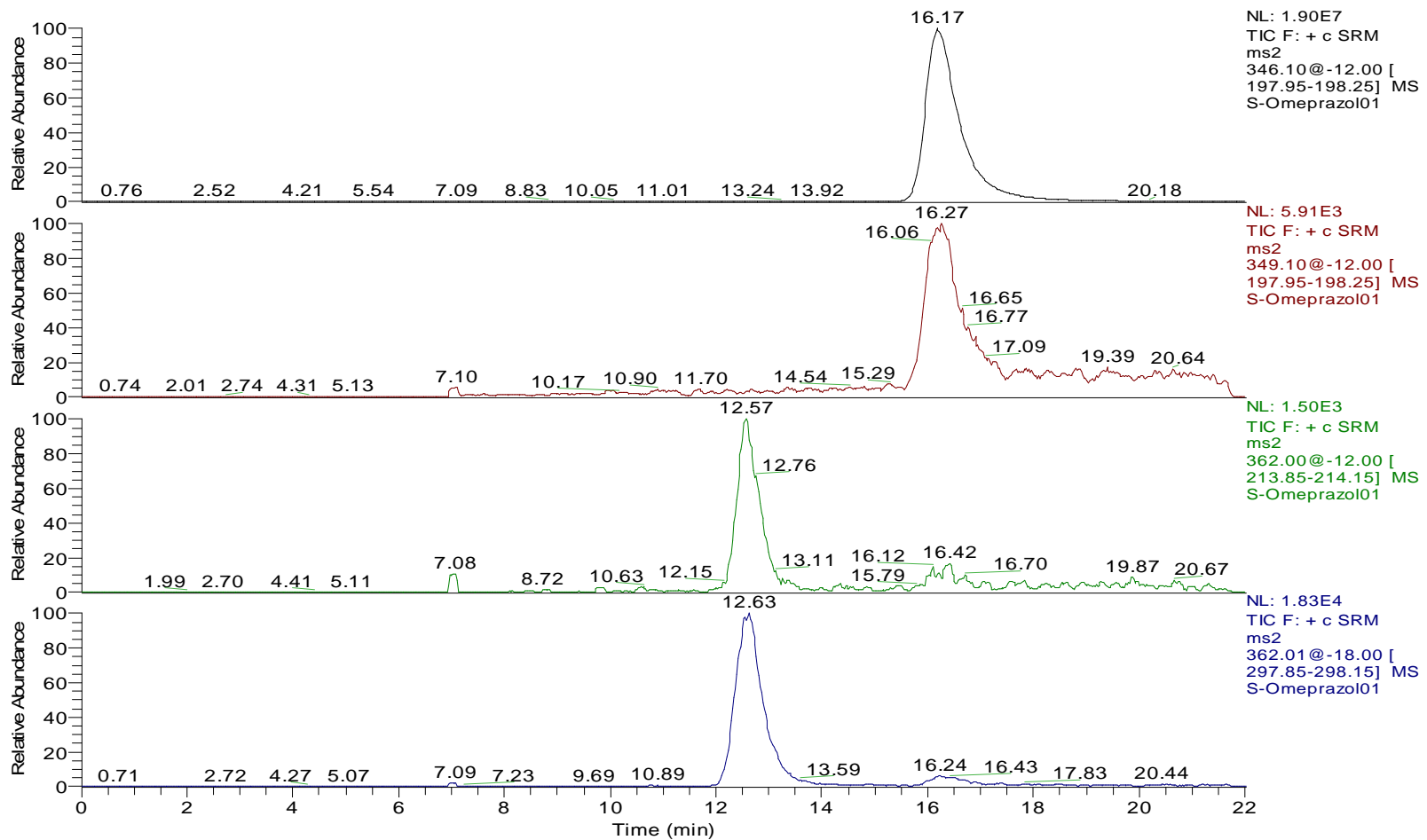


**Abbildung 3-13:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomertrennung von Omeprazol und seiner Metabolite, Gradient 10 % MeOH/ 90 % TEA–Essigsäure-Puffer, in 25 min auf 32,5 % MeOH

Die Trennung von R- und S-Omeprazol sowie seiner Hauptmetabolite (R-5-Hydroxyomeprazol, S-5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon) war unter den gegebenen Bedingungen erfolgreich. Folglich konnte nun die Analyse mit Hilfe des Massenspektrometers erfolgen. Die Einstellungen des Massenspektrometers entsprachen den unter 3.1.1 beschriebenen, wobei eine APCI-Ionenquelle zum Einsatz kam, da dies die übliche Ionenquelle für die Umkehrphasen-Chromatographie darstellt. Sowohl die Enantiomertrennung als auch die Trennung zwischen Omeprazol und seiner Metabolite war, wie in Abbildung 3-14 dargestellt, erfolgreich. Es resultierten Peaks mit akzeptablen Retentionszeiten und ausreichender Symmetrie und Trennung der Enantiomere.



**Abbildung 3-14:** HPLC-Chromatogramm (MS), Enantiomerentrennung von Omeprazol und seiner Metabolite, Gradient 10 % MeOH/ 90 % TEA–Essigsäure-Puffer, in 25 min auf 32,5 % MeOH



**Abbildung 3-15:** HPLC-Chromatogramm (MS), S-Omeprazol Gradient 10 % MeOH/ 90 % TEA–Essigsäure-Puffer, in 25 min auf 32,5 % MeOH

Entscheidend für die spätere Analyse der Patientenproben war es, herauszufinden, in welcher Reihenfolge die Enantiomere eluieren. Dementsprechend wurde reines S-Omeprazol massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 3-15).

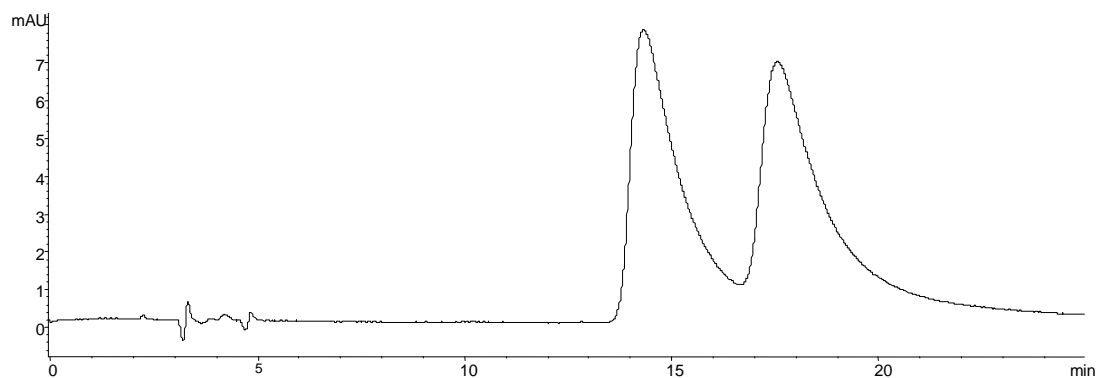
Es zeigte sich, dass S-Omeprazol im Chromatogramm nach dem R-Omeprazol erscheint. Dies ließ auf eine eher ungünstige Elutionsreihenfolge von S- und R-Hydroxyomeprazol schließen. Der erwartungsgemäß kleinere Peak würde nach dem größeren Peak eluieren. Unter den Bedingungen einer nur schwer zu erreichenden vollständigen Basislinientrennung der Enantiomere, wäre eine saubere Integration nur schwer möglich und Probleme bei der Quantifizierung die Folge.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde auf eine HPLC-Säule mit anderer Trenncharakteristik zurückgegriffen.

### 3.1.3.2 Methodenentwicklung auf ReproSil Chiral-CA 250 x 2 mm, 5 µm

Die ReproSil Chiral-CA (CA steht für Carboxylsäure) 250 x 2 mm mit einer Partikelgröße von 5 µm trennt nach Herstellerangaben Omeprazol-Enantiomere im Normalphasen-Modus. Dabei ist zu erwarten, dass die R- und S-Enantiomere in umgekehrter Reihenfolge als in der in Abschnitt 3.1.3.1 beschriebenen Umkehrphasen-Trennung eluieren. Das Säulenprospekt gibt zudem Hinweise auf ein erfolgsversprechendes Laufmittel. Es wird ein Gemisch aus Isopropanol und Hexan empfohlen. Ferner wird gegen Peak-Tailing ein Zusatz von Triethylamin (TEA) und/oder Essigsäure zum Laufmittel angeregt.

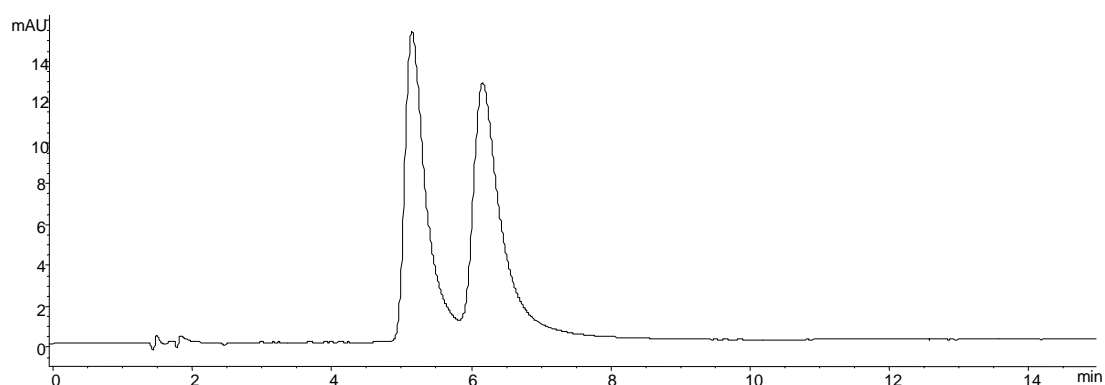
Die ersten Versuche mit Hilfe dieser Säule R- und S-Omeprazol zu trennen, erfolgten isokratisch mittels UV-Detektion bei 303 nm. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 10 % Isopropanol mit 4 % Essigsäure und 90 % Hexan gewählt.



**Abbildung 3-16:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomertrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Isopropanol-4 % Essigsäure/ Hexan (10/ 90)

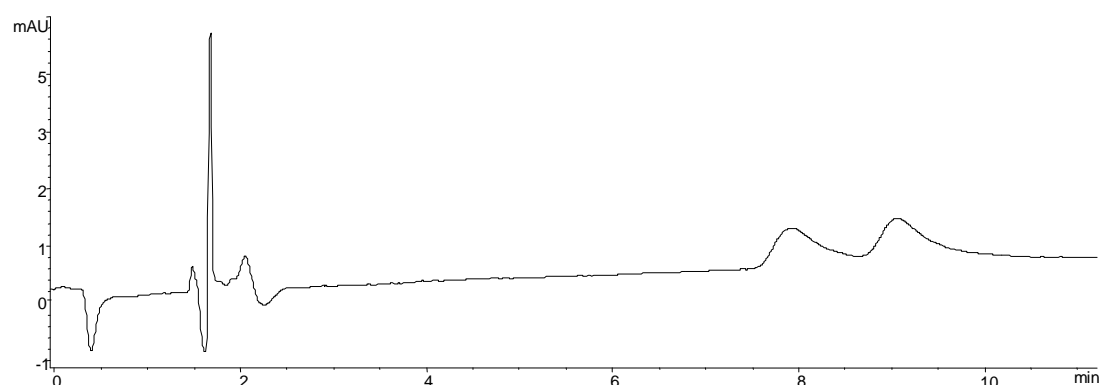
Wie in Abbildung 3-16 dargestellt, erfolgte unter diesen Bedingungen eine deutliche Trennung, jedoch zeigten die Peaks ein sehr starkes Tailing.

Um dieses Tailing zu vermindern, wurde zur mobilen Phase neben Essigsäure auch ein geringer Prozentanteil TEA gegeben, um die aktiven Silanol-Zentren der stationären Phase abzudecken. Wie in Abbildung 3-17 ersichtlich, konnte mit diesem veränderten Laufmittel eine vernünftige Enantiomerentrennung erreicht und ferner das Tailing verbessert werden.



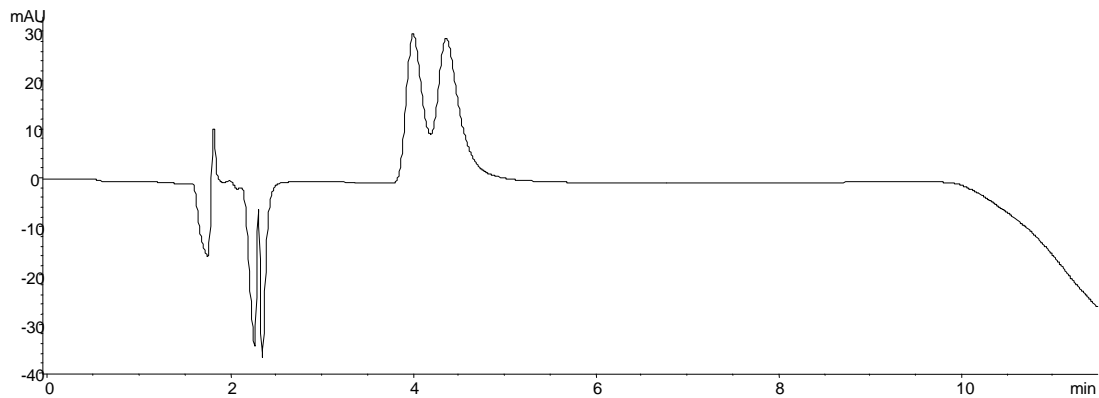
**Abbildung 3-17:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Isopropanol-1,5 % Essigsäure-0,5 %TEA/ Hexan (10/ 90)

Das Laufmittel wurde weiter verändert, jedoch konnte selbst mit weniger Isopropanol (Abbildung 3-18) oder anderen Alkoholen, wie z. B. Ethanol (Abbildung 3-19) oder Methanol, keine bessere Trennung erreicht werden. Mit geringerem Isopropanol-Anteil im Laufmittel wurden die Retentionszeiten sehr lang, aber ohne eine bessere Trennung zu erzielen.



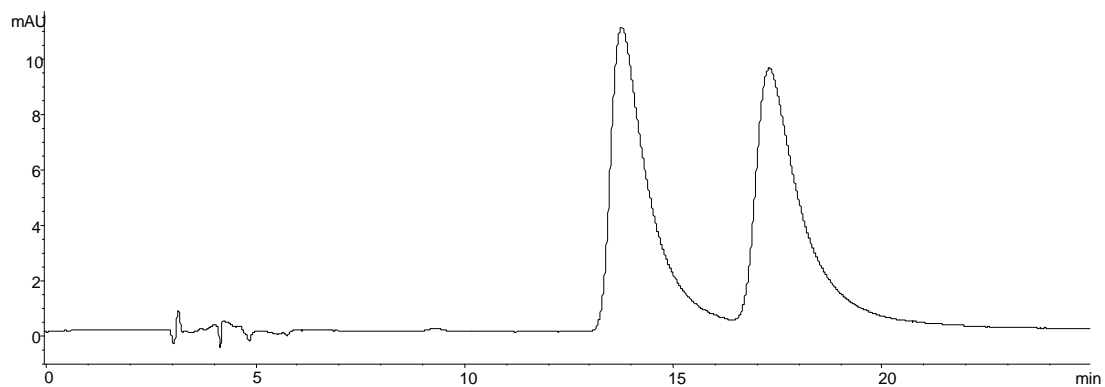
**Abbildung 3-18:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Isopropanol-1,5 % Essigsäure-0,5 %TEA/Hexan (5/ 95)





**Abbildung 3-19:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Ethanol-0,5 % Essigsäure/ Hexan (20/ 80)

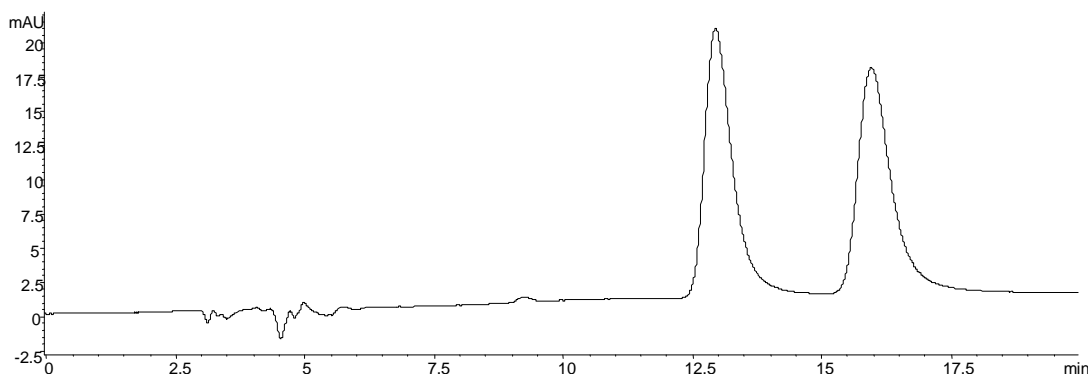
Methanol sowie Ethanol führten zu kurzen Retentionszeiten aber zu einer schlechten Enantiomerenauflösung, selbst bei sehr geringen Konzentrationen im Laufmittel. Anhand dieser Versuche wurde deutlich, dass Isopropanol den anderen Alkoholen deutlich überlegen war. Allerdings musste der Tailing-Effekt weiter verbessert werden. Hierzu wurde anstelle von Triethylamin (TEA) das Amin 1-Methylpiperidin auf seine Eignung hin untersucht (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Isopropanol-1,5 % Essigsäure-0,5 % 1-Methylpiperidin/ Hexan (10/ 90)

Das Tailing konnte jedoch auch mit 1-Methylpiperidin nicht verbessert werden und zeigte sich ähnlich ausgeprägt wie bei TEA.

Im nächsten Schritt wurde anstatt des Triethylamins (TEA) Diethylamin (DEA) untersucht (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21:** HPLC-Chromatogramm (UV), Enantiomerentrennung von R/S-Omeprazol, mobile Phase: Isopropanol-1,5 % Essigsäure-0,5 % DEA/ Hexan (10/ 90)

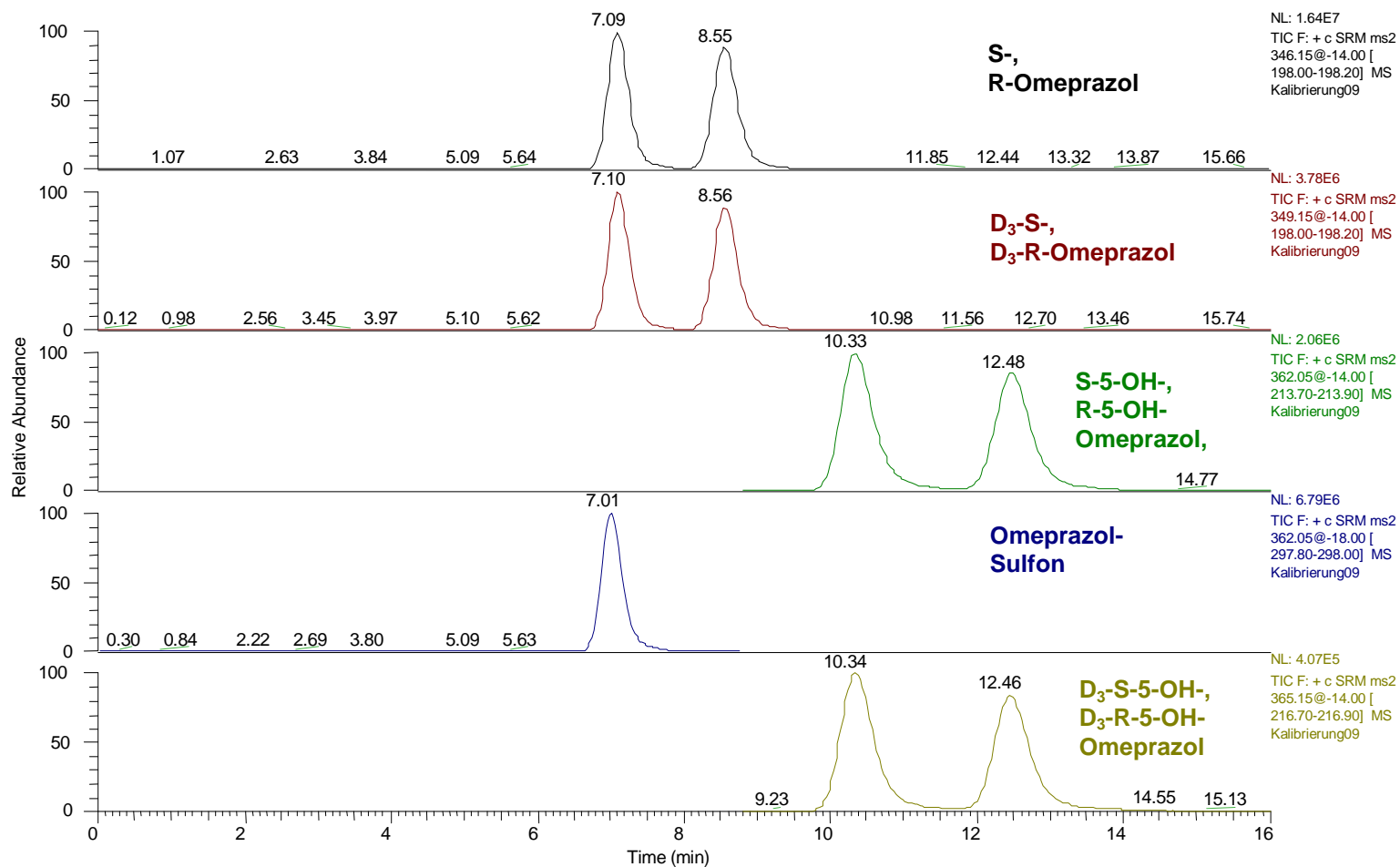
Mit Hilfe dieser kleinen Veränderung eluierten die Enantiomeren Basislinien-getrennt und ergaben Peaks annähernd ohne Tailing. Um die Symmetrie der Peaks weiter zu verbessern, wurde die Konzentration an DEA auf 0,95 % erhöht. Gleichzeitig musste auch die Konzentration des sauren Modifiers erhöht werden, um in den für die Säule zulässigen pH-Bereich zu bleiben.

Die Wahl und Konzentration des sauren Modifiers hatte generell einen sehr geringen Effekt auf die Peakform und die Auflösung, so dass die Wahl auf Essigsäure, wie vom Säulen-Hersteller empfohlen, fiel. Die Konzentration derselbigen wurde so gewählt, dass ein pH-Wert von circa vier erreicht wurde, welches genau der Mitte des für die stationäre Phase zulässigen pH-Bereiches entsprach.

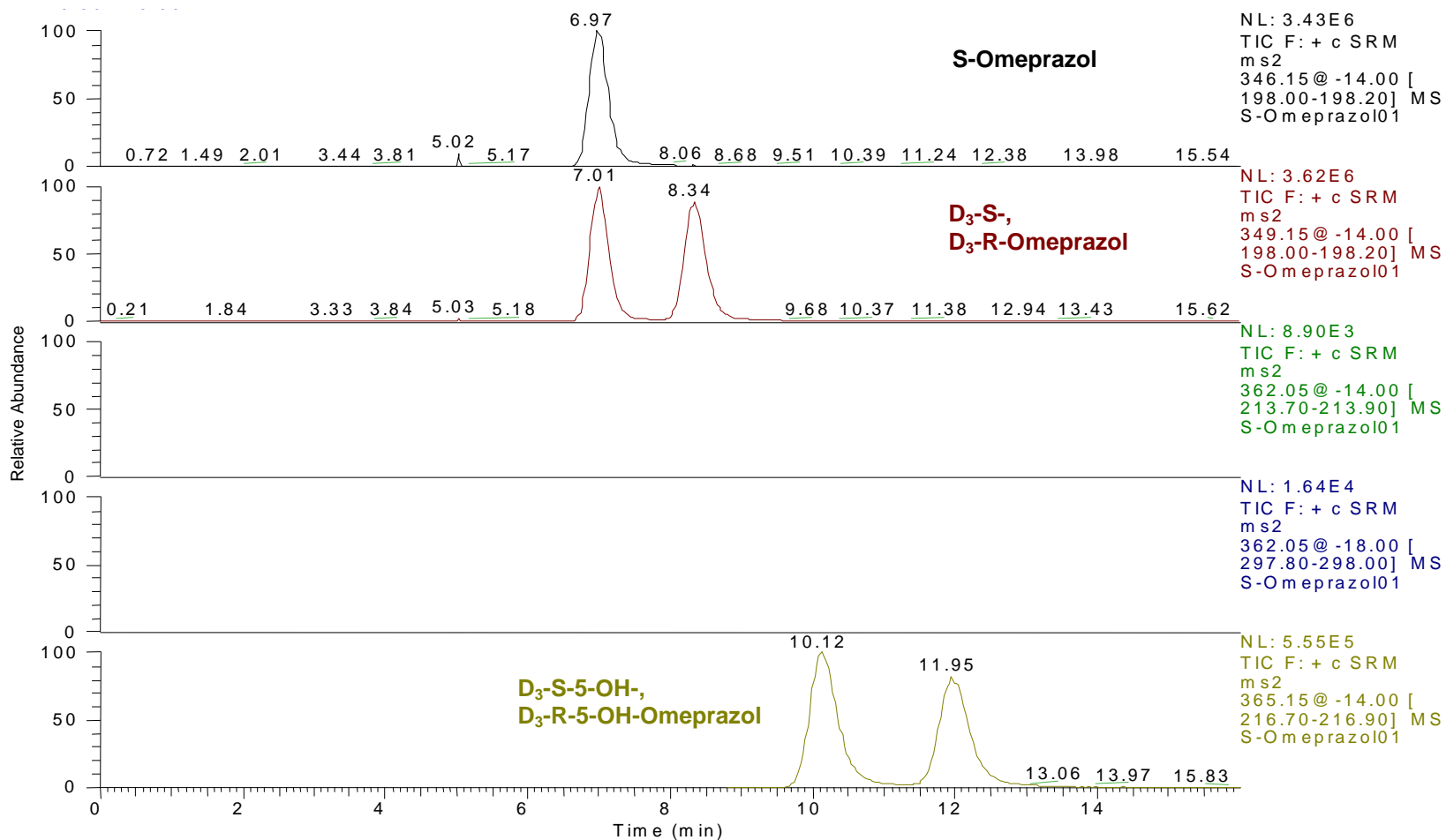
Die Peaksymmetrie konnte mit der Konzentrationserhöhung des basischen Modifiers weiter verbessert werden, so dass diese Methode nachfolgend auch für die Metabolite getestet werden konnte.

Schon bei der chromatographischen Trennung unter isokratischen Bedingungen, allerdings ohne Metabolite (Abbildung 3-21), waren relativ lange Retentionszeiten auffällig. Dieses Problem wurde durch die gleichzeitige Bestimmung von Omeprazol und seiner Metabolite weiter verstärkt, so dass keine angemessenen Retentionszeiten mittels isokratischer Trennung erreicht werden konnten. Ein flacher Gradient wurde entwickelt, um dieses Problem zu lösen.

Nachfolgend konnte Omeprazol zusammen mit seinen Hauptmetaboliten massenspektrometrisch analysiert werden. Dieses erfolgte mit Hilfe eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit einer Ionisation unter Atmosphärendruck, welche mit Photonen erreicht wurde (APPI). Wie in Abbildung 3-22 erkennbar, resultierten mit dieser Gradiententrennung im Massenspektrometer symmetrische, spitze und Basislinien-getrennte Peaks mit angemessener Retentionszeit.



**Abbildung 3-22:** HPLC-Chromatogramm (MS), Enantiomertrennung von R/S-Omeprazol, R/S-5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon  
 Gradient: Isopropanol-3,8 % Essigsäure-0,95 % DEA/ Hexan (10/ 90) zu Beginn



**Abbildung 3-23:** HPLC-Chromatogramm (MS), Enantiomerentrennung von S-Omeprazol, D<sub>3</sub>-S/R-Omeprazol, D<sub>3</sub>-S/R-5-Hydroxyomeprazol  
 Gradient: Isopropanol-3,8 % Essigsäure-0,95 % DEA/ Hexan (10/ 90) zu Beginn

Im nächsten Schritt sollte die Reihenfolge der Enantiomeren im Chromatogramm ermittelt werden. Dazu wurde S-Omeprazol allein analysiert.

Es zeigte sich (Abbildung 3-23), dass das S-Enantiomer, wie erwartet, zuerst eluierte. Dies ließ auf günstige Bedingungen für die Trennung und Quantifizierung der Hydroxymetabolite in den späteren Patientenproben schließen. Der zu erwartende kleinere Peak von S-5-Hydroxyomeprazol würde im Chromatogramm vor dem größeren erscheinen und somit gut quantifizierbar sein.

Alle Vorversuche inklusive der Umkehrphasen-Methode wurden bei einer annähernden Temperatur von 35 °C durchgeführt. Zur Optimierung der Normalphasen-Analyse wurden des Weiteren niedrigere Säulentemperaturen untersucht, welche erfahrungsgemäß bessere Enantiomerentrennungen auf chiralen stationären Phasen ergeben. Die beste Enantiomerentrennung ergab sich bei einer Temperatur von 20 °C. Bei einer weiteren Temperaturabsenkung wurde die Trennleistung aufgrund der steigenden Viskosität der mobilen Phase wieder schlechter.

### **3.1.4 Methodvalidierung**

#### **3.1.4.1 Selektivität**

Die Chromatogramme der drei verschiedenen Leerplasmaproben zeigten keine Signale von endogenen Substanzen, so dass die Quantifizierung der Analyte nicht gestört wurde.

#### **3.1.4.2 Übersprechen in andere Massenspuren**

Für eine ungestörte Quantifizierung ist es wichtig, dass die deuterierten internen Standards keine bzw. nur vernachlässigbare Signalintensitäten auf den Massenspuren der einfach-protonierten Molekülionen  $[M + H]^+$  zeigen. Hierfür wurden die internen Standards, D<sub>3</sub>-Omeprazol und D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol, massenspektrometrisch identifiziert (Abbildung 3-24) und gleichzeitig die Massenspuren der einfach-protonierten Molekülionen  $[M + H]^+$  beobachtet.

Ferner wurde analysiert, inwieweit das Massenspektrometer alle anderen Substanzen voneinander unterscheiden kann. Dazu wurden Omeprazol (Abbildung 3-25) 5-Hydroxyomeprazol (Abbildung 3-26) und Omeprazol-Sulfon (Abbildung 3-27) einzeln identifiziert.

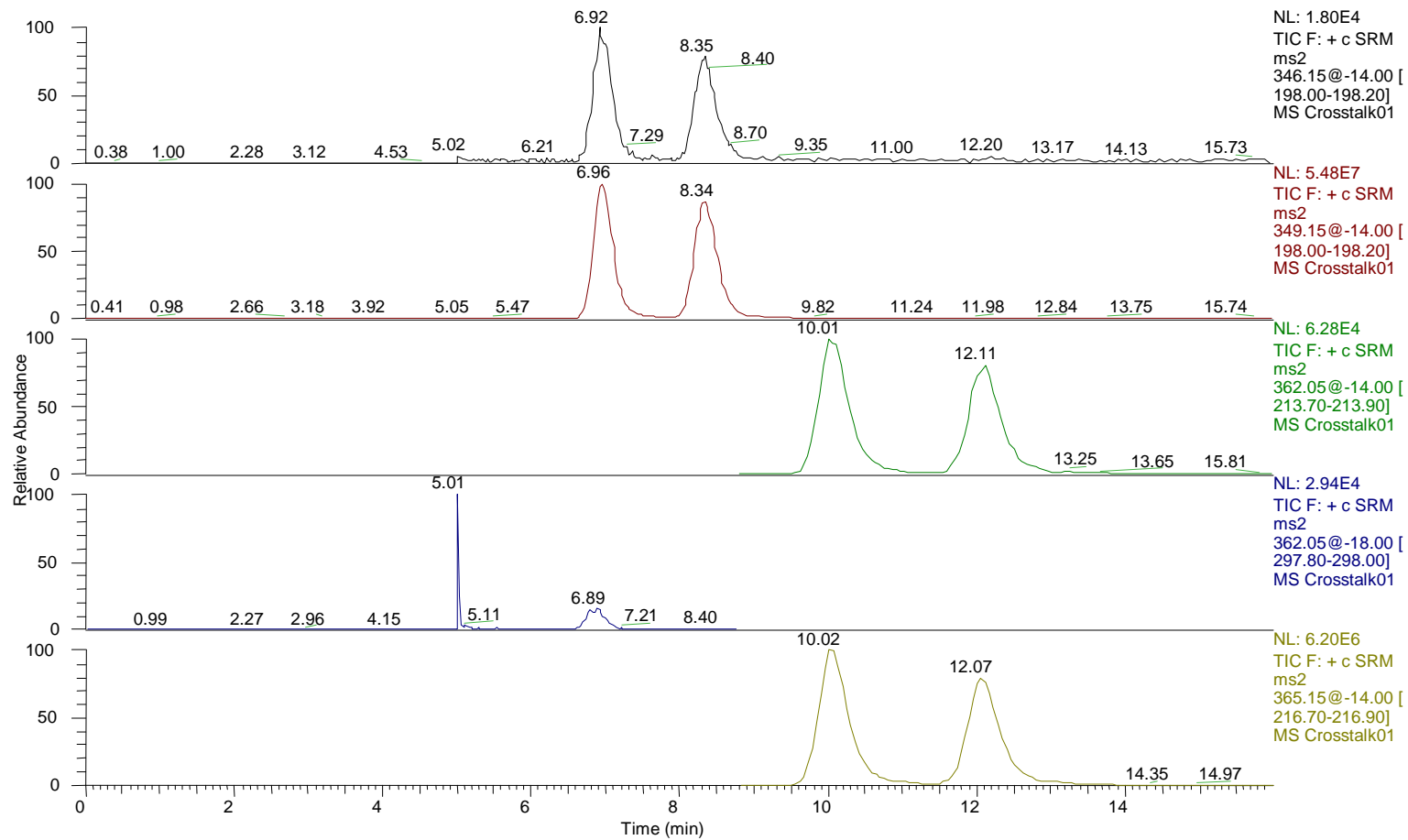


Abbildung 3-24: HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) von D<sub>3</sub>-Omeprazol (10 µg/ml) und D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol (5 µg/ml)

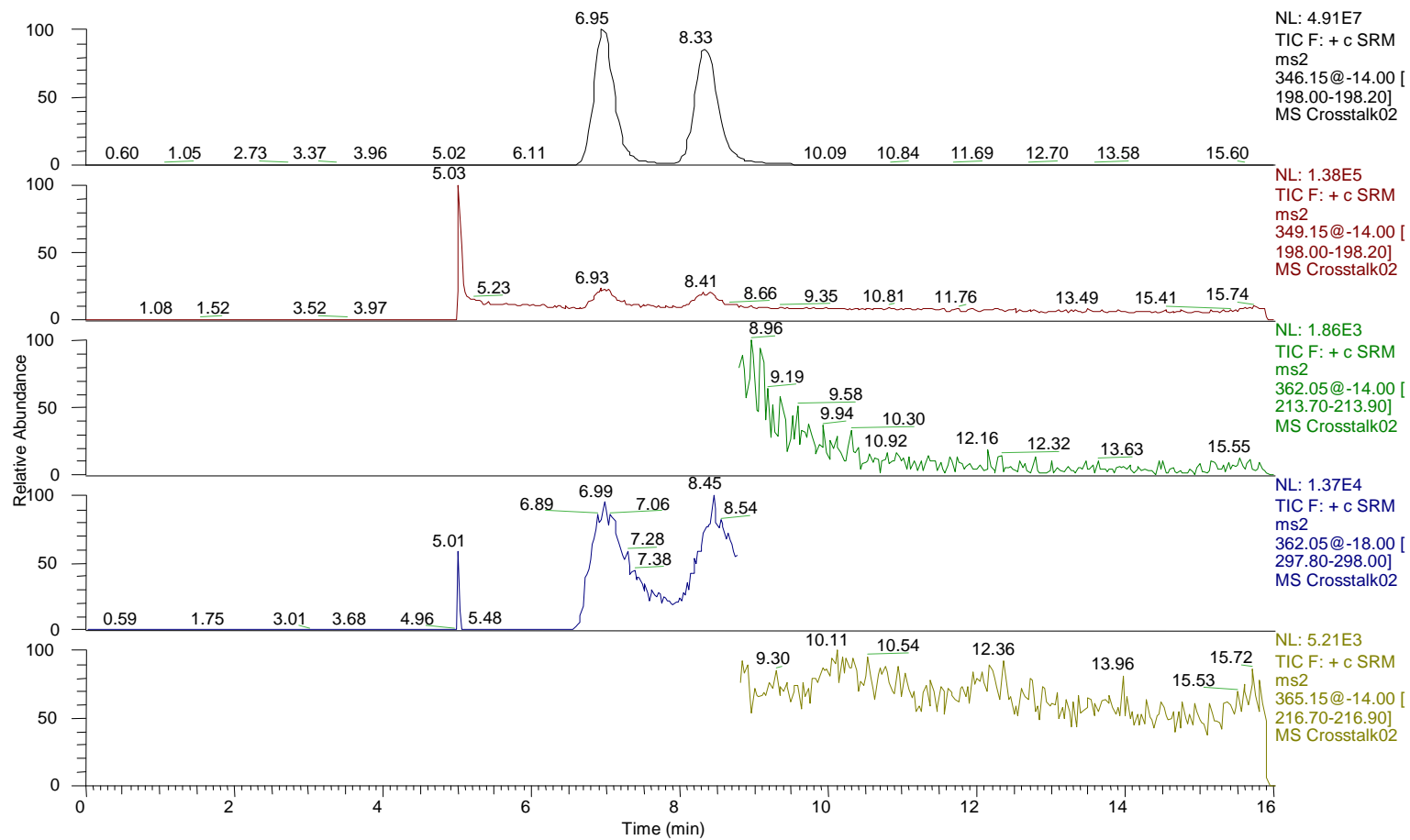


Abbildung 3-25: HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) von Omeprazol (10 µg/ml)

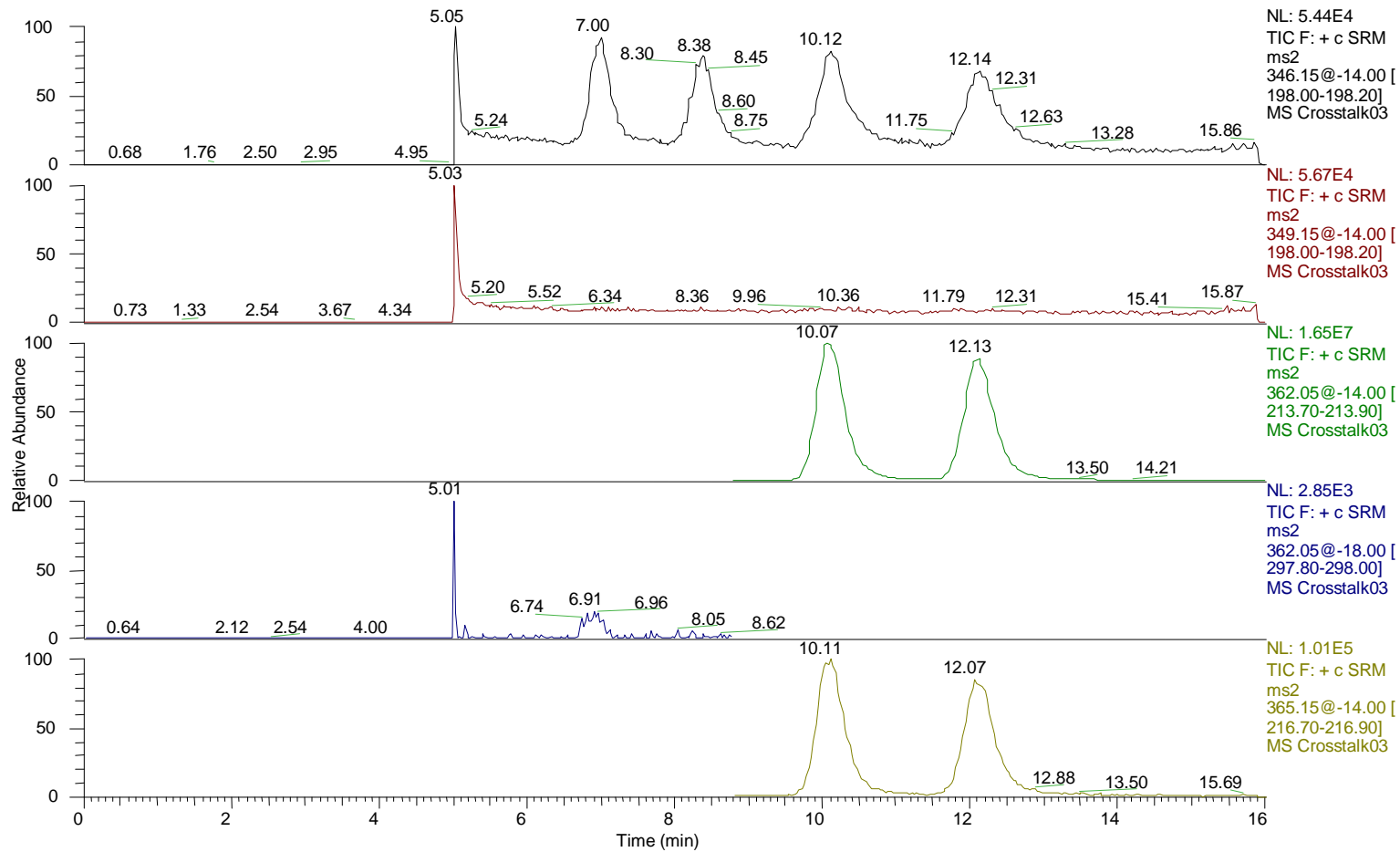


Abbildung 3-26: HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) von 5-Hydroxyomeprazol (10 µg/ml)



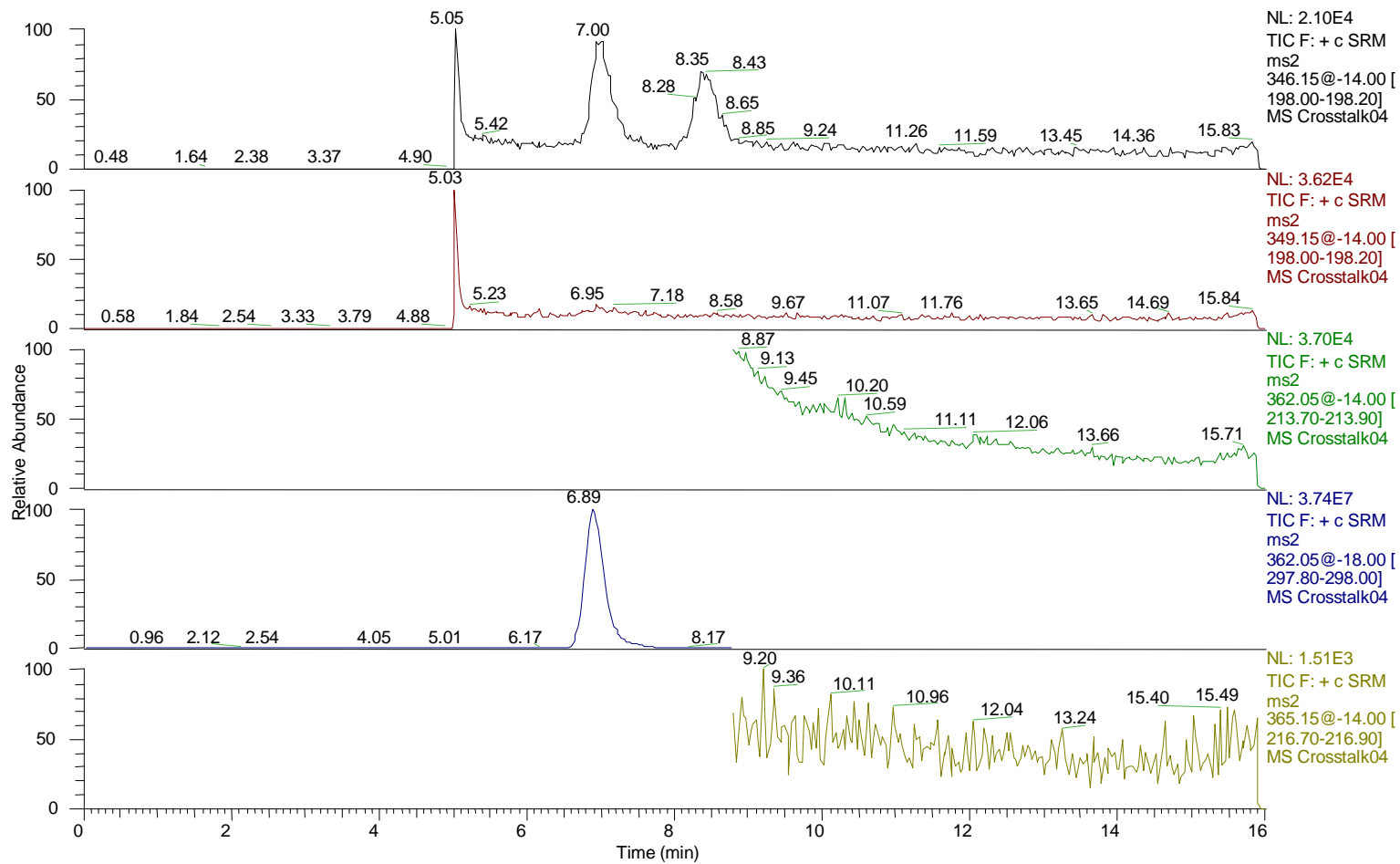


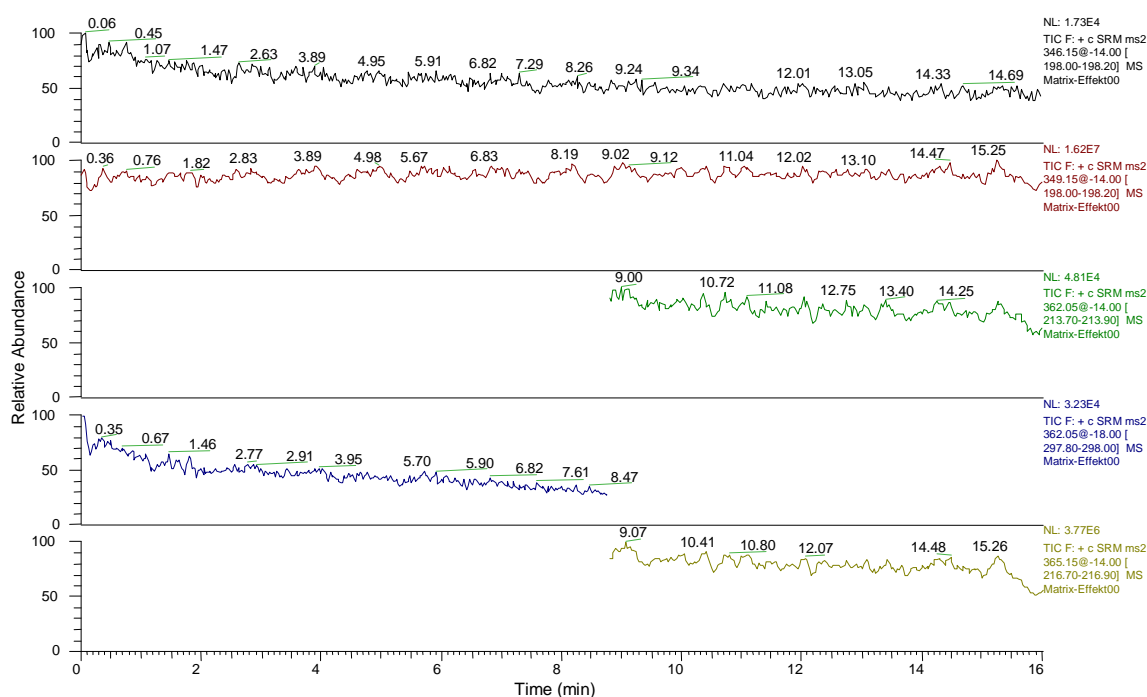
Abbildung 3-27: HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) von Omeprazol-Sulfon (10 µg/ml)

Aus Abbildung 3-25 wird ersichtlich, dass Omeprazol minimal auf die Massenspur seines deuterierten Standards überspricht sowie eine weitere Zehnerpotenz geringer auf die Massenspur von Omeprazol-Sulfon. Ferner präsentiert sich in Abbildung 3-27 ein leichtes Übersprechen von Omeprazol-Sulfon in die Massenspur des Omeprazols. Omeprazol und Omeprazol-Sulfon zeigen demnach ein vernachlässigbar kleines Übersprechen in andere Massenspuren.

Ein klares Übersprechen in beide Richtungen ist hingegen zwischen 5-Hydroxyomeprazol und seinem deuterierten Standard erkennbar. Aus Abbildung 3-26 wird deutlich, dass sich knapp 1 % des 5-Hydroxyomeprazols auf der Massenspur seines deuterierten Standards wiederfinden lassen. Des Weiteren ergab die Analyse des internen Standards (Abbildung 3-24) ebenfalls ein deutliches ca. 1 %-iges Übersprechen auf die Spur des einfach-protonierten Moleküls  $[M + H]^+$ . Diese Ergebnisse spiegeln sich in den Kalibrierfunktionen der 5-Hydroxyomeprazol-Enantiomere (Abschnitt 3.1.4.4) wider.

### 3.1.4.3 Matrixeffekte

Die Untersuchung der Matrixeffekte von Plasmaproben wurde entsprechend Abschnitt 2.4.5.2 durchgeführt. Bei der Injektion von Hexan zeigten sich, wie erwartet, keine Matrixeffekte, da keine Störsubstanzen enthalten waren (Abbildung 3-28).

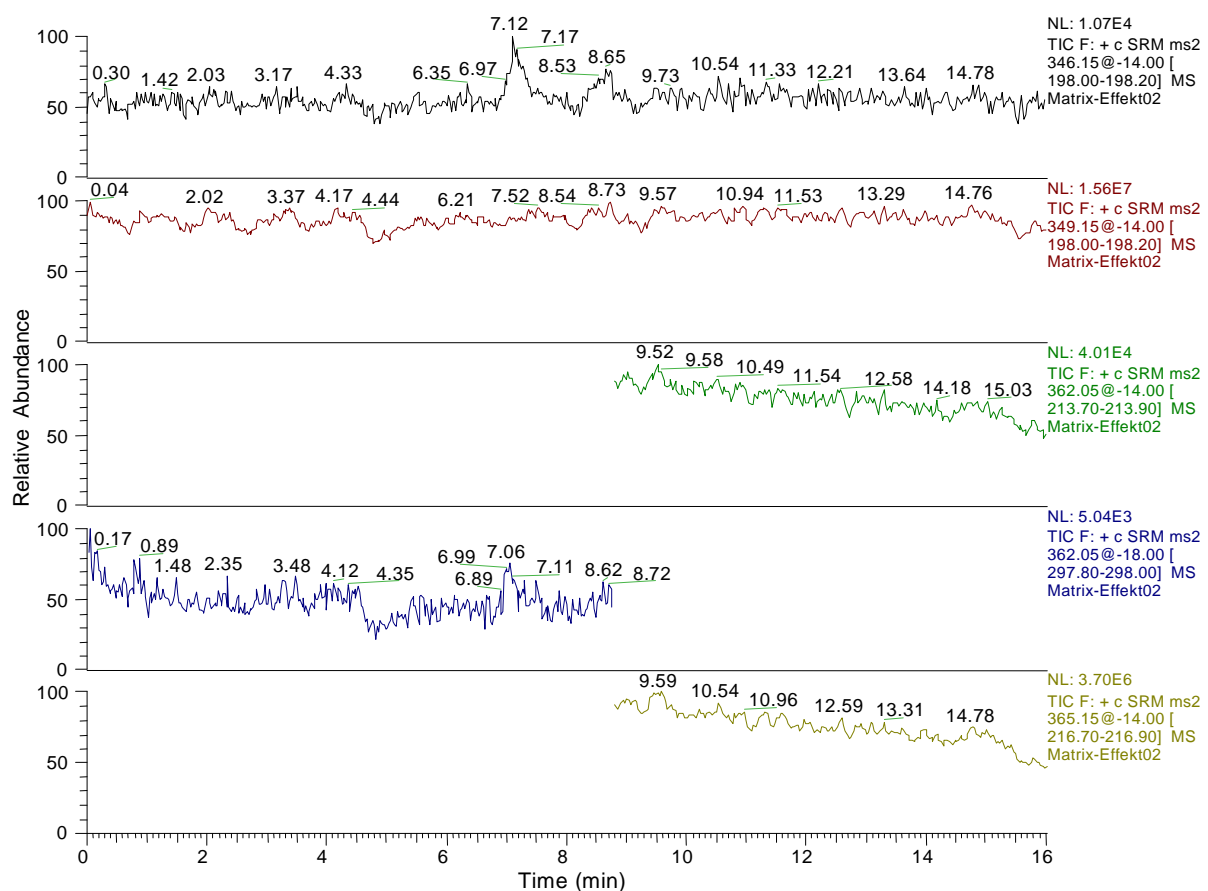


**Abbildung 3-28:** HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) zur Untersuchung eines Matrixeffektes von reinem Hexan, IS-Stammlösung (1:10 verdünnt) wurde über ein T-Stück nach der Säule zudosiert (Flussrate: 5 µl/min)

Wie durch die konstante Infusion der Substanzen in den Eluatstrom zu erwarten war, bleiben die Massenspuren der internen Standards bei gleichbleibender Intensität.

Mögliche Matrixeffekte von realen Proben wurden durch drei verschiedene, ohne internen Standard extrahierte, Leerplasma-Proben untersucht.

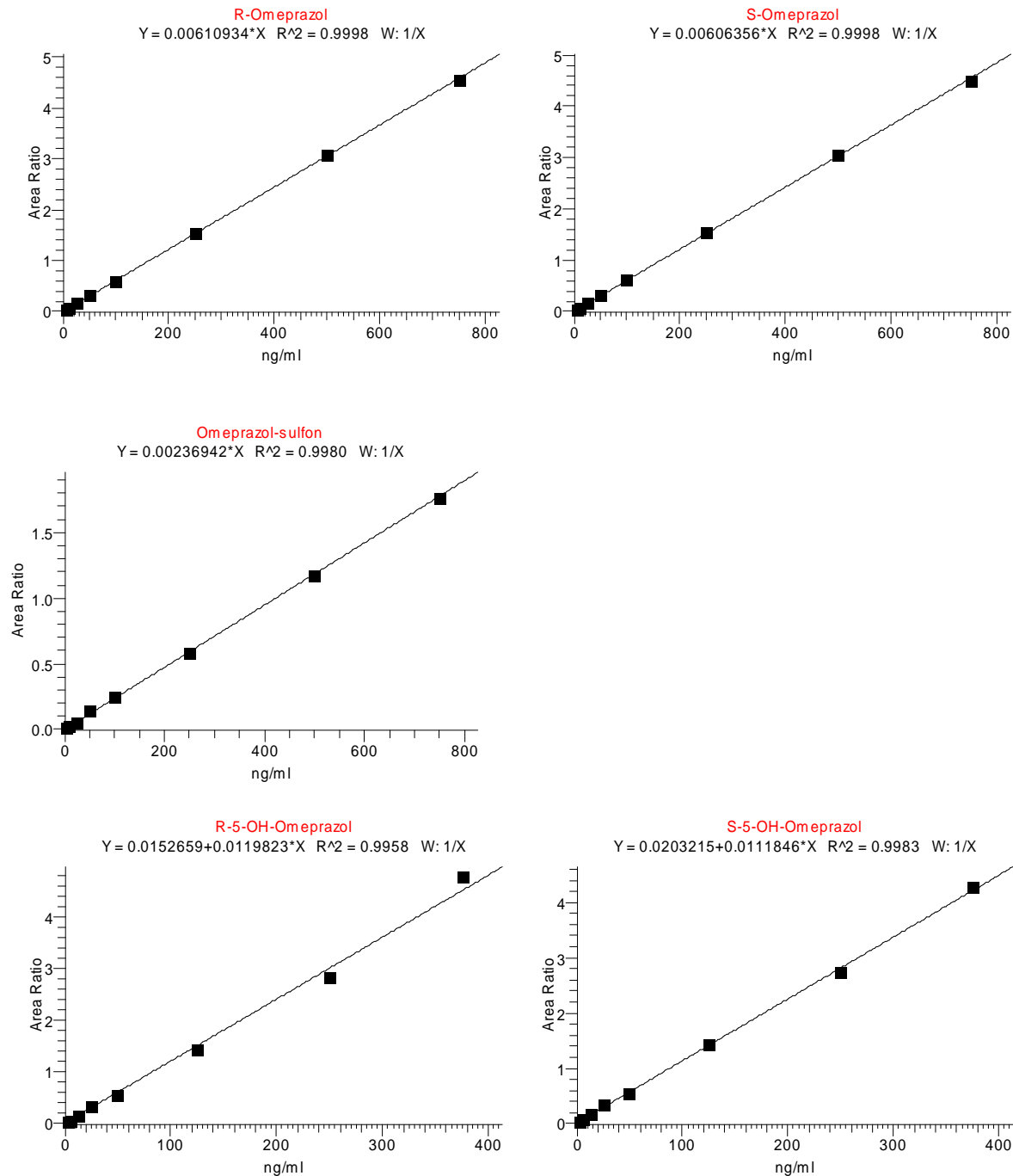
Wie in Abbildung 3-29 dargestellt, konnten keine Matrixeffekte, mit Ausnahme eines kleinen Einbruchs bei einer Retentionszeit von circa fünf Minuten, beobachtet werden. Demnach konnten unter den beschriebenen Bedingungen relative Matrixeffekte ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3-29:** HPLC-Chromatogramm (MS, APPI) zur Untersuchung eines Matrixeffektes von Leerplasma, IS-Stammlösung (1:10 verdünnt) wurde über ein T-Stück nach der Säule zudosiert (Flussrate: 5µl/min)

### 3.1.4.4 Linearität und Nachweisgrenze

Zur Methodvalidierung wurden, wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben, Kalibrierstandards aus humanem Leer-Plasma hergestellt und Kalibrierfunktionen erstellt.



**Abbildung 3-30:** typische Kalibriergeraden für R-Omeprazol, S-Omeprazol, R-5-OH-Omeprazol, S-5-OH-Omeprazol und Omeprazol-Sulfon

Wie in Abbildung 3-30 dargestellt, konnte für alle Analyten bei einer  $1/x$ -Wichtung der Datenpunkte ein linearer Verlauf der Kalibriergeraden über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet werden.

Die Kalibriergeraden von R- und S-Omeprazol sowie von Omeprazol-Sulfon verlaufen durch den Nullpunkt, wohingegen die Kalibriergeraden von R- und S-5-Hydroxy-

omeprazol einen Achsenabschnitt aufweisen. Dies ist bedingt durch das in Abschnitt 3.1.4.2 beschriebene Übersprechen zwischen 5-Hydroxyomeprazol und seinem deuterierten Standard.

Die Bestimmungsgrenze wurde als das unterste Ende des Kalibrierbereiches definiert.

Die Nachweisgrenzen dieser Methode lagen für R- und S-Omeprazol sowie für Omeprazol-Sulfon bei 0,2 ng/ml und für R- und S-5-Hydroxyomeprazol bei 1 ng/ml.

Die höheren Nachweisgrenzen für R- und S-5-Hydroxyomeprazol resultierten aus geringen Verunreinigungen des internen Standards D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol mit unmarkiertem 5-Hydroxyomeprazol. Als Folge treten kleine Peaks im Leerwert-Chromatogramm auf, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtern.

### 3.1.4.5 Präzision und Richtigkeit

**Tabelle 3-1:** Validierte Präzision und Richtigkeit aller Analyten von jeweils zehn Kontrollproben in drei verschiedenen Konzentrationen (Präzision in Serie) sowie von drei unterschiedlichen Konzentrationen an fünf verschiedenen Tagen (Wiederholpräzision)

Substanz	Präzision in Serie					Wiederholpräzision			
	Konzentration [ng/ml]	n	Mittelwert [ng/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	n	Mittelwert [ng/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
R-OME	5	10	4,79	2,17	-4,22	5	4,80	2,92	-3,98
	50	10	49,61	2,10	-0,79	5	50,62	2,52	1,24
	750	10	736,43	1,60	-1,81	5	720,02	1,66	-4,00
S-OME	5	10	5,06	1,47	1,17	5	5,05	2,99	0,92
	50	10	50,69	1,23	1,37	5	51,38	1,91	2,76
	750	10	751,60	1,41	0,08	5	729,61	2,07	-2,72
R-OH-OME	2,5	10	2,44	2,72	-2,57	5	2,49	7,00	-0,20
	25	10	24,84	1,19	-0,65	5	25,51	2,07	2,05
	375	10	362,99	1,52	-3,20	5	357,27	2,07	-4,73
S-OH-OME	2,5	10	2,49	4,21	-0,54	5	2,58	6,46	3,28
	25	10	24,97	1,00	-0,13	5	25,71	2,13	2,83
	375	10	362,48	1,33	-3,34	5	359,29	1,15	-4,19
OMES	5	10	5,12	4,18	2,36	5	5,45	5,09	9,00
	50	10	53,69	7,77	7,38	5	53,15	8,90	6,30
	750	10	811,78	5,79	8,24	5	769,54	4,32	2,60

Die Verwendung von isotopenmarkiertem R/S-Omeprazol und R/S-5-Hydroxyomeprazol als internen Standard führte zu einer sehr zuverlässigen und präzisen Quantifizierung. Für alle Analyten erfolgte die Validierung der Präzision und Richtigkeit durch Aufarbeitung und Messung von jeweils zehn Qualitätskontrollproben in drei über den Konzentrationsbereich verteilten Konzentrationen (Präzision in Serie). Ferner wurden Kontrollproben in drei unterschiedlichen Konzentrationen an fünf verschiedenen Tagen analysiert (Wiederholpräzision).

Die Daten der Variabilitäten eines Tages und der verschiedenen Tage sind in Tabelle 3-1 aufgezeigt.

Die Präzision und Richtigkeit lagen für R- und S-Omeprazol unter 5 % und für die 5-Hydroxyomeprazol-Enantiomere bei kleiner 7 %. Für Omeprazol-Sulfon wurden Werte von kleiner 8 % (Präzision in Serie) bzw. kleiner 9 % (Wiederholpräzision) erreicht, wobei hier als interner Standard D<sub>3</sub>-S-Omeprazol angewandt wurde, da beide Substanzen annähernd identische Retentionszeiten besitzen.

#### **3.1.4.6 Wiederfindung**

Die Wiederfindung von Omeprazol, 5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon wurde für jeweils zwei Konzentrationen mittels UV-Detektion ermittelt. Sie betrug für 1000 ng/ml Omeprazol 89,0 % ( $\pm 1,2$ ) bzw. 94,7 % ( $\pm 5,2$ ) für 50 ng/ml. Für Konzentrationen von jeweils 500 ng/ml 5-Hydroxyomeprazol sowie Omeprazol-Sulfon ergaben sich Wiederfindungsraten von 88,9 % ( $\pm 1,0$ ) bzw. 86,2 % ( $\pm 4,0$ ), für 25 ng/ml hingegen Werte von 95,5 % ( $\pm 4,6$ ) und 95,7 % ( $\pm 1,2$ ).

#### **3.1.4.7 Stabilität**

Leerserumproben, angereichert mit 200 ng/ml reinem S-Omeprazol, wurden hinsichtlich Ihrer Enantiomeren-Stabilität während des Extraktionsprozesses untersucht. Es wurde keine chirale Inversion von S-Omeprazol zu R-Omeprazol beobachtet. Zudem zeigten sich weder Stabilitätsprobleme innerhalb des Analysenzeitraumes für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur noch bei eingefrorenen Proben bei  $-20\text{ °C}$  über fünf Tage.

## 3.2 Anwendung der entwickelten Methode in einer Klinischen Studie

### 3.2.1 Demographische Patientencharakterisierung

Zwischen Juni 2006 und November 2008 erfolgte, wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, die Rekrutierung der Patienten durch die zuständigen Studienärzte der Gastroenterologischen-Ambulanz der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg. Die Rekrutierung für diese Studie gestaltete sich jedoch von Anfang an sehr schwierig. Die Studienteilnahme war mit zwei, für die Patienten meist abschreckend wirkenden, gastroösophagealen pH-Metriem und zudem mit einem relativ hohen Zeitaufwand verbunden. Folglich konnte die benötigte Anzahl an Studienteilnehmer mit einem eingeschränkten Metabolismus (IM, PM) nicht erreicht werden.

Von den 32 genotypisierten Patienten konnten 21 die Studie laut Protokoll beenden. Zehn Patienten brachen die Studie bereits in der Randomisierungsphase und vor dem 1. Tag der Omeprazol-Behandlung vorzeitig ab. Eine weitere Patientin musste am 1. Tag der Omeprazol-Behandlung ausgeschlossen werden, weil die Blutabnahmen wegen zu schlechten Venenverhältnissen nicht möglich waren. Alle eingeschlossenen Patienten erhielten ihre Behandlung laut randomisierter Zuteilung und wurden dementsprechend analysiert.

**Tabelle 3-2:** Patientencharakteristika (n = 21) der Gruppen EM mit 1 x 20 mg (A1), EM mit 2 x 40 mg (B2) und IM mit 1 x 20 mg (A2/B1)

	<b>A1 EM (wt/wt) 1 x 20 mg</b>	<b>B2 EM (wt/wt) 2 x 40 mg</b>	<b>A2/B1 IM (wt/wt) 1 x 20 mg</b>
<b>Anzahl</b>	8	8	5
<b>Geschlecht (w / m)</b>	4 / 4	3 / 5	2 / 3
<b>Alter [Jahre]</b>			
<b>Bereich</b>	38 – 67	51 – 68	62 – 69
<b>Median</b>	59	64	64
<b>Body Mass Index (BMI) [kg/m<sup>2</sup>]</b>			
<b>Bereich</b>	21 – 28	20 – 30	19 – 33
<b>Median</b>	26	26,8	25,7
<b>Hiatushernie (ja / nein)</b>	6 / 2	5 / 3	4 / 1
<b>LA Grad (A / B)</b>	6 / 2	3 / 5	4 / 1

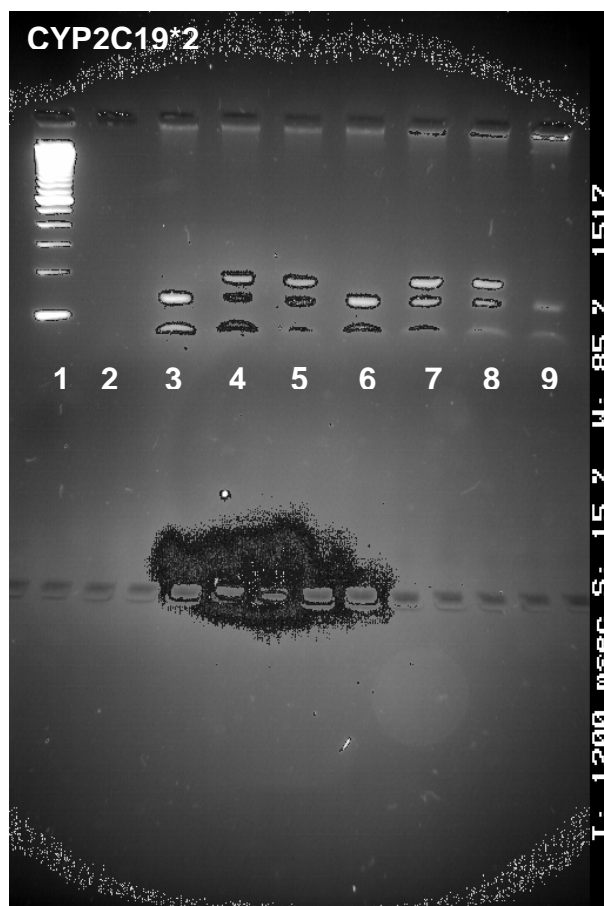
Die Tabelle 3-2 gibt die Patientencharakteristika und Gruppenverteilung aller 21 eingeschlossenen Patienten wieder. Die genauen demographischen Angaben

einschließlich des ermittelten CYP2C19-Genotyps sowie die nach der Randomisierung zugeordnete Gruppe finden sich in der Tabelle 1 im Anhang. Die Komedikation ist in Tabelle 2 im Anhang aufgeführt.

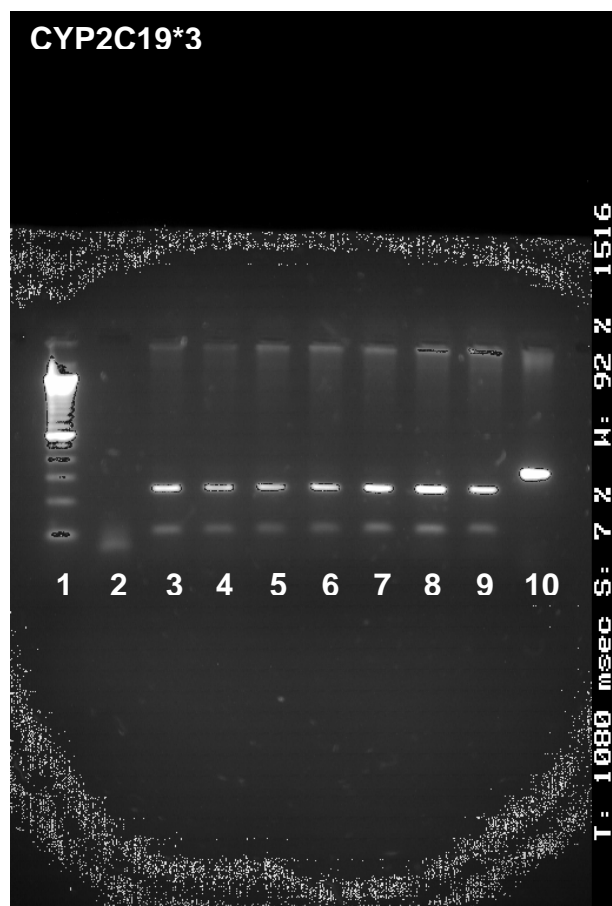
Die drei Gruppen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede im Alter, Body Mass Index (BMI) und Grad der Refluxkrankheit untersucht. In Gruppe B2 fanden sich mit 62,5 % mehr LA-B Patienten als in den anderen beiden Gruppen mit einem LA-B Anteil von 20-25 %. Die Parameter Alter ( $p = 0,4$ ) und BMI ( $p = 0,37$ ) ergaben keine signifikanten Unterschiede, so dass die drei Gruppen hinsichtlich dieser Parameter vergleichbar waren.

### 3.2.2 Genotypisierung

Insgesamt wurden 32 Patienten genotypisiert. Dabei waren bei 27 Patienten für die beiden untersuchten Polymorphismen nur die Wildtyp-Allele (wt/wt) nachweisbar.



**Abbildung 3-31:** PCR-Produkte des Enzyms CYP2C19\*2; 1: Längenstandard (100 bp Leiter, New England Biolabs), 2: Leerwert, 3: Kontrolle wt/wt, 4: Kontrolle wt/mt, 5: Patient wt/mt, 6: Patient wt/wt, 7-8: Patient wt/wt, 9: Patient wt/wt



**Abbildung 3-32:** PCR-Produkte des Enzyms CYP2C19\*3; 1: Längenstandard (100 bp Leiter, New England Biolabs), 2: Leerwert, 3-4: Kontrolle wt/wt, 5-9: Patient wt/wt, 10: ungespaltenes PCR-Produkt (entspricht erwarteter Bande eines mt/mt Patienten)



Diese Patienten trugen demnach weder das CYP2C19\*2-Allel noch das CYP2C19\*3-Allel und konnten als homozygote extensive Metabolisierer (EM) charakterisiert werden.

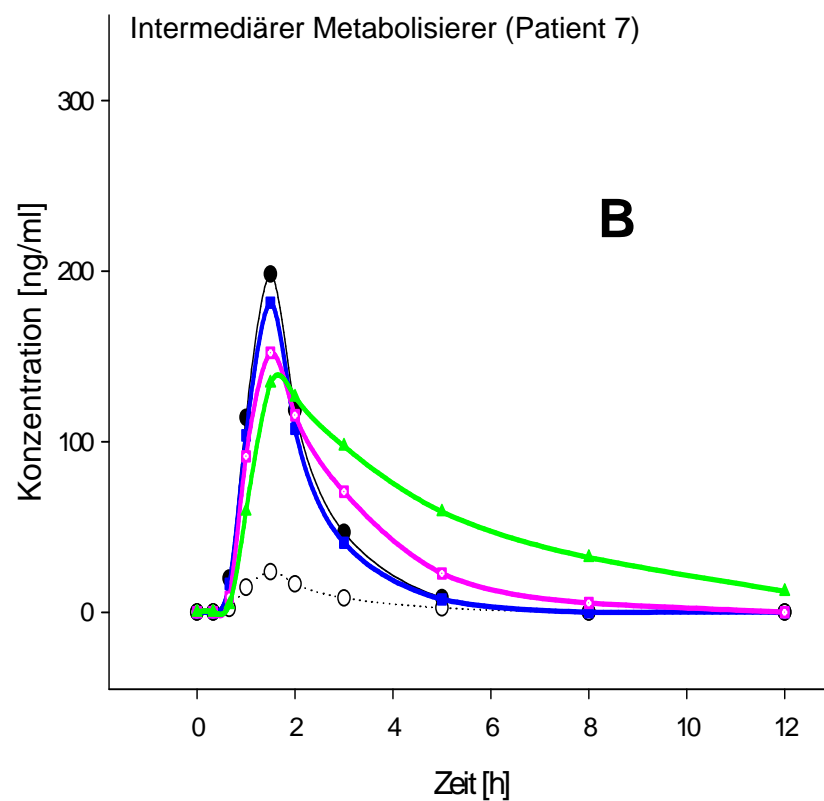
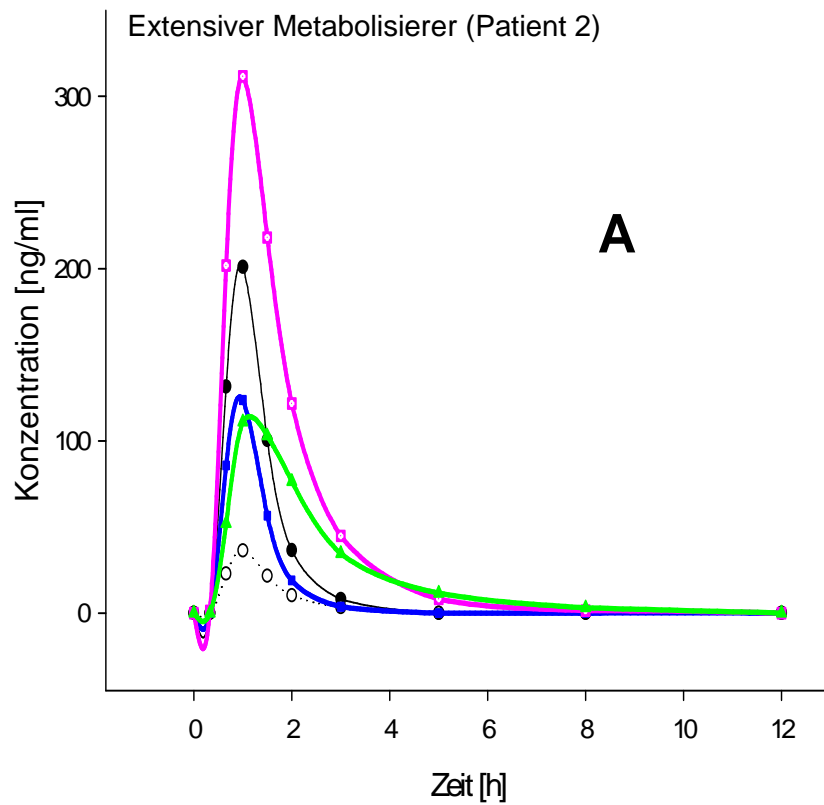
Bei den übrigen fünf Patienten war eine Heterozygotie für das CYP2C19\*2-Allel (wt/mt) nachweisbar, wobei das CYP2C19\*3-Allel nicht vorlag, sondern für diesen Polymorphismus nur das Wildtyp-Allel gefunden wurde. Somit konnten diese fünf Patienten als intermediäre Metabolisierer (IM, wt/mt) charakterisiert werden.

In Abbildung 3-31 und 3-32 sind beispielhaft die PCR-Produkte der gefundenen Genotypen nach der Restriktionsenzym-Spaltung dargestellt. Die Abbildungen veranschaulichen die unter dem Kapitel 2.5.6 beschriebenen PCR-Strategien. Bei den untersuchten Patienten konnten wie oben beschrieben jedoch lediglich die erwarteten DNA-Fragmente für die Wildtyp-Allele (wt/wt, EM) von CYP2C19\*2 und \*3 und ein mutiertes Allel (wt/mt, IM) von CYP2C19\*2 gefunden werden.

### 3.2.3 Pharmakokinetische Auswertung

Zur Erfassung der Pharmakokinetik von R- und S-Omeprazol sowie seiner Metabolite wurden die Serumproben aller 21 eingeschlossenen Patienten analysiert. Anhand ausgewählter Patienten (Abbildung 3-33) konnte man deutliche Unterschiede im Metabolisierungsmuster von EM und IM erkennen. Aus der Abbildung 3-33 geht hervor, dass die Serumkonzentration von S-Omeprazol (schwarze Kurve, Metabolisierung hauptsächlich über CYP3A4) am 1. Tag der Behandlung in beiden Patienten (Patient 2: EM und Patient 7: IM) annähernd gleich waren, wohingegen Patient 7 als IM deutlich höhere Plasmakonzentrationen von R-Omeprazol (blaue Kurve, Metabolisierung hauptsächlich über CYP2C19) erreichte. Die Konzentration von R-5-Hydroxyomeprazol (rosa Kurve) als Metabolit von CYP2C19 war beim EM (Patient 2) erwartungsgemäß deutlich höher ausgeprägt als beim IM (Patient 7). Die Omeprazol-Sulfon-Konzentration (grüne Kurve, CYP3A4-Metabolit) war hingegen beim IM höher als beim EM.

Nach der Analyse der pharmakokinetischen Daten aller Patienten (Tabelle 3-4) kamen diese Unterschiede jedoch nicht mehr zum Tragen.



**Abbildung 3-33:** Vergleich der Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von S-Omeprazol (—●—), R-Omeprazol (—■—), Omeprazol-Sulfon (—▲—), S-5-Hydroxy- (····○····) und R-5-Hydroxyomeprazol (—□—) zwischen einem Extensiven Metabolisierer (**A**) und einem Intermediären Metabolisierer (**B**) mit je 20 mg Omeprazol (Single Dose)

**Tabelle 3-3** Pharmakokinetische Daten aller Patienten

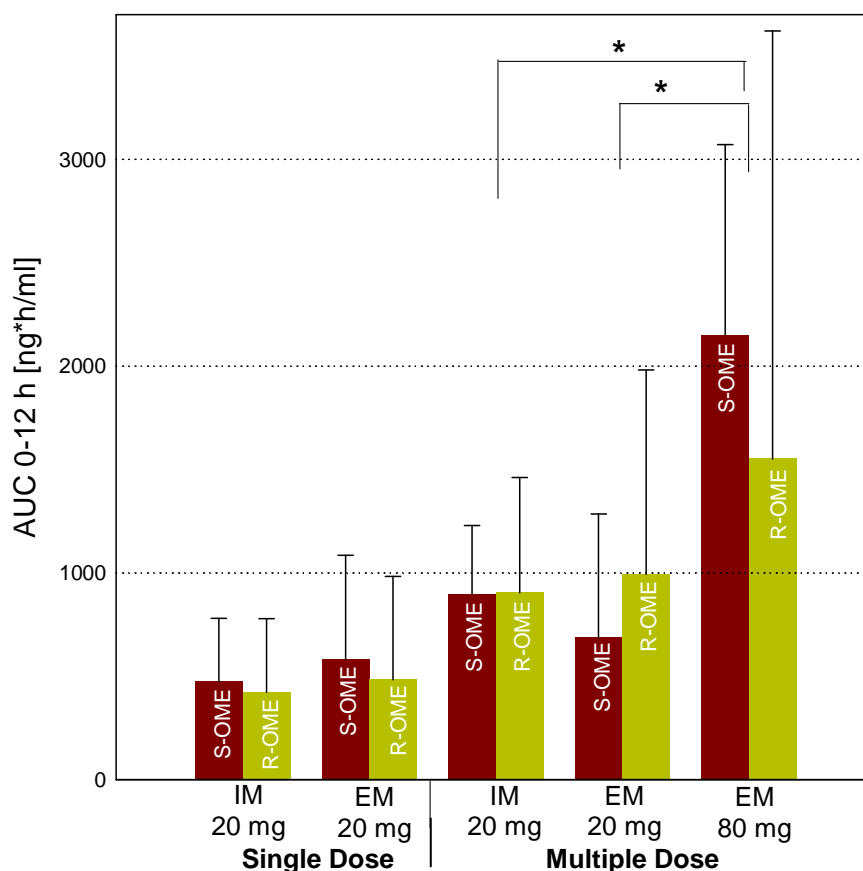
Mittelwert $\pm$ SD	Single Dose (IM, 20 mg) n = 5	Multiple Dose (IM, 20 mg) n = 5	Single Dose (EM, 20 mg) n = 8	Multiple Dose (EM, 20 mg) n = 8	Single Dose (EM, 40 mg) n = 8	Multiple Dose (EM, 80 mg) n = 8
<b>S-Omeprazol (CYP3A4)</b>						
t 1/2 [h]	1,2 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4
AUC (12h) [ng*h/ml]	475 $\pm$ 305	898 $\pm$ 331	582 $\pm$ 503	685 $\pm$ 600	1356 $\pm$ 1539	2151 $\pm$ 920
Cmax [ng/ml]	228 $\pm$ 112	319 $\pm$ 115	255 $\pm$ 241	336 $\pm$ 208	353 $\pm$ 307	787 $\pm$ 395
<b>R-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	1,1 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,7
AUC (12h) [ng*h/ml]	422 $\pm$ 357	903 $\pm$ 558	482 $\pm$ 502	994 $\pm$ 987	1552 $\pm$ 2069	2390 $\pm$ 1514
Cmax [ng/ml]	200 $\pm$ 118	300 $\pm$ 121	200 $\pm$ 219	296 $\pm$ 220	312 $\pm$ 351	765 $\pm$ 406
<b>Omeprazolsulfon (CYP3A4)</b>						
t 1/2 [h]	4,8 $\pm$ 2,8	5,0 $\pm$ 2,3	2,8 $\pm$ 1,8	3,5 $\pm$ 2,0	3,5 $\pm$ 3,5	5,6 $\pm$ 3,5
AUC (12h) [ng*h/ml]	861 $\pm$ 672	1709 $\pm$ 1013	1061 $\pm$ 1628	1182 $\pm$ 1249	1528 $\pm$ 3050	5350 $\pm$ 4420
Cmax [ng/ml]	119 $\pm$ 81	165 $\pm$ 42	111 $\pm$ 82	140 $\pm$ 82	173 $\pm$ 170	415 $\pm$ 173
<b>S-5OH-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	1,4 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,6
AUC (12h) [ng*h/ml]	50 $\pm$ 19	74 $\pm$ 14	65 $\pm$ 25	71 $\pm$ 22	153 $\pm$ 99	189 $\pm$ 62
Cmax [ng/ml]	22 $\pm$ 11	23 $\pm$ 9	29 $\pm$ 12	31 $\pm$ 8	41 $\pm$ 14	53 $\pm$ 24
<b>R-5OH-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	2,2 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,9
AUC (12h) [ng*h/ml]	403 $\pm$ 109	475 $\pm$ 87	534 $\pm$ 104	520 $\pm$ 79	1101 $\pm$ 399	1039 $\pm$ 323
Cmax [ng/ml]	148 $\pm$ 67	128 $\pm$ 61	229 $\pm$ 76	210 $\pm$ 74	315 $\pm$ 143	264 $\pm$ 143

Die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Parameter ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen IM und EM mit gleicher Dosierung. Jedoch ließ sich eine leichte Tendenz ( $p = 0,051$ ) eines Unterschieds für die AUCs<sub>1-12h</sub> des CYP2C19-Metabolits R-5-Hydroxyomeprazol am 1. Behandlungstag zwischen IM und EM erkennen. Dabei erreichte die Gruppe der EM höhere R-5-Hydroxyomeprazol-Serumkonzentrationen als die Gruppe der IM.

Der Vergleich der AUCs<sub>1-12h</sub> zwischen IM sowie EM mit 20 mg Omeprazol und EM mit 2 x 40 mg Omeprazol nach 14-tägiger Behandlung (multiple dose) ergab signifikante

Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sowohl bei R- als auch bei S-Omeprazol (Abbildung 3-34). Dies war, bedingt durch die deutlich höhere Dosierung von Omeprazol, nicht unerwartet. Die  $AUC_{0-12h}$  von R- und S-Omeprazol nach der einmaligen Behandlung von 20 mg bzw. 40 mg unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander.

Die mittlere Halbwertszeit (HWZ) für Omeprazol betrug am 1. Behandlungstag 1,2 h und nach 14-tägiger Behandlung 1,5 h. Dabei wurden maximale Plasmakonzentrationen durchschnittlich nach 2,25 h erreicht. Auffällig war, dass Omeprazol-Sulfon mit einer durchschnittlichen HWZ von 4,6 h deutlich langsamer metabolisiert wurde als Omeprazol und 5-Hydroxyomeprazol (mittlere HWZ 1,7 h).

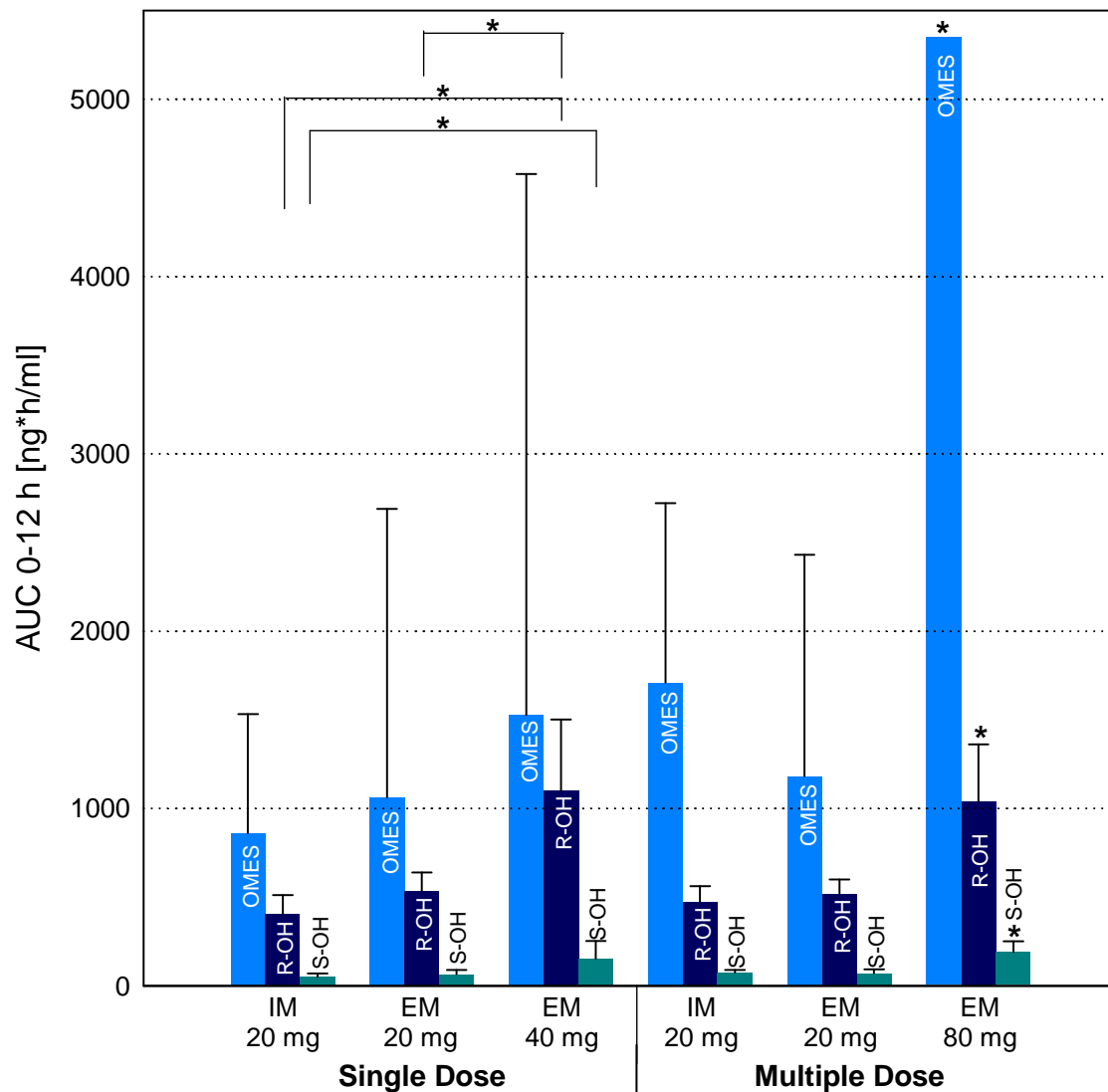


**Abbildung 3-34:** Mittlere AUCs (12 h) von S- (■) und R-Omeprazol (■) bei IM, EM (20 mg) nach Einmalgabe (Single Dose) von Omeprazol sowie von S- (■) und R-Omeprazol (■) bei IM, EM (20 mg) und EM (2 x 40 mg) nach 14-tägiger Omeprazol-Behandlung (Multiple Dose),  
\* signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) nach 14-tägiger Behandlung zwischen S-, R-Omeprazol 20 mg (EM, IM) und S-, R-Omeprazol 80 mg (EM)

Ferner nahmen die Serumkonzentrationen und somit auch die Bioverfügbarkeiten von S- und R-Omeprazol vom 1. Tag der Behandlung bis zum 15. Tag der Behandlung deutlich zu.

Die Analyse der AUCs der Metabolite von Omeprazol (Abbildung 3-35) erbrachte im Vergleich der Dosierung von 20 mg (sowohl EM als auch IM) zu 2 x 40 mg Omeprazol

nach 14-tägiger Behandlung erwartungsgemäß signifikante Unterschiede zwischen allen untersuchten Metaboliten. Ferner wurde deutlich, dass die AUC von Omeprazol-Sulfon deutlich höheren interindividuellen Schwankungen unterworfen war als die von 5-Hydroxyomeprazol.



**Abbildung 3-35:** Mittlere AUCs (12h) von OMES (■), R-OH-OME (■) und S-OH-OME (■) bei IM, EM (20 mg) und EM (2 x 40 mg) nach Einmalgabe (Single Dose) und 14-tägiger Omeprazol-Behandlung (Multiple Dose); die SD von OMES (EM 80 mg) beträgt 4420,1 ng\*h/ml (graphisch nicht dargestellt);

\* signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen R-OH-OME 20 mg (EM,IM) und EM 40 mg Single Dose sowie zwischen S-OH-OME IM 20 mg und EM 40 mg Single Dose, ferner bestehen signifikante Unterschiede bei allen Metaboliten zwischen der 14-tägigen Behandlung mit 20 mg Omeprazol (IM,EM) und der Dosierung von 80 mg Omeprazol

Am 1. Tag der Omeprazol-Behandlung konnten zwischen 20 mg und 40 mg Omeprazol nicht für alle Metabolite signifikante Unterschiede in der  $AUC_{1-12h}$  gefunden werden. So unterschieden sich, wie in Abbildung 3-35 dargestellt, nur

R-5-Hydroxyomeprazol signifikant ( $p < 0,05$ ) sowie S-5-Hydroxyomeprazol, dieses jedoch nur in der Gruppe der IM.

Auffällig war, dass die AUC von R- und S-5-Hydroxyomeprazol nach der 14-tägigen Behandlung in allen Gruppen annähernd dem Ausgangsniveau entsprach. Dagegen gab es außer bei den EM mit 20 mg Omeprazol einen deutlichen Anstieg der AUC von Omeprazol-Sulfon während der Behandlung.

### Korrelation des Geno- und Phänotyps

Die Aktivitäten und damit die Phänotypen von CYP2C19 und CYP3A4 wurden anhand der unter Abschnitt 2.5.10 aufgeführten Gleichungen 2-4 und 2-5 berechnet.

**Tabelle 3-4** CYP2C19- und CYP3A4-Aktivität aller Patienten am 1. und 15. Tag der Behandl. (entsprechend Gleichung 2-4 und 2-5), in Fett- und Kursivdruck hervorgehoben sind EM (genotypisch), die phänotypisch eher einem IM entsprechen, fehlende Werte (-) sind bedingt durch Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze

Patient/ Genotyp (OME)	CYP2C19-Aktivität 1. Tag	CYP2C19-Aktivität 15. Tag	CYP3A4-Aktivität 1. Tag	CYP3A4-Aktivität 15. Tag
01 / EM (20 mg)	1,09	2,87	2,06	1,38
02 / EM (20 mg)	0,24	0,58	1,28	1,45
06 / EM (20 mg)	0,78	0,51	-	1,7
09 / EM (20 mg)	<b>3,63</b>	<b>6,69</b>	1,80	1,67
16 / EM (20 mg)	0,71	1,80	1,24	1,01
20 / EM (20 mg)	0,77	0,67	1,01	0,84
25 / EM (20 mg)	-	0,58	-	1,22
27 / EM (20 mg)	0,47	0,20	-	1,14
<b>Mittelwert EM</b>	1,10	1,86	1,25	1,23
07 / IM (20 mg)	1,11	2,53	0,90	0,84
08 / IM (20 mg)	1,92	4,15	1,87	-
12 / IM (20 mg)	0,4	1,79	0,99	1,15
14 / IM (20 mg)	3,39	6,47	0,97	1,03
28 / IM (20 mg)	0,98	1,84	0,76	1,31
<b>Mittelwert IM</b>	1,56	3,35	1,10	1,08
03 / EM (80 mg)	0,36	1,46	1,97	1,19
04 / EM (80 mg)	0,48	3,66	1,68	0,8
13 / EM (80 mg)	0,43	1,59	-	1,08
15 / EM (80 mg)	0,51	5,76	1,09	0,86
18 / EM (80 mg)	-	8,45	-	-
21 / EM (80 mg)	0,87	1,77	1,33	-
23 / EM (80 mg)	<b>6,59</b>	<b>12,25</b>	0,76	0,55
24 / EM (80 mg)	0,83	2,28	5,62	0,88
<b>Mittelwert EM</b>	1,44	4,65	2,07	0,89

Für jeden einzelnen Patienten sind die CYP2C19- sowie die CYP3A4-Aktivitäten am 1. und 15. Omeprazol-Behandlungstag in Tabelle 3-4 dargestellt.

Anhand der ermittelten CYP2C19-Aktivitäten wird deutlich, dass die in dieser Studie genotypisch als EM für CYP2C19 charakterisierten Patienten, zu 87 % (13 von 15) auch phänotypisch als EM bezeichnet werden können. Zwei Patienten (Patient 09 und 23) dieser Gruppe sind phänotypische eher als IM einzuordnen. Bei einem dritten Patienten (Patient 18) besteht ebenfalls diese Möglichkeit. Dieser konnte jedoch wegen Analysenstörungen nicht vollständig untersucht werden.

Von fünf Patienten, welche genotypisch als IM für CYP2C19 charakterisiert werden konnten, wurden zwei (Patient 08 und 14) auch phänotypisch eindeutig als solche identifiziert. Zudem war die CYP2C19-Aktivität der Patienten 07 und 28 leicht eingeschränkt, wobei diese phänotypisch nicht zweifelsfrei als IM eingestuft werden konnten. Patient 12 wurde phänotypisch als EM charakterisiert.

Anhand der ermittelten Daten wurde deutlich, dass der CYP2C19-Genotyp IM nicht unabdingbar in einen Phänotyp mit eingeschränkter CYP2C19-Aktivität führt. Hingegen konnten die genotypisch als EM charakterisierten Patienten zu einem sehr hohen Anteil auch phänotypisch als solche charakterisiert werden.

Die ermittelten CYP3A4-Aktivitäten konnten im Vergleich aller Patienten zueinander als hoch eingestuft werden. Eine verminderte CYP2C19-Aktivität resultierte meist in einer sehr hohen CYP3A4-Aktivität. Ersichtlich ist dies zum Beispiel an den Patienten 23, 04 und 15 jeweils am 15. Tag der Behandlung. Aber auch eine eingeschränkte CYP3A4-Aktivität führte oft zu einer sehr hohen CYP2C19-Aktivität, z. B. bei den Patienten 03 und 24 am 1. Behandlungstag.

Folglich wird Omeprazol bei Minderaktivität eines Enzyms alternativ über das andere Enzym metabolisiert.

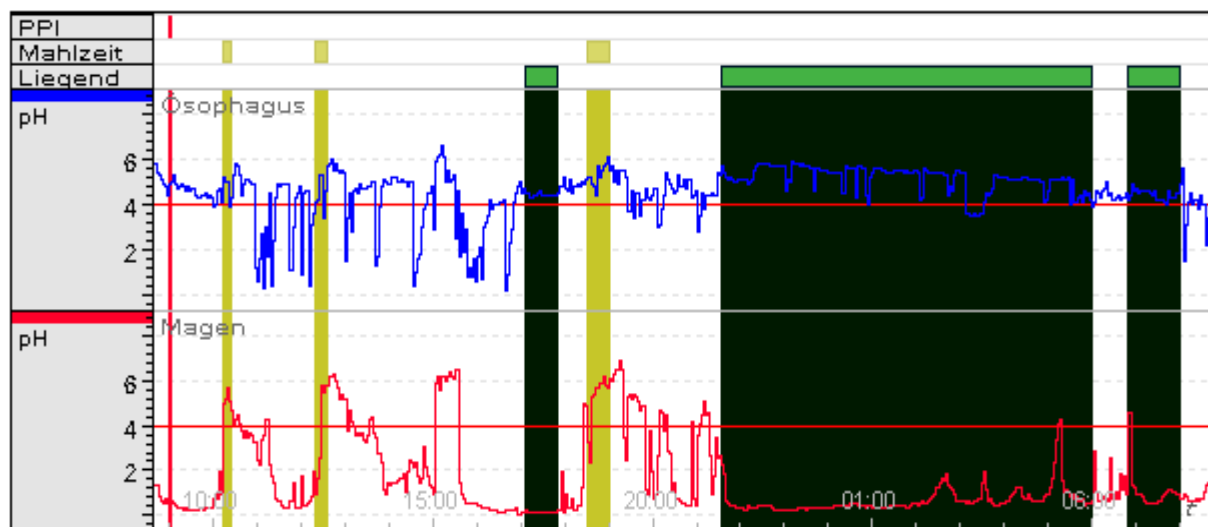
#### **3.2.4 Auswertung der 24-Stunden-pH-Metrie**

Typische pH-metrische Aufzeichnungen des Ösophagus- und Magen-pH-Wertes innerhalb einer 24-Stunden-Messung sind in Abbildung 3-36 und 3-37 gezeigt. Die Grafik beinhaltet zudem den Applikationszeitpunkt des Protonenpumpenhemmers, die Einnahme von Mahlzeiten sowie das Verharren des Patienten in liegender Position.

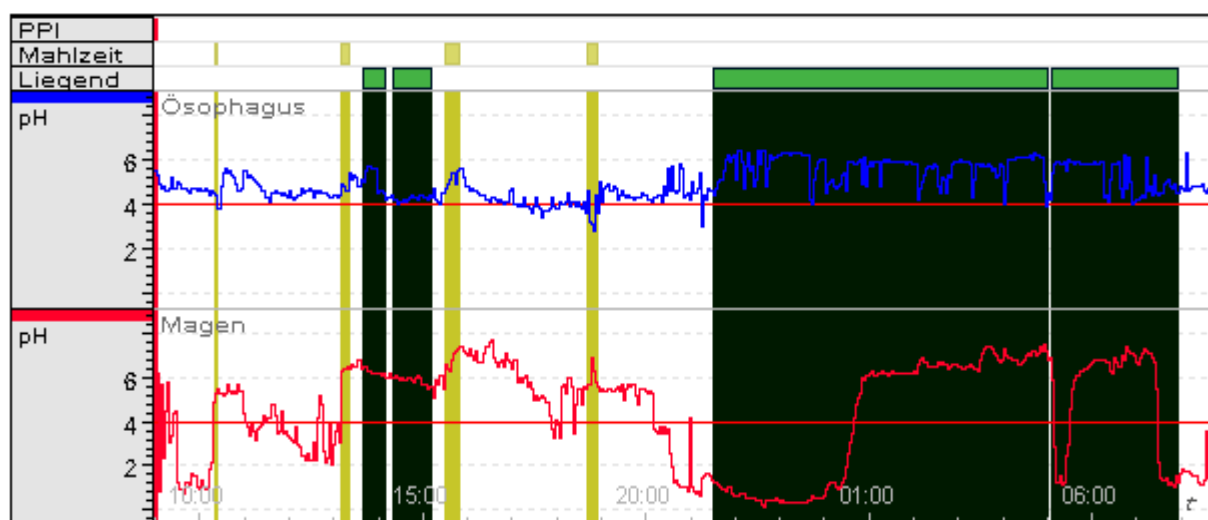
In Abbildung 3-36 ist die pH-metrische Aufzeichnung eines Patienten mit 20 mg Omeprazol täglich am 1. Tag der Behandlung und in Abbildung 3-37 nach 14-tägiger Behandlung gezeigt. Es wird deutlich, dass die Wirksamkeit von 20 mg Omeprazol am

1. Tag der Behandlung noch wenig ausgeprägt ist. Verbunden ist dies mit vielen sauren Refluxen im Ösophagus und einer geringen pH-Wert-Anhebung im Magen. Ferner wird der pH-steigernde Einfluss der Mahlzeiten veranschaulicht.

Die Steigerung der Bioverfügbarkeit von Omeprazol am 15. Tag der Behandlung wird am deutlich gesteigerten Magen-pH-Wert ersichtlich. Ferner konnte bei diesem Patienten nach 14-tägiger Behandlung eine klare Verbesserung der GERD-Symptomatik mit weitaus geringerem sauren Reflux im Ösophagus erreicht werden.



**Abbildung 3-36** pH-metrische 24-Stunden-Aufzeichnung des Ösophagus- (—) und Magen-pH-Wertes (—) von Patient 25 mit 1 x 20 mg Omeprazol am 1. Tag der Behandlung, ermittelter De Meester Score = 32,9, | Einnahme von Omeprazol, | Einnahme von Mahlzeiten, ■ Patient liegend



**Abbildung 3-37** pH-metrische 24-Stunden-Aufzeichnung des Ösophagus- (—) und Magen-pH-Wertes (—) von Patient 25 mit 1 x 20 mg Omeprazol am 15. Tag der Behandlung, ermittelter De Meester Score = 8, | Einnahme von Omeprazol, | Einnahme von Mahlzeiten, ■ Patient liegend



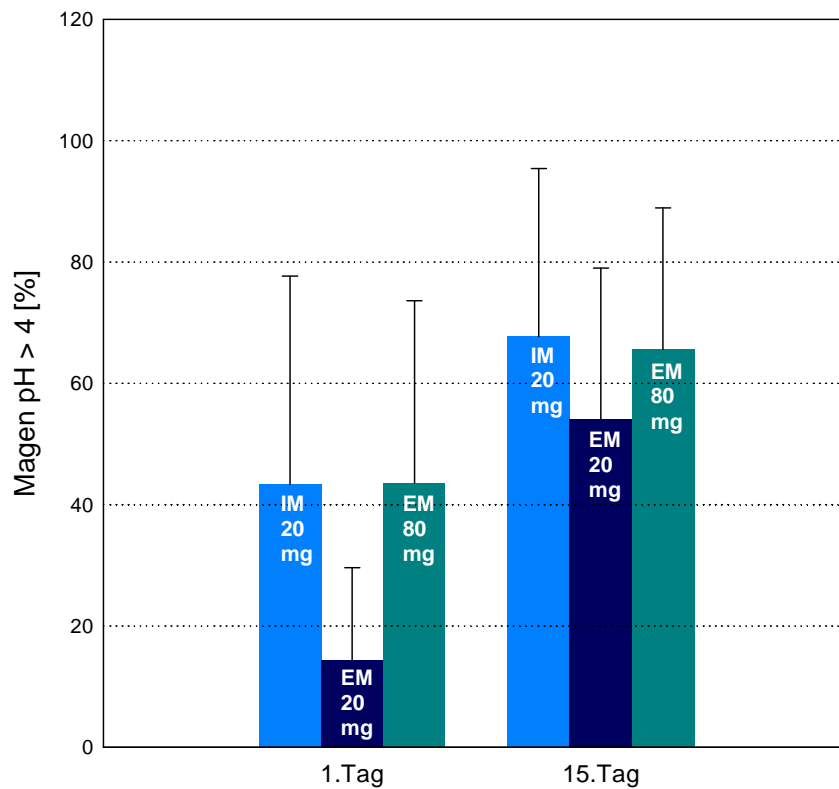
In Tabelle 3-5 sind die ermittelten pH-metrischen Daten aller Patienten zusammengefasst. Signifikante Unterschiede ( $p = 0,01$ ) zeigten sich lediglich für den Magen-pH-Wert zwischen den Gruppen der EM mit 20 mg und 2 x 40 mg am 1. Tag der Behandlung.

**Tabelle 3-5** Daten der 24-Stunden-pH-Metrie aller Patienten

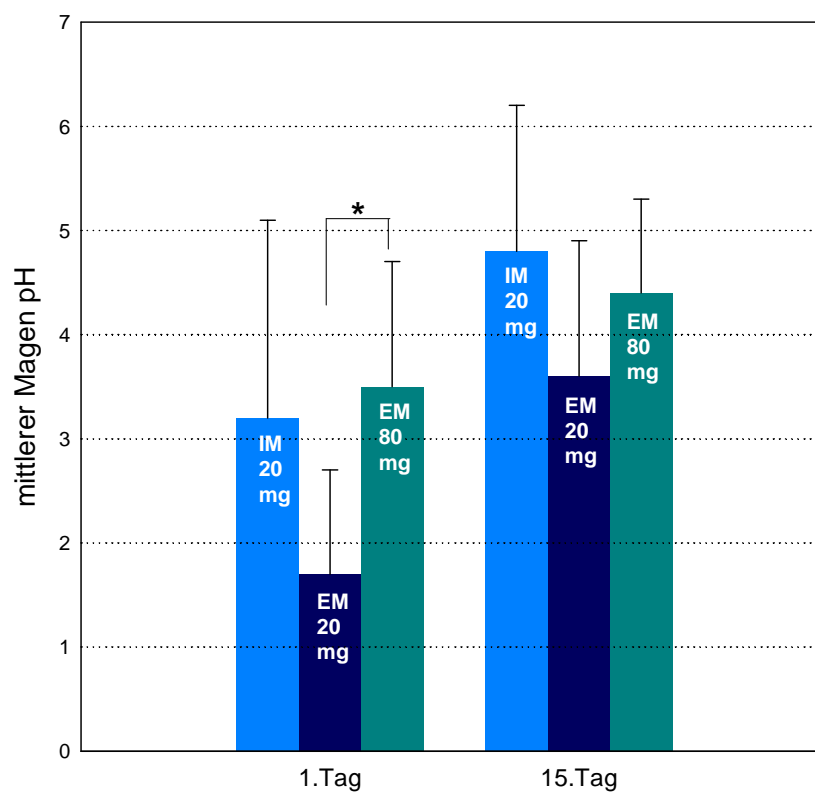
Mittelwert $\pm$ SD	IM, 1. Tag 1 x 20 mg n = 4	IM, 15. Tag 1 x 20 mg n = 5	EM, 1. Tag 1 x 20 mg n = 7	EM, 15. Tag 1 x 20 mg n = 7	EM, 1. Tag 2 x 40 mg n = 7	EM, 15. Tag 2 x 40 mg n = 8
Ösophagus pH < 4 gesamt [%]	3,9 $\pm$ 5,4	3,0 $\pm$ 2,8	14,2 $\pm$ 15,1	9,5 $\pm$ 6,7	7,9 $\pm$ 7,8	10,6 $\pm$ 9,3
Anzahl der Refluxe > 5 min	1,5 $\pm$ 1,7	1,0 $\pm$ 1,2	6,4 $\pm$ 5,5	3,7 $\pm$ 3,1	4,7 $\pm$ 6,2	5,0 $\pm$ 5,8
pH des Ösophagus	5,9 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,5	5,1 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,4
Magen pH > 4 gesamt [%]	43,3 $\pm$ 34,4	67,7 $\pm$ 27,7	14,4 $\pm$ 15,2	54,1 $\pm$ 24,9	43,6 $\pm$ 30,0	65,6 $\pm$ 23,3
pH des Magen	3,2 $\pm$ 1,9	4,8 $\pm$ 1,4)	1,7 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 1,3	3,5 $\pm$ 1,2	4,4 $\pm$ 0,9
DeMeester- Score	15,5 $\pm$ 16,4	18,5 $\pm$ 16,8	58,1 $\pm$ 60,0	49,2 $\pm$ 37,7	30,0 $\pm$ 25,9	34,9 $\pm$ 23,1

Die grafische Betrachtung des Parameters „prozentualer Magen-pH-Wert größer vier“ am 1. Tag der Behandlung ließ einen Trend zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. So erreichten die IM mit 20 mg Omeprazol und die EM mit 2 x 40 mg Omeprazol mit über 40 % durchschnittlich höhere Werte als die EM mit 20 mg Omeprazol und einem Wert von knapp 15 % (Abbildung 3-38).

Ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,01$ ) zeigte sich bei der Analyse der mittleren Magen-pH-Werte allerdings nur zwischen den Gruppen der EM mit 20 mg und 2 x 40 mg am 1. Tag der Behandlung (Abbildung 3-39). Dies ließ am 1. Behandlungstag auf eine höhere Wirksamkeit von Omeprazol bei höherer Dosierung schließen.



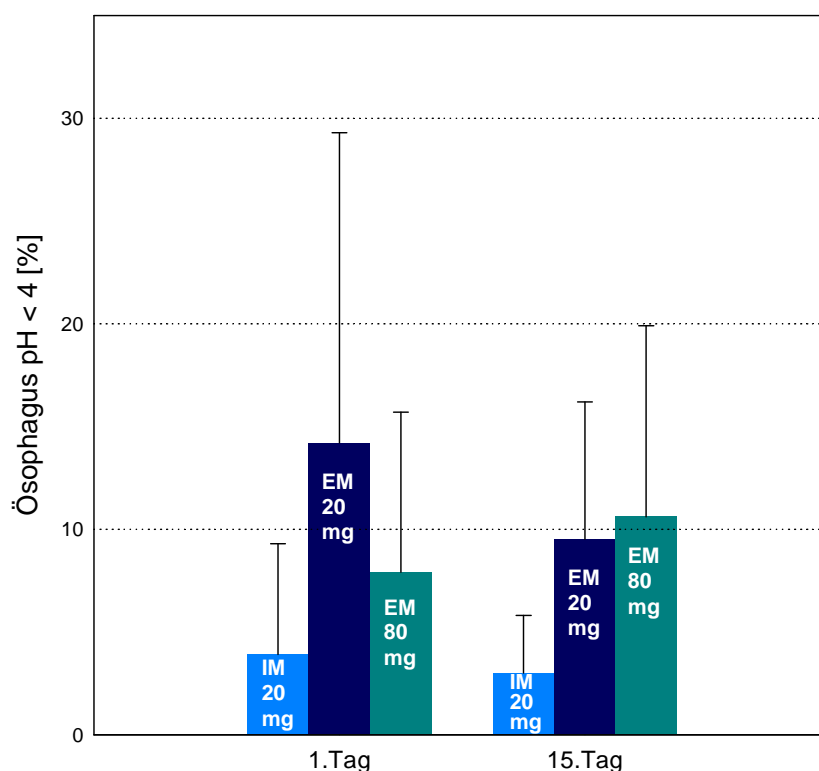
**Abbildung 3-38** Mittelwert und Streuung des prozentualen Anteils des Magen-pH-Wertes oberhalb von vier innerhalb von 24 Stunden am 1. und 15. Tag der Behandlung in den verschiedenen Gruppen (■ IM 20 mg, ■ EM 20 mg, ■ EM 80 mg)



**Abbildung 3-39** Mittelwert und Streuung des Magen-pH-Wertes am 1. und 15. Tag in den verschiedenen Gruppen (■ IM 20 mg, ■ EM 20 mg, ■ EM 80 mg)  
\* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Gruppe der EM mit 20 mg Omeprazol und der Gruppe der EM mit 2 x 40 mg Omeprazol

Die Analyse des Parameters "prozentualer Ösophagus-pH-Wert kleiner vier", welcher die ösophageale Säureexpositionszeit widerspiegelt und demzufolge ein wichtiger Parameter in der GERD-Dignostik darstellt, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ferner konnte, wie in Abbildung 3-40 dargestellt, kein wesentlicher Unterschied dieses Parameters zwischen dem 1. Tag und dem 15. Tag der Behandlung erfasst werden.

Dementsprechend scheint die deutlich verminderte intragastrale Azidität (Abbildungen 3-38, 3-39) nicht zwingend mit einer Verminderung der ösophagealen Säureexpositionszeit verbunden zu sein.



**Abbildung 3-40** Mittelwert und Streuung des prozentualen Anteils des Ösophagus-pH-Wertes unterhalb von vier innerhalb von 24 Stunden am 1. und 15. Tag der Behandlung in den verschiedenen Gruppen (■ IM 20 mg, ■ EM 20 mg, ■ EM 80 mg)

### 3.3 Enantiomerenstabilität von Esomeprazol (S-Omeprazol)

Zur Überprüfung der Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol in vivo wurden drei Patienten mit dem enantioselektiven Arzneistoff Esomeprazol (S-Omeprazol) behandelt und pharmakokinetisch untersucht. Zwei der Patienten (weiblich, 55- und 70-jährig) erhielten 20 mg Esomeprazol pro Tag, der dritte Patient (weiblich, 58-jährig) hingegen 80 mg/d. Die Patienten waren hinsichtlich des Enzyms CYP2C19 EM, hatten eine GERD Grad LA-A ohne Hiatushernie und einen mittleren BMI von 27.

Die ermittelten pharmakokinetischen Daten der drei Esomeprazol-Patienten werden in der Tabelle 3-6, im Vergleich zu Patienten (EM) mit 20 mg/d Omeprazol, dargestellt.

Am 1. Tag der Behandlung konnte sowohl bei 20 als auch bei 40 mg Esomeprazol kein R-Omeprazol im Plasma der Patienten detektiert werden. Nach der 14-tägigen Esomeprazol-Behandlung ließ sich R-Omeprazol im Serum aller Patienten in sehr geringen Konzentrationen nachweisen. Ferner wurde kein oder nur sehr wenig R-5-Hydroxyomeprazol gefunden.

Folglich konnte die Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol in vivo und der enantioselektive Metabolismus von früheren Arbeiten [22] bestätigt werden.

**Tabelle 3-6** Pharmakokinetische Daten dreier Patienten unter Esomeprazol-Behandlung im Vergleich zu pharmakokinetischen Daten von Omeprazol

Mittelwert ± SD	S-OME – Single Dose (EM, 20 mg) n = 2	S-OME – Multiple Dose (EM, 20 mg) n = 2	OME- Single Dose (EM, 20 mg) n = 8	OME- Multiple Dose (EM, 20 mg) n = 8	S-OME – Single Dose (EM, 40 mg) n = 1	S-OME – Multiple Dose (EM, 80 mg) n = 1
<b>S-Omeprazol (CYP3A4)</b>						
t ½ [h]	0,9 ± 0,4	1,4 ± 0,5	0,9 ± 0,4	1,4 ± 0,5	0,9	1,3
AUC (12h) [ng*h/ml]	9334 ± 803	2233 ± 1528	582 ± 503	685 ± 600	1490	4416
Cmax [ng/ml]	552 ± 318	838 ± 32	255 ± 241	336 ± 208	839	1700
<b>R-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	0	9,9 ± 0	0,9 ± 0,5	1,4 ± 0,6	0	3,3
AUC (12h) [ng*h/ml]	0	145 ± 0	482 ± 502	994 ± 987	0	30
Cmax [ng/ml]	0	6 ± 5	200 ± 219	296 ± 220	0	6
<b>Omeprazolsulfon (CYP3A4)</b>						
t ½ [h]	2,8 ± 1,1	5,3 ± 2,0	2,8 ± 1,8	3,5 ± 2,0	2,3	5,2
AUC (12h) [ng*h/ml]	875 ± 737	1804 ± 808	1061 ± 1628	1182 ± 1249	800	4416
Cmax [ng/ml]	155 ± 80	295 ± 89	111 ± 82	140 ± 82	191	1082
<b>S-5OH-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	1,1 ± 0,4	1,8 ± 0	1,0 ± 0,4	1,7 ± 0,7	1,0	2,0
AUC (12h) [ng*h/ml]	139 ± 37	190 ± 22	65 ± 25	71 ± 22	326	430
Cmax [ng/ml]	83 ± 19	73 ± 50	29 ± 12,4	31 ± 8	154	133
<b>R-5OH-Omeprazol (CYP2C19)</b>						
t 1/2 [h]	0	4,0 ± 0	1,2 ± 0,4	1,7 ± 0,7	2,8	7,4
AUC (12h) [ng*h/ml]	0	22 ± 0	534 ± 104	520 ± 79	17	28
Cmax [ng/ml]	0	3 ± 0,6	229 ± 76	210 ± 74	3	2

### **3.4 Methodenanwendung bei der Detektion unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs) von Omeprazol / Esomeprazol**

Protonenpumpenhemmer werden unter anderem häufig bei verschiedenen säurebedingten Erkrankungen, wie gastrointestinalen Ulzerationen, der gastroösophagealen Refluxkrankheit oder dem Zollinger-Ellison-Syndrom, verordnet. Die häufigsten UAWs sind dabei Übelkeit, Unterleibsschmerzen, Diarrhöe und Kopfschmerzen. Jedoch zeigen sich mit steigendem Gebrauch auch seltenere und schwer zu diagnostizierende unerwünschte Effekte. Mit Hilfe der entwickelten Analytik konnten zwei Fälle [104-105] von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAWs) aufgeklärt werden, die in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben wurden.

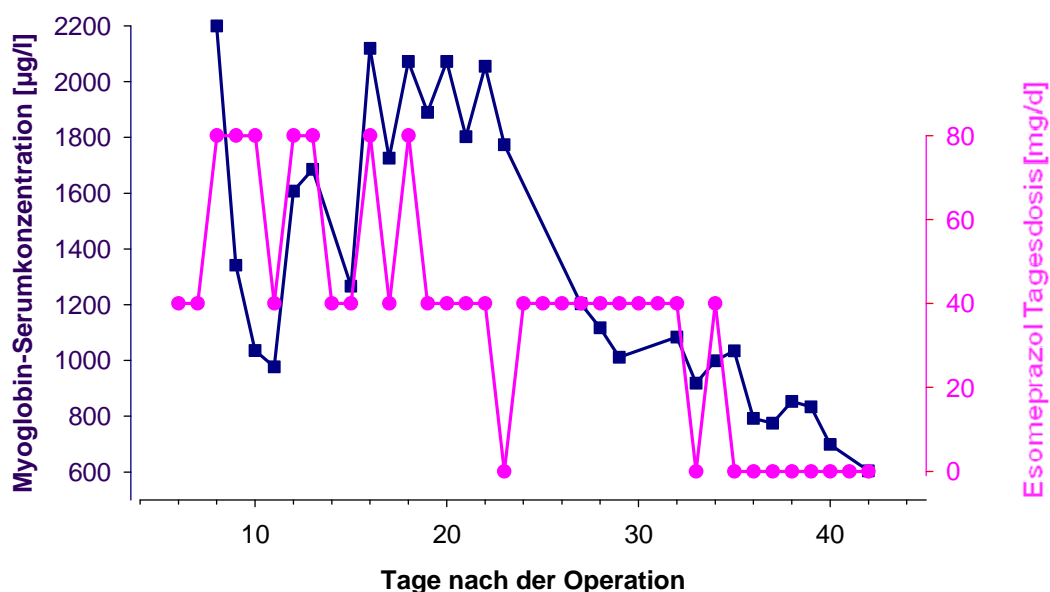
#### **3.4.1 Fall 1 – Esomeprazol-induzierte Rhabdomyolyse bei einem Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz**

Ein 75-jähriger Patient mit chronischer Herzinsuffizienz wurde nach Operationen an den Herzklappen und koronaren Bypassen postoperativ auf die kardiochirurgische Intensivstation des Universitätsklinikums Magdeburg aufgenommen. Seine Begleitdiagnosen waren Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus. Zur mechanischen Beatmung wurde er initial mit Propofol und Sufentanil sediert. Ferner wurden dem Patienten die Medikamente Insulin, Heparin (800 IE/h), Furosemid (40-120 mg/Tag), Amiodaron (36 mg/h), Meropenem (2 g/Tag) und Linezolid (1200 mg/Tag) sowie Katecholamine verabreicht. Zudem erfolgte eine Stressulkus-Prophylaxe mit intravenösem Esomeprazol (40-80 mg/Tag) und er erhielt eine kontinuierliche venovenöse Hämofiltration (CVVH) über 12 Tage.

Nach dem erfolgreichen operativen Eingriff sanken die Werte der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) sowie die Werte des C-reaktiven Proteins (CRP). Hingegen blieben die operationsbedingt erhöhten Myoglobinwerte weiterhin erhöht. Durch das Stationspersonal wurden nach Ausschluss verschiedener klinischer Ursachen die Arzneimittel Propofol und Amiodaron abgesetzt, da für diese die UAW einer Rhabdomyolyse beschrieben ist. Eine Rhabdomyolyse tritt meist als Folge einer extensiven Muskelaktivität oder eines mechanischen Traumas auf, wobei nicht-traumatische Rhabdomyolysen vielfach mit Krampfanfällen oder toxischen Arzneimittel-Reaktionen assoziiert sind [106]. Häufig findet sich bei einer Rhabdomyolyse neben einer erhöhten Temperatur sowie einem erhöhten Myoglobinwert auch eine erhöhte Kreatinkinase (CK). Dabei schließen

normale CK-Werte eine Rhabdomyolyse nicht aus. Bereits in einer früheren Studie wurden bei 17 % aller intensivmedizinischen Patienten mit bestehender Rhabdomyolyse ein isolierter Myoglobinanstieg im Serum beschrieben [107].

Trotz abgesetzter Medikamente blieb der Myoglobinwert des Patienten weiter zwischen 1000 und 2000  $\mu\text{g/l}$  (normal:  $< 72 \mu\text{g/l}$ ). Ferner waren die Körpertemperatur mit rund  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ , die Gamma-Glutamyltransferase mit 84 U/l (6-42 U/l) und die LDH mit 402 U/l (135-225 U/l) sowie das CRP mit 220 mg/l ( $< 5 \text{ mg/l}$ ) erhöht. Hingegen waren die Werte der Enzyme ALAT, ASAT und der CK im normalen Bereich.



**Abbildung 3-41:** Verlauf der Myoglobin-Serumkonzentration (—■) und der täglichen Esomeprazol Dosis (—●)

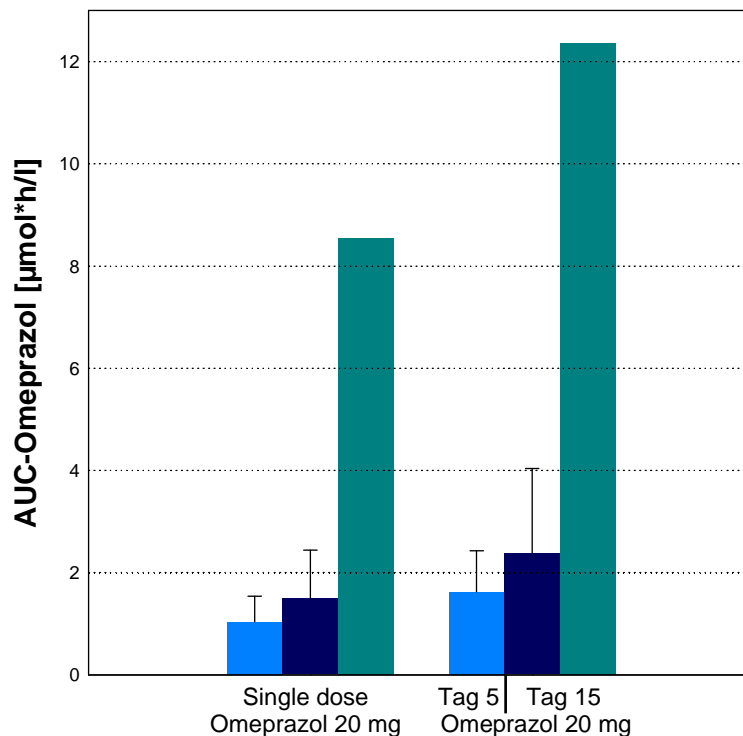
Im Rahmen einer klinisch-pharmakologischen Visite wurde der Verdacht einer arzneistoffassoziierten Rhabdomyolyse geäußert. Anhand des zeitlichen Verlaufs der UAW sowie durch Ausschlussdiagnose (u. a. schrittweises Absetzen der Komedikation) konnte Esomeprazol als auslösendes Pharmakon ermittelt werden. Das Arzneimittel wurde abgesetzt und die Esomeprazol-Serumspiegel an den folgenden Tagen bestimmt. Die berechnete Eliminationshalbwertszeit von Esomeprazol war mit 4,81 h deutlich erhöht. Einen Tag nach dem Absetzen von Esomeprazol fielen die Myoglobinwerte fortwährend (Abbildung 3-41), so dass der Patient nach weiteren acht Tagen in ein Rehabilitationszentrum verlegt werden konnte.

### **3.4.2 Fall 2 – Omeprazol-induzierter Husten bei einer Patientin mit gastroösophagealer Refluxkrankheit (GERD)**

Eine 67-jährige Nichtraucherin mit bekannter GERD mit chronischem Husten wurde für die weiterführende Diagnostik und Therapie in die gastroenterologische Ambulanz des Universitätsklinikums Magdeburg überwiesen. Anamnestisch bestand ferner eine arterielle Hypertonie. Bei ihrer ersten Vorstellung im Klinikum nahm sie regelmäßig folgende Medikamente ein: Valsartan (160 mg/Tag), Triamteren (25 mg/Tag), Hydrochlorothiazid (12,5 mg/Tag), Domperidon (10 mg/Tag), Magnesium (121,5 mg/Tag) und hochdosiertes Pantoprazol (80 mg/Tag). Ihre Laborwerte inklusive Blutparameter, Leberenzyme und Kreatininwert waren unauffällig und lagen im Normbereich. Nach diversen gastroenterologischen Untersuchungen wurde sie über die unter Abschnitt 2.5 beschriebene Studie informiert, mit dem Ziel ihre individuelle Protonenpumpenhemmer-Eliminationsleistung zu ermitteln. Nach der mündlichen und schriftlichen Aufklärung über die Studie erteilte sie ihr schriftliches Einverständnis. Pantoprazol wurde 16 Tage vor Beginn der Omeprazol-Therapie abgesetzt. Zur Kontrolle der Refluxsymptomatik erhielt die Patientin in dieser Zeit ausschließlich zweimal täglich 40 mg Famotidin. Die gastroösophageale Endoskopie am Ende der Initialphase ergab eine erosive Ösophagitis (GERD Los-Angeles-Grad B) mit Hiatushernie. Anhand der CYP2C19\*2- und \*3-Genotypisierung wurde die Patientin als extensiver Metabolisierer eingestuft und in die Kontrollgruppe mit einer Omeprazol-Behandlung von 20 mg täglich randomisiert. Am 1. und 15. Tag der Omeprazol-Behandlung wurden jeweils elf Blutproben über einen Zeitraum von 24 Stunden entnommen und Omeprazol und seine Hauptmetabolite enantioselektiv bestimmt. Des Weiteren erfolgte eine gastroösophageale 24-Stunden-pH-Metrie und die Patientin wurde gebeten, ein Patiententagebuch über ihre Beschwerden und die Omeprazol-Einnahmezeiten zu führen.

Unerwarteter Weise lagen die ermittelten Omeprazol-Plasmakonzentrationen der Patientin für einen extensiven Metabolisierer in einem sehr hohen Bereich. Sie waren vielmehr vergleichbar mit höheren Omeprazol-Dosierungen oder Werten von langsamen Metabolisierern. Die Analyse der restlichen Patientendaten ergab, dass die Plasmakonzentrationen im Vergleich zu den anderen Patienten der Kontrollgruppe (20 mg Omeprazol, n = 7) am 1. und 15. Tag der Omeprazol-Behandlung im Durchschnitt sechsfach bzw. fünffach erhöht waren. Der Vergleich der AUC mit Referenzdaten von gesunden Probanden aus der Literatur zeigte eine im Durchschnitt

fünf- bis achtfach höhere AUC bei unserer Patientin [9, 108]. Die AUCs sind unter Abbildung 3-42 dargestellt. Innerhalb von 24 Stunden lag am 15. Tag die prozentuale Zeit des Magen pH-Wertes oberhalb von vier bei 74 % und die prozentuale Zeit des ösophagealen pH-Wertes unterhalb von vier bei 11 %.



**Abbildung 3-42** Durchschnittliche Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) nach Einmalgabe (Single Dose) und wiederholter Gabe von 20 mg Omeprazol, ■ – Referenz aus der Literatur [9], ■ – Kontrollgruppe der Studie (n = 7), ■ – Patient

Innerhalb der Initialphase mit dem Arzneimittel Famotidin besserte sich der chronische Husten der Patientin, wohingegen sich die restliche GERD-Symptomatik, wie das Brennen hinterm Sternum, die epigastralen Beschwerden und die Regurgitation, verschlechterte. Nach Beginn der Omeprazol-Therapie notierte die Patientin keinerlei Beschwerden in ihr Patiententagebuch, bis sie am 7. Behandlungstag über gelegentlichen Husten berichtete. Dieser verschlimmerte sich bis zu einem persistierenden Husten am 11. Tag der Behandlung. Andere Beschwerden wurden nicht berichtet.

Trotz der, aus der zeitlich zurückliegenden Anamnese bekannten, hohen Dosen von Pantoprazol konnte bei der Patientin eine Ösophagitis diagnostiziert werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Hypersekretion an Magensäure als Folge einer Reboundreaktion nach der Beendigung einer Langzeitbehandlung mit



Protonenpumpenhemmern sein [109]. Ferner wäre ein Nichtansprechen auf Pantoprazol oder eine Ösophagitis, ausgelöst durch einen nicht-sauren Reflux, denkbar.

Nach Abschluss der Studie wurde die Patientin an ihren behandelnden Hausarzt verwiesen. Mit Bezug auf ihr inadäquates Ansprechen auf Famotidin und die hohen Omeprazol-Plasmaspiegel wurde eine Weiterführung der Therapie mit einer reduzierten Omeprazol Dosis (z. B. 20 mg Omeprazol jeden 2. Tag) empfohlen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Analytik zur Quantifizierung von Omeprazol und seiner Metaboliten

Für die simultane Quantifizierung von R- und S-Omeprazol sowie R- und S-5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon in Humanserum konnte eine ebenso robuste wie selektive LC-MS/MS-Methode entwickelt werden [110]. Im Rahmen der Methodvalidierung wurde nachgewiesen, dass das Verfahren allen Kriterien der arbeitsgruppeninternen SOP, bzw. international gültigen Richtlinien entsprach [111].

Die Wahl einer spezifischen chiralen stationären Phase für ein gegebenes chirales Trennproblem ist, infolge des oftmals rein empirischen Charakters der Enantiomerentrennung, mitnichten eine einfache Aufgabe [112]. Als erstes wurde eine HPLC-Säule im Umkehrphasen-Modus gewählt, dem gebräuchlichen Modus einer HPLC-Trennmethode, welche vermeintlich weniger Probleme bei der massenspektrometrischen Detektion verursacht. Jedoch erbrachte die gewählte Säule nicht die erhofften Ergebnisse. Problematisch erschien die Reihenfolge der S- und R-Enantiomere im Chromatogramm. Der bei den späteren Patientenproben erwartungsgemäß kleinere Peak von S-5-Hydroxyomeprazol eluierte nach dem größeren von R-5-Hydroxyomeprazol. Unter den Bedingungen einer nur schwer zu erreichenden vollständigen Basislinientrennung der Enantiomere, wäre eine saubere Integration nur schwer möglich. Folglich ließ dies auf eine schlechte Quantifizierbarkeit von S-5-Hydroxyomeprazol schließen.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde auf eine HPLC-Säule im Normalphasen-Modus zurückgegriffen und eine erfolgreiche Methode zur Quantifizierung und chiralen Trennung von Omeprazol und seiner Metabolite entwickelt. Die Erkenntnis, dass die Enantiomerentrennung von Omeprazol und 5-Hydroxyomeprazol am besten auf einer chiralen stationären Phase für Carboxylsäuren im Normalphasen-Modus funktioniert, wurde auch von früheren Arbeiten bestätigt [11, 47, 100]. Wir entschieden uns für die Trennsäule ReproSil Chiral-CA aufgrund ihrer laut Herstellerangaben bewiesenen Fähigkeit, Omeprazol-Enantiomere zu trennen sowie ihrer Robustheit gegen verschiedenste Bestandteile der mobilen Phase und ihrem relativ niedrigen Preis.

Eine Optimierung der enantioselektiven Trennung konnte erreicht werden, indem die mobile Phase aus Alkohol und Hexan bezüglich der Art und Menge des Alkohols und

dem sauren und basischen Modifier verändert wurde. Es zeigte sich, dass Isopropanol sowohl Methanol als auch Ethanol überlegen war. Ferner hatte die Wahl des basischen Modifiers einen entscheidenden Einfluss auf die Peakform.

Es ist hinlänglich bekannt, dass bei der Normalphasen-HPLC von basischen Substanzen häufig ein ausgeprägtes Peak-Tailing auftritt [113]. Verantwortlich sind die aktiven Zentren der Silanolgruppen auf der stationären Phase, welche Sekundärwechselwirkungen mit dem Analyten eingehen können. Dieses Problem kann gelöst werden, indem der mobilen Phase basische Substanzen (Modifier), z. B. Amine, zugesetzt werden [114]. Diese Substanzen haben die Aufgabe, die adsorptiven Stellen der stationären Phase abzusättigen und können auf diese Weise das Peak-Tailing effektiv reduzieren.

TEA und 1-Methylpiperidin erbrachten in unserem Fall nur eine geringe Verbesserung der Peakform, wobei der Zusatz von DEA zu annähernd tailingfreien Peaks führte.

Die Ursache ist offenbar, dass das freie Elektronenpaar am Stickstoff des DEAs weniger abgeschirmt ist als am TEA. Die aktiven Zentren der Silanolgruppen der stationären Phase können so noch effektiver abgedeckt werden.

Laufmittelgemische aus Alkoholen und Hexan, wie sie in der chiralen Normalphasen-Chromatographie verwendet werden, sind üblicherweise nicht mit der Elektrospray-Ionisation (ESI) oder der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) des Massenspektrometers kompatibel. Dies ist einerseits bedingt durch die unzureichende Ionisierbarkeit und andererseits durch die potentielle Explosionsgefahr [34, 115]. Eine nachgeschaltete Make-up Flüssigkeit, bestehend aus Alkoholen und einem wässrigen Puffer, ist eine verbreitete Abhilfemaßnahme für dieses Defizit. Allerdings ist darauf zu achten, dass die Make-up Flüssigkeit vollständig mit der mobilen Phase der HPLC mischbar ist. Des Weiteren verdünnt dies zwangsläufig die mobile Phase, welches eine Verschlechterung der Sensitivität der Methode zur Folge hat [34].

Aufgrund der erläuterten negativen Aspekte der ESI und APCI wurde für die in dieser Arbeit beschriebene Methode auf die Ionisation mittels Photonen bei Atmosphärendruck (APPI) zurückgegriffen.

Um ausreichende Ionisationseffekte zu erreichen, muss der mobilen Phase bei der APPI üblicherweise eine leicht zu ionisierende Substanz, z. B. Toluol oder Aceton, zugesetzt werden. Diese überträgt die Ladung auf die Analyten und wird als Dopant bezeichnet. Allerdings konnte von Cai et al. gezeigt werden, dass die APPI Sensitivität von Analyten weder durch Toluol noch durch Aceton verbessert werden konnte, wenn

die mobile Phase Hexan enthielt [34]. Infolge dieser Selbstionisationsfähigkeit der mobilen Phase, welche einen hohen Anteil an Hexan enthält, war kein Dopant notwendig.

Durch eine Änderung der Trenntemperatur ändern sich sowohl physikalische (z. B. die Viskosität) als auch chemisch/thermodynamische (z. B. die Sorptionsenthalpie) Eigenschaften der chromatographischen Größen. Somit kann die Trennung gezielt mit Hilfe des chromatographischen Parameters Temperatur verändert werden. [116]

Mit steigender Temperatur werden nach der van'tHoffschen Regel alle Prozesse in der Natur beschleunigt. Demzufolge ist eine höhere Temperatur mit einer schnelleren Desorption und somit schnelleren Verteilung der Substanz in die mobile Phase verbunden und führt somit zu verringerten Retentionszeiten (Steigerung der Effizienz). Zudem nimmt mit steigender Temperatur die Viskosität ab, welches eine Druckabnahme und schnellere Diffusion zur Folge hat. Diese schnellere Kinetik führt zu schärferen Peaks und einer niedrigeren Nachweisgrenze. Gleichzeitig gibt es aber auch Nachteile, die in einer höheren Belastung der Analyten und des Säulenmaterials und somit einer geringeren Lebenszeit der Säule sowie einer Verringerung der Selektivität zu sehen sind. [116]

Ferner beschrieb Karlsson et al. [11] die Säulentemperatur als einen sehr entscheidenden Faktor bei der enantioselektiven Trennung. Dabei kann bei chiralen Säulen eine Temperaturniedrigung eine geeignete Möglichkeit zur Selektivitätsverbesserung der Racemate sein.

Wir beobachteten im Rahmen der Methodenoptimierung ebenfalls eine Verbesserung der Enantiomertrennung bei einer Verminderung der Säulentemperatur von 35 °C auf 20 °C.

## **Validierung**

Der Einsatz und die Wahl eines geeigneten internen Standards sind entscheidend für eine gute Präzision und Richtigkeit einer LC-MS/MS-Methode. Zudem lassen sich mit der Verwendung eines geeigneten internen Standards auch Matrixeffekte beherrschen. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften des internen Standards sollten dem Analyten möglichst ähneln, damit sich Schwankungen bei der Probenvorbereitung und –bestimmung auf beide Substanzen gleich auswirken und somit kompensiert werden können. Dies kann ein mit stabilen Isotopen markiertes Derivat des Analyten sein, ein Strukturisomer oder irgendeine andere Substanz, die

aufgrund ihres Extraktions-, Retentions- und Ionisationsverhaltens sich nur wenig vom Analyten unterscheidet.

Als interne Standards für die HPLC-Bestimmung von Omeprazol wurden bisher entweder andere Protonenpumpenhemmer wie Lansoprazol [44], substituierte Analyten [37], strukturfremde Substanzen (Flurazepam) [38] oder deuteriertes Omeprazol [12] eingesetzt.

Das hier verwendete dreifach deuterierte Omeprazol und 5-Hydroxyomeprazol ist optimal im Bezug auf eine massenspektrometrische Detektion, da die Retentionszeiten und sonstigen physikalischen Eigenschaften mit dem nicht-deuterierten Analyten nahezu identisch sind. Dies wirkt sich positiv auf die Robustheit, Präzision und Richtigkeit der Methode aus.

Anhand der ermittelten Präzision und Richtigkeit für Omeprazol und seine Metabolite wird der Einfluss des internen Standards deutlich. Für Omeprazol-Sulfon war kein isotopenmarkiertes Pendant erhältlich. Aufgrund der annähernd identischen Retentionszeit von S-D<sub>3</sub>-Omeprazol und Omeprazol-Sulfon in unserer Methode fiel die Wahl auf diesen internen Standard. Dennoch zeichneten sich Unterschiede in Präzision und Richtigkeit ab. Die Präzision und Richtigkeit lag für R- und S-Omeprazol unter 5 % und für die 5-Hydroxyomeprazol-Enantiomere bei kleiner 7 %, wobei Omeprazol-Sulfon mit Werten von kleiner 8 % (Präzision in Serie) bzw. kleiner 9 % (Wiederholpräzision) geringfügig schlechtere Ergebnisse erreichte.

Ferner konnte anhand dieser Ergebnisse abermals die richtige Wahl für die Normalphasen-Säule bestätigt werden. Im Chromatogramm der untersuchten Säule im Umkehrphasen-Modus eluierte Omeprazol-Sulfon zu anderen Zeiten als die anderen Analyten, welches eventuell zu Problemen bei der Präzision und Richtigkeit geführt hätte.

Anhand der Nachweisgrenze der entwickelten Methode wird zudem die Bedeutung reiner interner Standards ersichtlich. Die Nachweisgrenzen lagen für R- und S-Omeprazol sowie für Omeprazol-Sulfon bei 0,2 ng/ml und für R- und S-5-Hydroxyomeprazol bei 1 ng/ml. Die höheren Nachweisgrenzen für R- und S-5-Hydroxyomeprazol resultierten aus geringen Verunreinigungen des internen Standards D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol mit unmarkiertem 5-Hydroxyomeprazol, welches zu kleinen Peaks im Blind-Chromatogramm führte.

Bedingt durch das Übersprechen des internen Standards D<sub>3</sub>-5-Hydroxyomeprazol in die Massenspur von 5-Hydroxyomeprazol weisen die Kalibriergeraden von R- und

S-5-Hydroxyomeprazol einen Achsenabschnitt auf und verlaufen nicht durch den Nullpunkt. Für die Quantifizierung ergeben sich daraus jedoch keine Probleme. Auch bei unbekanntem Probenanteil gelangt der gleiche Anteil zusätzlich zum Ergebnis und führt somit wiederum zu richtigen Ergebnissen.

Wie oben beschrieben, konnten mit dieser Methode sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden. Bisher beschrieben nur Kanazawa et al. [17] und Karlsson et al. [11] Analysen, um sowohl Omeprazol als auch 5-Hydroxyomeprazol enantioselektiv zu trennen. Bei Karlsson et al. stand vor allem die Optimierung der chiralen Trennung im Vordergrund, wobei die Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten eine untergeordnete Rolle spielte, nicht validiert wurde und somit keine Nachweisgrenzen lieferte. Kanazawa et al. [17] führten keine vollständige Validierung der Methode in biologischen Flüssigkeiten durch, ermittelten jedoch eine Nachweisgrenze für Omeprazol bei massenspektrometrischer Bestimmung von 2,7 ng.

Die Stabilität der Analyten über mehrere Monate in verschiedenen Medien, wie Methanol, basischen Puffern und Leerplasma bei  $-20\text{ °C}$  konnte bereits von anderen Arbeiten [40-41] bestätigt werden und wurde daher nicht erneut untersucht.

Ferner konnte die Stabilität von Omeprazol in Leerplasma bei Raumtemperatur über mindestens vier Tage sowie die Stabilität während eines wiederholten Einfrier- und Auftauprozesses und die Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol ebenfalls von anderen Autoren bestätigt werden [12].

## 4.2 Anwendung der entwickelten Methode

Die schnellen Fortschritte bei der Entschlüsselung und Erforschung genetischer Informationen haben die Pharmakogenetik zu einem wichtigen Zweig der medizinischen, pharmazeutischen und molekularbiologischen Wissenschaft werden lassen. Sie verfolgt das Ziel, für jeden einzelnen Patienten und seine individuelle genetische Ausstattung eine individualisierte Pharmakotherapie zu finden. Dabei sollen das Ansprechen auf die Therapie verbessert und unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduziert werden. Der Therapieansatz der personalisierten Medizin ist sehr attraktiv und weckt hohe Erwartungen, wobei der klinische Nutzen in vielen Fällen noch nicht eindeutig belegt ist. Es existieren vor allem pharmakogenetische Studien, die den Einfluss von Genmutationen auf pharmakokinetische Parameter zeigen [117-119]. Der Nutzen für den einzelnen Patienten lässt sich aber nur mit prospektiven, kontrollierten Studien ermitteln, die bisher jedoch weitestgehend fehlen [120-121].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte prospektive, kontrollierte Studie konnte zeigen, dass die pharmakogenetische Diagnostik für sich in den meisten Fällen nicht ausreichte, die optimale Dosis für den einzelnen Patienten zu finden. Aufschlussreicher waren vielmehr die pharmakokinetischen Daten der einzelnen Patienten. Zum Beispiel konnten trotz niedriger Omeprazol-Dosierungen und der Charakterisierung als EM teilweise hohe Omeprazol-Plasmakonzentrationen gefunden werden.

Es wird deutlich, dass der Genstatus nicht allein für die interindividuelle Variabilität verantwortlich ist. Vielmehr spielen weitere Faktoren, wie z. B. das Alter, die Nieren- und Leberfunktion, das Körpergewicht, Arzneimittelinteraktionen sowie krankheitsspezifische Besonderheiten eine entscheidende Rolle [54].

Auch andere Autoren konnten zeigen, dass pharmakogenetische Tests zwar einige aber bei weitem nicht alle unerwünschten Arzneimittelwirkungen verhindern können [122].

Folglich ist ein sorgfältiges sowie vielfältiges klinisches Monitoring, u. a. mittels TDM, bedeutsam für eine verbesserte Therapie.

### 4.2.1 Rekrutierung

Die laut Studienprotokoll geplanten 32 Patienten konnten nicht rekrutiert werden.

Anhand der vor Studienbeginn durchgeführten Literaturrecherchen und Abschätzung war mit einer höheren Zahl an eingeschränkten Metabolisierern (IM, PM) gerechnet worden. Diese Patientengruppe konnte im klinischen Alltag des Universitätsklinikums Magdeburg jedoch nur vereinzelt gefunden werden. Eine mögliche Ursache könnte ein Einweisungs-Bias sein. Denkbar wäre, dass die Patienten mit eingeschränktem Metabolismus (IM, PM) bereits von den niedergelassenen Ärzten erfolgreich und deutlich häufiger mit der kleinsten Standarddosierung einstellbar sind. Folglich würden der gastroenterologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Magdeburg vor allem schwer behandelbare Fälle zugewiesen, die eventuell ihre Medikamente zu schnell metabolisieren und vor allem zu den EM zählen.

Aufgrund des Mangels an Patienten mit eingeschränktem Metabolismus konnte der laut Studiendesign beschriebene Vergleich zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe nicht durchgeführt werden. Alternativ wurde ein Vergleich zwischen EM und IM mit einer Dosierung von 20 mg Omeprazol sowie den EM mit hoher Dosierung von 2 x 40 mg Omeprazol angestrengt.

Wie erwartet, konnten im Rahmen der Genotypisierung die meisten Patienten als Träger von zwei Wildtyp-Allelen (EM) charakterisiert werden. Bei rund 84 % wurden zwei aktive Allele und damit der Extensive-Metabolisierer-Status nachgewiesen. Zu der Gruppe der IM mit einem aktiven CYP2C19-Allel gehörten knapp 16 % der Studienteilnehmer. Der Poor-Metabolisierer-Status mit zwei defizienten Allelen konnte bei keinem Studienpatienten gefunden werden. Populationsstudien an kaukasischen Bevölkerungsgruppen ergaben für die drei Mendelschen Genotypen eine Frequenz von 73 % für EM, 26 % für IM und 2,1 % für PM [61]. Die Frequenz der CYP2C19-Genotypen unserer Studie unterschied sich damit deutlich von der in der kaukasischen Bevölkerung. Ursächlich könnte der schon zuvor ausgeführt Einweisungs-Bias sein.

Bei unseren Studienpatienten ließ sich lediglich das CYP2C19\*2-Allel finden. Das Allel CYP2C19\*3 war hingegen nicht vertreten. Dieses Ergebnis war nicht verwunderlich, da bei 85 % aller kaukasischen PM das Allel CYP2C19\*2 homozygot vorliegt. Die Allele CYP2C19\*3 bis \*8, welche ebenfalls mit einer herabgesetzten Enzymaktivität assoziiert sind, kommen dagegen in der kaukasischen Population extrem selten vor. [5]



#### 4.2.2 Pharmakokinetische und Pharmakodynamische Untersuchungen

Betrachtungen ausgewählter Patienten ließen deutliche Unterschiede im Metabolisierungsmuster zwischen Patienten mit schnellem Metabolismus (EM) und eingeschränktem Metabolismus (IM) erkennen. Hingegen unterschieden sich die pharmakokinetischen Parameter zwischen der gesamten Gruppe der IM und der Gruppe der EM mit gleicher Dosierung nicht signifikant. Dies könnte unter anderem der kleinen Patientenzahl bei gleichzeitig auftretenden großen interindividuellen Schwankungen geschuldet sein. Zudem besitzen IM neben dem polymorphen Allel ein funktionsfähiges Allel, welches den Defekt in einem gewissen Rahmen ausgleichen kann.

Nach der 14-tägigen Omeprazol-Behandlung ergaben sich signifikante Unterschiede der AUCs von R- und S-Omeprazol sowie deren Metabolite zwischen den Gruppen mit niedriger Dosierung (IM, EM; 20 mg Omeprazol) und hoher Dosis (EM; 2 x 40 mg Omeprazol). Dies war aufgrund der deutlich höheren Dosierung nicht unerwartet. Hingegen konnten am 1. Tag der Behandlung zwischen 20 mg und 40 mg Omeprazol nur für einige Metabolite signifikante Unterschiede in der  $AUC_{1-12h}$  gefunden werden. So unterschieden sich nur R-5-Hydroxyomeprazol signifikant sowie S-5-Hydroxyomeprazol, dieses jedoch nur in der Gruppe der IM. R- und S-Omeprazol sowie der Metabolit Omeprazol-Sulfon unterschieden sich dagegen noch nicht signifikant. Gründe für dieses Phänomen könnten die zu diesem Zeitpunkt geringen Dosierungsunterschiede von lediglich 20 mg Omeprazol und die relativ geringe Bioverfügbarkeit von Omeprazol nach einer einmaligen Gabe sein [123]. Hinzu kommen die großen interindividuellen Schwankungen bei der Bildung von Omeprazolsulfon.

Die AUC und demgemäß die Bioverfügbarkeit von R- und S-Omeprazol nahm in allen Gruppen innerhalb der 14-tägigen Behandlung zu, welches bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte [9, 123]. Auffällig war hingegen, dass innerhalb der Metaboliten ausschließlich die AUC von Omeprazol-Sulfon als Metabolit des Enzyms CYP3A4 während der Behandlung deutlich zunahm. Eine Ausnahme bildeten die EM mit 20 mg Omeprazol. Dies spricht dafür, dass das Enzym CYP2C19 dosisabhängig einer Sättigung unterliegt und infolgedessen CYP3A4 bei höheren Dosen zum hauptabbauenden Enzym wird. Auch an gesunden Probanden konnte diese Sättigung von CYP2C19 beobachtet werden [124]. Anhand dieser Erkenntnis liegt die Schlussfolgerung nahe, dass ab einer bestimmten Dosierung das Enzym CYP2C19

und somit auch der CYP2C19-Genstatus weniger relevant erscheint. Unter diesem Gesichtspunkt muss zudem die gleichzeitige Applikation von Arzneimitteln, die als CYP3A4-Inhibitoren bekannt sind, kritisch überwacht werden. Überdosierungen mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen können so vermieden bzw. rechtzeitig aufgedeckt werden.

Der in früheren Arbeiten sowohl an Lebermikrosomen [7] als auch an gesunden Probanden [22] beschriebene schnellere Abbau von R-Omeprazol konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Weder in der HWZ noch in der AUC oder der  $C_{max}$  waren Unterschiede zwischen R-Omeprazol und S-Omeprazol zu erkennen. Folglich unterstützen diese Studiendaten nicht den vom Hersteller angegebenen langsameren Abbau des auch isoliert vermarkteten Enantiomers S-Omeprazols (Nexium<sup>®</sup>), mit welchem in der entsprechenden Präparatewerbung argumentativ eine bessere Wirksamkeit des Enantiomers gegenüber dem Razemat begründet wird.

Die ermittelten Daten zur Korrelation zwischen dem Geno- und dem Phänotyp verdeutlichten, dass die genotypisch als EM charakterisierten Patienten zu einem hohen Prozentsatz jedoch nicht ausnahmslos auch phänotypisch als solche charakterisiert werden konnten. Eine Mutation auf einem anderen, in dieser Arbeit nicht untersuchten, CYP2C19-Allel könnte eine Erklärung für diese mangelnde Korrelation sein. Dabei ist an die Allele CYP2C19\*3 bis \*8 zu denken, welche ebenfalls mit einer herabgesetzten Enzymaktivität assoziiert sind, in der kaukasischen Bevölkerung jedoch extrem selten vorkommen [60, 125-127]. Ferner werden bisher noch unentdeckte Allele für weitere Fälle eines eingeschränkten CYP2C19-Metabolismus verantwortlich gemacht [127].

Der ermittelte CYP2C19-Genotyp IM führte nicht unabdingbar zu einem Phänotyp mit eingeschränkter CYP2C19-Aktivität. Einerseits könnte das neben dem polymorphen Allel vorliegende funktionsfähige Allel den Defekt in einem gewissen Rahmen ausgleichen. Andererseits übten eventuell auch nicht-genetische Faktoren einen Einfluss auf den Phänotyp aus [6].

Anhand der gastroösophagealen 24-h-pH-Metrie zeigte sich lediglich am 1. Tag der Behandlung eine signifikant bessere Wirksamkeit der höheren Dosierung von 2 x 40 mg Omeprazol. Dieser Wirksamkeitsvorteil konnte jedoch nach erfolgter 14-tägiger Behandlung nicht weiter festgestellt werden. Somit wurde mit einer höheren Dosierung nach 14-tägiger Behandlung keine bessere Säurehemmung erreicht als mit

der niedrigeren. Folglich erscheint es sinnvoll eine Omeprazol-Therapie mit einer hohen Dosierung zu beginnen und diese spätestens nach 14 Tagen zu reduzieren.

Eine schlüssige Erklärung für diese Vorgehensweise liefert ferner der Wirkmechanismus der Protonenpumpenhemmer. Durch die irreversible Blockade der Protonenpumpen [128], reicht nach einer anfänglich hohen Dosierung später eine niedrigere aus, um ausschließlich die neu gebildeten Protonenpumpen zu blockieren.

#### **4.2.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen**

Im Allgemeinen werden Protonenpumpenhemmer als gut verträglich und sicher angesehen [129], weshalb sie häufig ohne klare Indikation, in zu hoher Dosierung und zu lang verordnet werden. In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Publikationen, welche diese unkritische Verordnungspraxis mit einer erhöhten Rate von Knochenbrüchen, schweren Darminfektionen und Pneumonien assoziieren [26, 130-131].

Mit Hilfe der entwickelten Bestimmungsmethode für Omeprazol konnten auch in dieser Arbeit zwei unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufgeklärt werden, die in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben wurden. Beide unerwünschte Effekte zeigten eine Dosisabhängigkeit.

Protonenpumpeninhibitoren stehen schon länger im Verdacht Rhabdomyolysen zu verursachen [132], bisher jedoch ohne Hinweise auf eine dosisabhängige, toxische Rhabdomyolyse, wie in unserem Fall vermutet. Der zeitliche Zusammenhang zwischen dem Beginn der Esomeprazol-Therapie und dem Erscheinen der Symptome unterstützt unsere Hypothese ebenso wie die klinische Besserung nach Beendigung der Therapie mit Esomeprazol. Ferner zeigte die retrospektive Evaluation einen zeitlich um wenige Tage verzögerten Zusammenhang zwischen der Esomeprazol-Dosis und der Myoglobin-Serumkonzentration (Abbildung 3-41). Zudem war die berechnete Halbwertszeit von Esomeprazol deutlich erhöht. Sie betrug annähernd das Vierfache im Vergleich zu Werten von gesunden Kaukasiern [133]. Ursächlich war vermutlich die verringerte Herzleistung des Patienten (Ejektionsfraktion < 30 %), welche eine verminderte Leberaktivität zur Folge hatte.

Des Weiteren wies die Anamnese des Patienten keine Krampfleiden auf und er erhielt keine Arzneimittel, wie z. B. Statine, die dafür bekannt sind, Rhabdomyolysen auszulösen. Eine Rhabdomyolyse als direkte Folge der Operation war wegen der anhaltend hohen Serum-Myoglobin-Konzentrationen zudem wenig wahrscheinlich.

Der exakte Mechanismus dieser UAW ist nicht bekannt. Die Möglichkeit einer idiosynkratischen Reaktion als Ursache der Myopathie [134] kann, aufgrund der offensichtlichen Korrelation zwischen der Esomeprazol-Dosis und den Myoglobin-Serumkonzentrationen, vernachlässigt werden. Dies spricht vielmehr für eine toxische Arzneimittelreaktion. Möglicherweise ist der Mechanismus der beobachteten unerwünschten Reaktion in der Skelettmuskulatur vergleichbar mit der Reaktion, die für Protonenpumpenhemmer in vaskulären glatten Muskelzellen diskutiert wird [135]. Die Natriumhydrogen-ATPase ist nicht nur in den Schleimhautzellen des Magens zu finden, sondern auch in vielen anderen Gewebearten. Die ATPase ist verantwortlich für die intrazelluläre pH-Regulation indem sie saure Äquivalente, z. B. Protonen, aus der Zelle nach außen transportiert. Möglich scheint, dass eine Protonenpumpenhemmer-induzierte irreversible Hemmung der Natriumhydrogen-ATPase zu einem übersäuerten Zellinneren und damit einer Zellzerstörung, der Rhabdomyolyse, führte.

Im zweiten Fall wurde ein persistierender Husten als konzentrationsabhängige unerwünschte Arzneimittelwirkung von Omeprazol beschrieben.

Die drei häufigsten Auslöser eines chronischen Hustens bei einem immun-kompetenten Nichtraucher sind das postnasale Drip-Syndrom, Asthma und GERD [136]. Des Weiteren kann nicht nur eine GERD sondern auch ein nicht-saurer Reflux mit Husten assoziiert sein [137]. Als mögliche pathogene Mechanismen des refluxbedingten Hustens werden Mikro- und Makroaspirationen, Kehlkopfverletzungen, eine erhöhte bronchiale Reagibilität und eine vagal vermittelte Reflexbronchokonstriktion diskutiert [138]. Ferner kann ein persistierender Husten aber auch durch Arzneimittel verursacht sein. Insbesondere ACE-Hemmer sind mit einer Prävalenz von 5-20 % dafür bekannt, Husten auszulösen [139].

Innerhalb der ersten sechs Tage der Therapie äußerte die Patientin keinerlei Beschwerden. Folglich scheint ein GERD-assoziiertes Husten oder ein Husten ausgelöst durch einen nicht-sauren Reflux eine unwahrscheinliche Erklärung zu sein. Des Weiteren spricht die mit steigenden Omeprazol-Plasmaspiegeln kontinuierliche Exazerbation des Hustens für eine dosisabhängige unerwünschte Arzneimittelreaktion. Im beschriebenen Fall wurden, im Vergleich zu Referenzwerten von gesunden Probanden mit einer Dosierung von 20 mg Omeprazol täglich [9, 108], deutlich höhere Omeprazol-Plasmakonzentrationen erreicht. Eine denkbare Erklärung hierfür könnte eine Interaktion zwischen Omeprazol und Domperidon sein. Sowohl

Omeprazol als auch Domperidon sind Substrate des P-Glykoproteins [140-141]. Folglich wäre eine kompetitive Hemmung des P-Glykoproteins, resultierend in einer erhöhten Omeprazol Absorption, vorstellbar. Es existiert eine Fallbeschreibung einer Rhabdomyolyse unter der Behandlung des Protonenpumpenhemmers Rabeprazol in Kombination mit Domperidon [142]. Die Autoren äußern sich jedoch nicht hinsichtlich eines möglichen Mechanismus der Rhabdomyolyse. Eine Interaktion, welche den Rabeprazol-Plasmaspiegel erhöht, scheint vorstellbar. Ferner könnte ebenfalls ein anderer hier nicht untersuchter CYP-Polymorphismus verantwortlich sein.

Eine weitere Fallbeschreibung berichtet über einen Patienten mit einem Omeprazol induzierten hartnäckigen Husten, allerdings ohne dass Omeprazol-Plasmaspiegel bestimmt wurden [143]. Des Weiteren erklärt die US-amerikanische Fachinformation von Omeprazol, dass Husten bei 1,1 % der Studienpopulation auftrat [144]. Interessanterweise wird die unerwünschte Arzneimittelwirkung des Hustens weder in der deutschen noch in der britischen Fachinformation erwähnt [15, 145]. Nutzt man für die Beurteilung des Kausalzusammenhangs den Wahrscheinlichkeitsscore nach Naranjo, ergibt sich eine „wahrscheinliche“ unerwünschte Arzneimittelwirkung [146].

Der Mechanismus dieses unerwünschten Ereignisses, zum Beispiel ein direkter pharmakologischer Effekt von Omeprazol an den Hustenrezeptoren, bedarf noch weiterer Erforschung. Jedoch scheint ein Klasseneffekt der Protonenpumpenhemmer vorzuliegen, da auch die amerikanische Fachinformation von Pantopazol eine Zunahme von Husten als therapiebegleitenden Effekt erwähnt [147].

Dieser Fallbericht beschreibt Husten als unerwünschtes Arzneimittelereignis von Omeprazol, welches andererseits häufig für die Therapie des GERD-bedingten Hustens verordnet wird. Dementsprechend sollten Ärzte während einer Omeprazol-Therapie auf ein Einsetzen oder eine Verschlimmerung von Husten achten.

Jeder Einsatz von Protonenpumpenhemmern sollte kritisch überdacht und die Dosierung auf die niedrigste effektive Dosis beschränkt werden. Ferner sollte eine Protonenpumpenhemmer-Therapie wie auch jegliche andere Therapie nur bei Patienten eingesetzt werden, die sie auch wirklich benötigen.

Dass der Einsatz eingeschränkt werden kann, zeigten Mitarbeiter des Massachusetts General Hospitals in Boston. Nach der Implementierung einer Leitlinie ging der Anteil der Patienten, welche in der Klinik einen Protonenpumpenhemmer erhielten, von 27 % auf 16 % zurück. Ferner wurden bei der Entlassung anstatt bei 16 % nur noch bei 10 % der Patienten ein Protonenpumpenhemmer verordnet. [148]

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das erste Mal eine Methode entwickelt werden, welche es ermöglicht, enantioselektiv sowohl Omeprazol als auch seine beiden Hauptmetabolite, 5-Hydroxyomeprazol und Omeprazol-Sulfon, quantitativ in humanem Serum zu bestimmen. Die Probenaufbereitung erfolgte mittels Festphasenextraktion und lieferte dabei hohe Wiederfindungsraten und reine Extrakte. Nachfolgend fand die chirale Trennung im Normalphasen-Modus mit tandem-massenspektrometrischer Detektion statt, wobei die Ionisation durch Photonen unter Atmosphärendruck erreicht wurde. Diese Methode lieferte scharfe und symmetrische Peaks und Basisliniengetrennte Enantiomere von Omeprazol und 5-Hydroxyomeprazol. Ferner erwies sich die APPI-Ionenquelle für die Effluenten der Normalphasen-HPLC als hervorragend geeignet und effizient. Die Detektion mittels Massenspektrometrie war zudem ausreichend selektiv und empfindlich, um ein 24-stündiges Konzentrations-Zeit-Profil nach einer einmaligen Applikation von 20 mg Omeprazol zu erstellen. Durch die Verwendung von Isotopen-gelabelten internen Standards sowohl für Omeprazol als auch für seine Metabolite erzielte die Methode zudem sehr präzise und richtige Ergebnisse.

Des Weiteren deckt das Verfahren nicht nur die genotypisch bedingte Enzymaktivität (CYP3A4- und CYP2C19-Phänotyp) ab, sondern ist außerdem in der Lage Interaktionen und Organfunktionseinschränkungen zu erfassen.

Mit Hilfe der entwickelten enantioselektiven Methode für die simultane Bestimmung von Omeprazol und seiner Metabolite konnte ferner die bisher erste klinische Studie an kaukasischen GERD-Patienten durchgeführt werden, die es ermöglichen sollte, den Einfluss des Genotyps auf die Pharmakokinetik und –dynamik von Omeprazol abzuschätzen. Durch die Probleme bei der Rekrutierung wurden jedoch nur wenige GERD-Patienten mit einem eingeschränkten CYP2C19-Metabolismus gefunden. Folglich konnte die Auswertung nicht, wie laut Studiendesign geplant, zwischen der Kontrollgruppe (alle Genotypen) mit Standarddosierung und den beiden Interventionsgruppen mit Genotyp-basierter Dosierung erfolgen. Alternativ wurden die eingeschränkten Metabolisierer (IM) in einer Gruppe zusammengefasst und mit den extensiven Metabolisierern (EM) unterschiedlicher Dosierungen verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Pharmakokinetik der IM und der EM mit gleicher Dosierung aufgezeigt werden. Hingegen unterschieden sich am

15. Tag der Behandlung, wie durch die höhere Dosierung erwartet, die AUCs von Omeprazol und seiner Metabolite zwischen 20 mg (sowohl EM als auch IM) und 2 x 40 mg Omeprazol. Am 1. Tag der Omeprazol-Behandlung konnten indessen zwischen hoher und niedriger Dosierung nur Unterschiede beim 5-Hydroxy-Metabolit gefunden werden.

Die mittlere Halbwertszeit von Omeprazol betrug am 1. Behandlungstag 1,2 h und 1,5 h nach 14 Tagen. Ferner konnte eine Steigerung der Bioverfügbarkeit von R- und S-Omeprazol im Laufe der Behandlung gezeigt werden. Dabei wird das Enzym CYP2C19 ab einer bestimmten Omeprazol-Konzentration gehemmt und CYP3A4 zum hauptabbauenden Enzym.

Durch die vorliegende Arbeit konnte zudem der enantioselektive Metabolismus von Omeprazol sowie die Enantiomerenstabilität von S-Omeprazol in vivo bestätigt werden. Ein schnellerer Abbau von R-Omeprazol im Gegensatz zu S-Omeprazol konnte hingegen nicht festgestellt werden. Auffällig erschien, dass die Bildung des CYP3A4-Metabolits Omeprazol-Sulfon im Gegensatz zu 5-Hydroxyomeprazol einer hohen interindividuellen Schwankung unterlag und dieser Metabolit mit einer mittleren HWZ von 4,6 h deutlich langsamer metabolisiert wurde.

Die pharmakodynamische Analyse ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen IM und EM mit gleicher Dosierung. In allen Gruppen konnte innerhalb der 14-tägigen Behandlung der prozentuale Anteil des Magen-pH-Wertes oberhalb von 4 in 24 h deutlich gesteigert werden. Jedoch veränderte sich der prozentuale Anteil des Ösophagus-pH-Wertes unterhalb von 4 in 24 h über dieselbe Zeitspanne nur unwesentlich. Ferner konnte gezeigt werden, dass sich der mittlere Magen-pH-Wert nach der 14-tägigen Behandlung selbst zwischen unterschiedlichen Dosierungen nicht signifikant unterschied. Da zwischen den Gruppen kein signifikant unterschiedlicher Einfluss auf den Ösophagus-pH-Wert gefunden werden konnte, reicht bei GERD-Patienten eine Omeprazol-Therapie mit einer niedrigen Dosierung aus. Zudem könnten mit dieser Strategie dosisabhängige, unerwünschte Arzneimittelwirkungen vermieden bzw. reduziert werden.

Die Frequenz der ermittelten CYP2C19-Genotypen unserer Studienpopulation betrug 84 % EM, 16 % IM und 0 % PM und unterschied sich damit deutlich von der der kaukasischen Bevölkerung. Der mit Hilfe der Pharmakokinetik bestimmte CYP2C19-Phänotyp korrelierte zudem nur bedingt mit dem CYP2C19-Genotyp. Bei den EM stimmte der Phänotyp zu 87 % mit dem Genotyp überein, wohingegen nur 2 von 5 IM

auch phänotypisch eindeutig als solche charakterisiert werden konnten. Die ermittelte CYP3A4-Enzymaktivität wurde bei allen Patienten als hoch eingestuft. Zudem führte eine eingeschränkte Aktivität des einen Enzyms meist zu einer höheren Aktivität des Anderen.

Mit Hilfe dieser Arbeit konnten des Weiteren zwei Fälle von dosisabhängigen, unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch Protonenpumpenhemmer aufgeklärt werden, die in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben wurden.

Selbst bei niedrigen Dosierungen von Omeprazol können hohe Plasmaspiegel erreicht werden, die dann in manchen Patienten zu klinisch relevanten unerwünschten Effekten führen können. Ferner beschreibt ein Fallbericht Husten als unerwünschtes Arzneimittelereignis von Omeprazol, welches andererseits häufig für die Therapie des GERD-bedingten Hustens verordnet wird. Dementsprechend sollten Ärzte während einer Omeprazol-Therapie auf ein Einsetzen oder eine Verschlimmerung von Husten achten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass anhand dieser kleinen Studie kein Vorteil in der vorhergehenden Bestimmung des CYP2C19-Genotyps bei einer Omeprazol-Therapie bei GERD-Patienten gesehen werden kann. Um diese Frage jedoch abschließend zu klären, müssten größere Studien mit einer weit höheren Patientenzahl folgen.

Die Pharmakogenetik ist ein wichtiger und zukunftsweisender Forschungszweig, der jedoch bisher nur spärlich in die klinische Praxis Einzug gehalten hat. Nur in prospektiven klinischen Studien, die bislang weitestgehend fehlen, können in Zukunft genetische Determinanten für das Ansprechen von Arzneimitteln und das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zuverlässig ermittelt und auf Ihren Nutzen hin überprüft werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zudem zeigen, dass selbst ein Patient, der als extensiver Metabolisierer genotypisiert und mit einer niedrigen Omeprazol-Dosis behandelt wurde, nicht vor unerwünschten Arzneimittelwirkungen geschützt war. In diesem Fall erbrachten die pharmakokinetischen Daten weitaus nützlichere Erkenntnisse als die Pharmakogenetik. Dementsprechend darf man, bei allen Möglichkeiten, welche die Pharmakogenetik zu bieten scheint, nicht die Möglichkeit eines modernen Arzneimittel Monitorings (TDM) vergessen. Im Vergleich zur Genotypisierung hat das TDM eine größere Relevanz für die Dosiseinstellung, die Therapiesteuerung und das Auffinden von konzentrationsabhängigen UAW.



Das Therapeutische Drug Monitoring kann, wenn es professionell durchgeführt wird, wichtige Hinweise für die richtige Dosierung von Arzneimitteln liefern. Die Pharmakotherapie kann so zu jedem Zeitpunkt und unter der zusätzlichen Beachtung auch nicht-genetischer Einflussfaktoren individualisiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics – drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348: 538-549
- [2] Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-491
- [3] Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956; 124: 484-485
- [4] Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988; 331: 442-446
- [5] Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41(12): 913-958
- [6] Fass R, Shapiro M, Dekel R, Sewell J. Systematic review: proton-pump inhibitor failure in gastro-oesophageal reflux disease – where next? *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 79-94
- [7] Äbelö A, Andersson TB, Antonsson M, Naudot AK, Skånberg I, Weidolf L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 966-972
- [8] Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006; 44: 297-302
- [9] Hassan-Alin M, Andersson T, Niazi M, Rohss K. A pharmacokinetic study comparing single and repeated oral doses of 20 mg and 40 mg omeprazole and its two optical isomers, S-omeprazole (esomeprazole) and R-omeprazole, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 60 : 779-784
- [10] Hellwich KH. Stereochemie, Grundbegriffe. 2.Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, S. 2-5; 24-29; 41-45
- [11] Karlsson A, Hermansson S. Optimisation of chiral separation of omeprazole and one of its metabolites on immobilized alpha1-acid glycoprotein using chemometrics. *Chromatographia* 1997; 44: 10-18
- [12] Stenhoff H, Blomqvist A, Lagerström PO. Determination of the enantiomers of omeprazole in blood plasma by normal-phase liquid chromatography and detection by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 734: 191-201
- [13] Ali T, Roberts DN, Tierney WM. Long-term safety concerns with proton pump inhibitors. *Am J Med* 2009;122: 896-903

- [14] Caro JJ, Salas M, Ward A. Healing and relapse rates in gastroesophageal reflux disease treated with the newer proton-pump inhibitors lansoprazole, rabeprazole and pantoprazole compared with omeprazole, ranitidine and placebo: evidence from randomized clinical trials. *Clin Ther* 2001; 23: 998-1017
- [15] Fachinformation Omeprazol STADA® 20 mg/ -40 mg magensaftresistente Hartkapseln, STADAPharm GmbH, Bad Vilbel; Stand: Januar 2009
- [16] O'Neil MJ. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13. Edition, Whitehouse Station, Merck and Co. 2001, S. 1224
- [17] Kanazawa H, Okada A, Higaki M, Yokota H, Mashige F, Nakahara K. Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 30: 1817-1824
- [18] Gonzalez HM, Romero EM, Chavez TJ, Peregrina AA, Quezada V, Hoyo-Vadillo C. Phenotype of CYP2C19 and CYP3A4 by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction *J Chromatogr B* 2002; 780: 459-465
- [19] Böttiger Y. Use of omeprazole sulfone in a single plasma sample as a probe for CYP3A4. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 621-625
- [20] Fachinformation Nexium® mups 20mg / -40mg magensaftresistente Tabletten, Astra Zeneca, Wedel; Stand: August 2009
- [21] Schwab M, Klotz U, Hofmann U, Schaeffeler E, Leodolter A, Malfertheiner P, Treiber G. Esomeprazole-induced healing of gastroesophageal reflux disease is unrelated to the genotype of CYP2C19: evidence from clinical and pharmacokinetic data. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 627-634
- [22] Andersson T, Hassan-Alin M, Hasselgren G, Röhss K, Weidolf L. Pharmacokinetic studies with esomeprazole, the (S)-isomer of omeprazole. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 411-426
- [23] Herzig SJ, Howell MD, Ngo LH, Marcantonio ER. Acid-suppressive medication use and the risk for hospital-acquired pneumonia. *JAMA* 2009; 301: 2120-2128
- [24] Schönhöfer PS, Werner B, Tröger U. Ocular damage associated with proton pump inhibitors. *BMJ* 1997; 314: 1805
- [25] Trifirò G, Corrao S, Alacqua M, Moretti S, Tari M, Caputi AP, Arcoraci V; UVEC Group. Interaction risk with proton pump inhibitors in general practice: significant disagreement between different drug-related information sources. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 582-590
- [26] Naunton M, Peterson GM, Bleasel MD. Overuse of proton pump inhibitors. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25: 333-340
- [27] Nardino RJ, Vender RJ, Herbert PN. Overuse of acid-suppressive therapy in hospitalized patients. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3118-3122

- [28] Quenot JP, Thiery N, Barbar S. When should stress ulcer prophylaxis be used in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 2009; 15: 139-143
- [29] Unger KK. *Handbuch der HPLC, Teil1 – Leifaden für Anfänger und Praktiker*. Git Verlag, Darmstadt 1989
- [30] Eppert GJ. *Flüssigkeitschromatographie, HPLC – Theorie und Praxis*. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden 1997
- [31] Chen J, Korfmacher WA, Hsieh Y. Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820: 1-8
- [32] Schneider H, Steimer W. Tandem-Massenspektrometrie in der therapeutischen Arzneimittelspiegel-Bestimmung: Praxis und Tücken der Anwendung. *J Lab Med* 2006; 30: 428-437
- [33] Thermo electron Corporation. *Finnigan Ion Max APPI Source, Operator's Manual, Revision A, San Jose, California, USA, September 2003*
- [34] Cai SS, Hanold KA, Syage JA. Comparison of atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure chemical ionization for normal-phase LC/MS chiral analysis of pharmaceuticals. *Anal Chem* 2007; 79: 2491-2498
- [35] Schröder E. *Massenspektrometrie, Begriffe und Definitionen*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1991
- [36] Lehmann WD. *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum, Akad.Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
- [37] Dubuc MC, Hamel C, Caubet MS, Brazier JL. A rapid HPLC-DAD method for separation and determination of omeprazole extracted from human plasma. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 2001; 24: 1161-1169
- [38] Kobayashi K, Chiba K, Sohn DR, Kato Y, Ishizaki T. Simultaneous determination of omeprazole and its metabolites in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with an alkaline-resistant polymer-coated C18 column. *J Chromatogr* 1992; 579: 299-305
- [39] Rezk NL, Brown KC, Kashuba AD. A simple and sensitive bioanalytical assay for simultaneous determination of omeprazole and its three major metabolites in human blood plasma using RP-HPLC after a simple liquid-liquid extraction procedure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 844: 314-321
- [40] Shimizu M, Uno T, Niioka T, Yau-Furukori N, Takahata T, Sugawara K, Tateishi T. Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 832: 241-248

- [41] Yuen KH, Choy WP, Tan HY, Wong JW, Yap SP. Improved high performance liquid chromatographic analysis of omeprazole in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24: 715-719
- [42] Frerichs VA, Zaranek C, Haas CE. Analysis of omeprazole, midazolam and hydroxy-metabolites in plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 824: 71-80
- [43] Hofmann U, Schwab M, Treiber G, Klotz U. Sensitive quantification of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 831: 85-90
- [44] Kanazawa H, Okada A, Matsushima Y, Yokota H, Okubo S, Mashige F, Nakahara K. Determination of omeprazole and its metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2002; 949: 1-9
- [45] Wang J, Wang Y, Fawcett JP, Wang Y, Gu J. Determination of omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 631-635
- [46] Woolf EJ, Matuszewski BK. Simultaneous determination of omeprazole and 5'-hydroxyomeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998; 828: 229-238
- [47] Bonato PS, Paias FO. Enantioselective analysis of omeprazole in pharmaceutical formulations by chiral high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Braz Chem Soc* 2004; 15: 318-323
- [48] Cass QB, Lima VV, Oliveira RV, Cassiano NM, Degani AL, Pedrazzoli J. Enantiomeric determination of the plasma levels of omeprazole by direct plasma injection using high-performance liquid chromatography with achiral-chiral column-switching. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 798: 275-281
- [49] Orlando RM, Bonato PS. Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 795: 227-235
- [50] Cytochrome P450 Homepage: <http://drnelson.uthsc.edu/cytochromep450.html>, Stand: 11.06.2011
- [51] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42
- [52] Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32: 210-258

- [53] Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G et al. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999; 20: 1-24
- [54] Breimer DD, Schellens JH. A 'cocktail' strategy to assess in vivo oxidative drug metabolism in humans. *Trends Pharmacol Sci* 1990 ; 11 : 223-225
- [55] Küpfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984; 26: 753-759
- [56] Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan S, Raucy JL, Lasker JM, Ghanayem BI. Evidence that CYP2C19 is the major(S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 1994; 33: 1743-1752
- [57] Wrighton SA, Stevens JC, Becker GW, VandenBranden M. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 240-245
- [58] De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 594-598
- [59] de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994; 269: 15419-15422
- [60] Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>, Stand: 08.03.2010
- [61] Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Wood AJ. Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 539-549
- [62] Bertilsson L. Geographical / interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 192-209
- [63] Furuta T, Shirai N, Watanabe F, Honda S, Takeuchi K, Iida T, Sato Y, Kajimura M, Futami H, Takayanagi S, Yamada M, Ohashi K, Ishizaki T, Hanai H. Effect of cytochrome P450 2C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 453-460
- [64] Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki J, Kayaba S, Noguchi K, Hamada S, Noguchi M, Shimosegawa T; Study Group of GERD. The effects of lansoprazole on erosive reflux oesophagitis are influenced by CYP2C19 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 965-973

- [65] Furuta T, Ohashi K, Kamata T, Takashima M, Kosuge K, Kawasaki T, Hanai H, Kubota T, Ishizaki T, Kaneko E. Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Ann Intern Med* 1998; 129: 1027-1030
- [66] Furuta T, Shirai N, Takashima M, Xiao F, Hanai H, Sugimura H, Ohashi K, Ishizaki T, Kaneko E. Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 158-168
- [67] Schwab M, Schaeffeler E, Klotz U, Treiber G. CYP2C19 polymorphism is a major predictor of treatment failure in white patients by use of lansoprazole-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 201-209
- [68] Furuta T, Sugimoto M, Shirai N, Matsushita F, Nakajima H, Kumagai J, Senoo K, Kodaira C, Nishino M, Yamade M, Ikuma M, Watanabe H, Umemura K, Ishizaki T, Hishida A. Effect of MDR1 C3435T polymorphism on cure rates of *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with lansoprazole, amoxicillin and clarithromycin in relation to CYP 2C19 genotypes and 23S rRNA genotypes of *H. pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 693-703
- [69] Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 1995; 104: 1-8
- [70] Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, Zech K, Ingelman-Sundberg M, von Richter O. Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 339-349
- [71] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1271-1294
- [72] Dent J, Brun J, Fendrick AM, Fennerty MB, Janssens J, Kahrilas PJ, Lauritsen K, Reynolds JC, Shaw M, Talley NJ. An evidence-based appraisal of reflux disease management - the Genval Workshop Report. *Gut* 1999; 44 Suppl 2: S1-S16
- [73] Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Jahansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005; 54: 710-717
- [74] AWMF online. S3-Leitlinie Gastroenterologie: Gastroösophageale Refluxkrankheit S.1-31, [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/021-013l\\_S3\\_Gastrooesophageale\\_Refluxkrankheit.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-013l_S3_Gastrooesophageale_Refluxkrankheit.pdf), Stand: 19.06.2011
- [75] Winkelstein A. Peptic esophagitis: a new entity. *J Amer Med Assoc* 1935; 104: 906-9
- [76] Allison PR. Peptic ulcer of the esophagus. *J Thorac Surg* 1946; 15: 308-317
- [77] Allison PR. Reflux esophagitis, sliding hiatal hernia and the anatomy of repair. *Surg Gynecol Obstet* 1951; 92: 419-431

- [78] Zaino C, Poppel MH, Jacobson HG, Lepow H. Hiatal insufficiency and hiatal hernia. In: *The Lower Esophageal Vestibular Complex*. Springfield, IL; 1963: 173–218
- [79] Cohen S, Harris LD. The lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* 1972; 63: 1066-1073
- [80] Siewert JR, Harder F, Rothmund M. *Praxis der Viszeralchirurgie-Gastroenterologische Chirurgie*. 2. Ausgabe; 2002, Springer Verlag, Heidelberg, S. 254-255
- [81] Sivri B, McCallum RW. What has the surgeon to know about pathophysiology of reflux disease? *World J Surg* 1992; 16: 294-299
- [82] Lundell L, Myers JC, Jamieson GG. Is motility impaired in the entire upper gastrointestinal tract in patients with gastro-oesophageal reflux disease? *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 131-135
- [83] Hölscher AH, Bollschweiler E, Gutschow Ch, Malfertheiner P. Gastroösophageale Refluxkrankheit - Welche Diagnostik ist zur Indikationsstellung notwendig? *Chirurg* 2005; 76: 345-52
- [84] Tefera L, Fein M, Ritter MP, Bremner CG, Crookes PF, Peters JH, Hagen JA, DeMeester TR. Can the combination of symptoms and endoscopy confirm the presence of gastroesophageal reflux disease? *Am Surg* 1997; 63: 933-936
- [85] AstraZeneca Schweden, Online (Stand 22.03.2010): <http://www.nexium.nu/Sjukvarden/Sjukdomsfakta/Refluxsjukdom/Utdredning-av-GERD/>
- [86] Hunt RH. Importance of pH control in the management of GERD. *Arch Intern Med* 1999; 159: 649-657
- [87] Bremner RM, Crookes PF, DeMeester TR, Peters JH, Stein HJ. Concentration of reflux acid and mucosal injury. *Am J Surg* 1992; 164: 522-527
- [88] Fass R, Hell RW, Garewal HS, Martinez P, Pulliam G, Wendel C, Sampliner RE. Correlation of oesophageal acid exposure with Barrett's oesophagus length. *Gut* 2001; 48: 310-313
- [89] Katz PO, Ginsberg GG, Hoyle PE, Sostek MB, Monyak JT, Silberg DG. Relationship between intragastric acid control and healing status in the treatment of moderate to severe erosive oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 617-628
- [90] Katz PO. Review article: intragastric and oesophageal pH monitoring in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23 Suppl 1: 3-11
- [91] Spencer J. Prolonged pH recording in the study of gastrooesophageal reflu. *Br J Surg* 1969; 56: 9-12



- [92] DeMeester TR, Johnson LF, Joseph GJ, Toscano MS, Hall AW, Skinner DB. Patterns of gastroesophageal reflux in health and disease. *Ann Surg* 1976; 184: 459-470
- [93] Johnson LF, DeMeester TR. Twenty-four hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 1974; 62: 325-332
- [94] Pehl C, Boccali I, Hennig M, Schepp W. pH probe positioning for 24-hour pH-metry by manometry or pH step-up. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 375-382
- [95] Johnson LF, DeMeester TR. Development of the 24-hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8 Suppl 1: 52-58
- [96] Beese G. Die gastroösophageale Refluxkrankheit: Ösophagus-pH-Metrie. In: Fuchs KH, Stein HJ, Thiede A (Hrsg): *Gastrointestinale Funktionsstörungen - Diagnose, Operationsindikation, Therapie*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1997, S. 75-102
- [97] Xenos ES. The role of esophageal motility and hiatal hernia in esophageal exposure to acid. *Surg Endosc* 2002; 16: 914-920
- [98] Streets CG, DeMeester TR. Ambulatory 24-hour esophageal pH monitoring: why, when, and what to do. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 14-22
- [99] Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, Arbeitskreis Qualitätssicherung. Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. Version 1, S. 1-24, 01.06.2009; Online (Stand: 28.05.2011): [https://www.gtfch.org/cms/files/GTFCh\\_Richtlinie\\_Anhang%20B\\_Validierung\\_Version%201.pdf](https://www.gtfch.org/cms/files/GTFCh_Richtlinie_Anhang%20B_Validierung_Version%201.pdf)
- [100] Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 193-218
- [101] Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S. Analytical methods validation: bioavailability, bio-equivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Pharm Res* 1992; 9: 588-592
- [102] Madisch A, Hotz J, Longdong W, Arnold R, Gugler R, Hermans ML, Layer P. Gastroösophageale Refluxerkrankung – Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Themenkomplex IV: Erosive Refluxkrankheit (ERD). *Z Gastroenterol* 2005; 43: 179-182
- [103] Stein HJ, Barlow AP, DeMeester TR, Hinder RA. Complications of gastroesophageal reflux disease. Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. *Ann Surg* 1992; 216: 35-43

- [104] Tröger U, Reiche I, Jepsen MS, Huth C, Bode-Böger SM. Esomeprazole-induced rhabdomyolysis in a patient with heart failure. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1278-1279
- [105] Reiche I, Tröger U, Martens-Lobenhoffer J, Kandulski A, Neumann H, Malfertheiner P, Bode-Böger SM. Omeprazole-induced cough in a patient with gastroesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 880-882
- [106] Huerta-Alardin AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians. *Crit Care* 2005; 9: 158-169
- [107] Mikkelsen TS, Toft P. Prognostic value, kinetics and effect of CVVHDF on serum of the myoglobin and creatine kinase in critically ill patients with rhabdomyolysis. *Acta Anesthesiol Scand* 2005; 49: 859-864
- [108] Hunfeld NG, Mathot RA, Touw DJ, van Schaik RH, Mulder PG, Franck PF, Kuipers EJ, Geus WP. Effect of CYP2C19 \*2 and \*17 mutations on pharmacodynamics and kinetics of proton pump inhibitors in Caucasians. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 752-760
- [109] Fossmark R, Johnsen G, Johanessen E, Waldum HL. Rebound acid hypersecretion after long-term inhibition of gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 149-154
- [110] Martens-Lobenhoffer J, Reiche I, Tröger U, Mönkemüller K, Malfertheiner P, Bode-Böger SM. Enantioselective quantification of omeprazole and its main metabolites in human serum by chiral HPLC-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 857: 301-307, Erratum in: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 859: 289
- [111] FDA. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2001
- [112] Andersson ME, Aslan D, Clarke A, Roeraade J, Hagman G. Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis. *J Chromatogr A* 2003; 1005: 83-101
- [113] Kirkland JJ, Dilks CH, DeStefano JJ. Normal-phase high-performance liquid chromatography with highly purified porous silica microspheres. *J Chromatogr* 1993; 635: 19-30
- [114] Kagan M, Chlenov M, Melnikov S, Greenfield A, Gross J, Bernotas RC. Optimization of normal-phase chromatographic separation of compounds with primary, secondary and tertiary amino groups. *J Chromatogr A* 2008; 1194: 80-9
- [115] Stenhoff H, Blomqvist A, Lagerström PO. Determination of the enantiomers of omeprazole in blood plasma by normal-phase liquid chromatography and detection by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 734: 191-201

- [116] Kromidas S. HPLC-Tips, Die schnelle Hilfe für jeden Anwender, Band I. NOVIA GmbH, Saarbrücken, 1997, S. 62-67
- [117] Shams ME, Arneth B, Hiemke C, Dragicevic A, Müller MJ, Kaiser R, Lackner K, Härtter S. CYP2D6 polymorphism and clinical effect of the antidepressant venlafaxine. *J Clin Pharm Ther* 2006; 31: 493-502
- [118] Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem* 2005; 51: 376-385
- [119] Klotz U. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 271-279
- [120] Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 953-960
- [121] Kirchheiner J, Seeringer A, Viviani R. Pharmacogenetics in psychiatry - a useful clinical tool or wishful thinking for the future? *Curr Pharm Des* 2010; 16 :136-144
- [122] van Aken J, Schmedders M, Feuerstein G, Kollek R. Prospects and limits of pharmacogenetics: the thiopurine methyl transferase (TPMT) experience. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3:149-55
- [123] Horn JR, Howden CW. Review article: similarities and differences among delayed-release proton-pump inhibitor formulations. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 3: 20-24
- [124] Rost KL, Roots I. Nonlinear kinetics after high-dose omeprazole caused by saturation of genetically variable CYP2C19. *Hepatology* 1996; 23: 1491-1497
- [125] Furuta T, Ohashi K, Kosuge K, Zhao XJ, Takashima M, Kimura M, Nishimoto M, Hanai H, Kaneko E, Ishizaki T. CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 552-561
- [126] Li-Wan-Po A, Girard T, Farndon P, Cooley C, Lithgow J. Pharmacogenetics of CYP2C19: functional and clinical implications of a new variant CYP2C19\*17. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 69: 222-230
- [127] Wang H, An N, Wang H, Gao Y, Liu D, Bian T, Zhu J, Chen C. Evaluation of the Effects of 20 Non-synonymous Single-nucleotide Polymorphisms of CYP2C19 on S-Mephenytoin 4'-Hydroxylation and Omeprazole 5'-Hydroxylation. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 830-837
- [128] Shi S, Klotz U. Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64: 935-951
- [129] Thomson AB, Sauve MD, Kassam N, Kamitakahara H. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2323-2330

- [130] Gray SL, LaCroix AZ, Larson J, Robbins J, Cauley JA, Manson JE, Chen Z. Proton pump inhibitor use, hip fracture, and change in bone mineral density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med* 2010; 170: 765-771
- [131] Howell MD, Novack V, Grgurich P, Soulliard D, Novack L, Pencina M, Talmor D. Iatrogenic gastric acid suppression and the risk of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 2010; 170: 784-790
- [132] Clark DWJ, Strandell J. Myopathy including polymyositis: a likely class adverse effect of proton pump inhibitors? *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 473-479
- [133] Wilder-Smith CH, Bondarov P, Lundgren M, Niazi M, Röhss K, Ahlbom H, Nyman L. Intravenous esomeprazole (40 mg and 20 mg) inhibits gastric acid secretion as effectively as oral esomeprazole: results of two randomized clinical studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 191-197
- [134] Sivakumar K, Dalakas MC. Autoimmune syndrome induced by omeprazole. *Lancet* 1994; 344: 619-620
- [135] Schönhöfer PS, Werner B, Tröger U. Ocular damage associated with proton pump inhibitors. *Brit Med J* 1997; 314: 1805
- [136] Irwin RS, Curley FJ, French CL. Chronic cough. The spectrum and frequency of causes, key components of the diagnostic evaluation, and outcome of specific therapy. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 640-647
- [137] Sifrim D, Dupont L, Blondeau K, Zhang X, Tack J, Janssens J. Weakly acid reflux in patients with chronic unexplained cough during 24 hour pressure, pH, and impedance monitoring. *Gut* 2005; 54: 449-454
- [138] Lazenby JP, Harding SM. Chronic cough, asthma, and gastroesophageal reflux. *Curr Gastroenterol Rep* 2000; 2: 217-223
- [139] Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med* 1992; 117: 234-242
- [140] Neuhoff S, Langguth P, Dressler C, Andersson TB, Regårdh CG, Spahn-Langguth H. Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 168-179
- [141] Bamburowicz-Klimkowska M, Zywiec K, Potentas A, Szutowski M. Impact of the changes in P-glycoprotein activity on domperidone pharmacokinetics in rat plasma. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 752-756
- [142] Bourlon S, Veyrac G, Armand C, Lambert O, Bourin M, Jolliet P. Rhabdomyolysis during treatment with rabeprazole (Pariel®), a proton pump inhibitor combined with domperidone (Peridys®). *Therapie* 2002; 57: 597-600

[143] Howaizi M, Delafosse C. Omeprazole-induced intractable cough. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 1607-1609

[144] Prescribing information. Prilosec<sup>®</sup> (omeprazole). Astra Zeneca (2008) <http://www1.astrazeneca-us.com/pi/Prilosec.pdf> (Stand: 20. April 2009)

[145] Prescribing information. Losec<sup>®</sup> (omeprazole). Astra Zeneca (2011) <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/16009> (Stand: 20.06.2011)

[146] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, Janecek E, Domecq C, Greenblatt DJ. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther* 1981; 30: 239-245

[147] Prescribing information. Protonix<sup>®</sup> (pantoprazole). Wyeth Pharmaceuticals (2008) <http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=135> (Stand: 05/2011)

[148] Yachimski PS, Farrell EA, Hunt DP, Reid AE. Proton pump inhibitors for prophylaxis of nosocomial upper gastrointestinal tract bleeding: effect of standardized guidelines on prescribing practice. *Arch Intern Med* 2010; 170: 779-783

## 7 Anhang

**Tabelle 1:** Patientencharakteristika aller Patienten

	Patient Nr.	Geschlecht	Alter[Jahre]	Gewicht[kg]	Größe[m]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Grad der GERD	Hiatushernie	Genotyp	Randomisiert in Gruppe
1	01	weiblich	63	69	1,57	28	LA-A	nein	EM	Kontrolle A1
2	02	weiblich	44	57	1,55	24	LA-A	ja	EM	Kontrolle A1
3	03	männlich	65	104	1,86	30	LA-B	ja	EM	Behandlung B2
4	04	weiblich	68	65	1,65	24	LA-B	ja	EM	Behandlung B2
5	06	weiblich	61	60	1,68	21	LA-A	ja	EM	Kontrolle A1
6	07	männlich	62	92	1,84	27	LA-A	nein	IM	Kontrolle A2
7	08	weiblich	69	98	1,72	33	LA-A	ja	IM	Kontrolle A2
8	09	weiblich	67	67	1,54	28	LA-B	ja	EM	Kontrolle A1
9	12	weiblich	63	55	1,70	19	LA-A	ja	IM	Kontrolle A2
10	13	weiblich	58	58	1,71	20	LA-A	ja	EM	Behandlung B2
11	14	männlich	68	86	1,83	26	LA-A	ja	IM	Behandlung B1
12	15	weiblich	68	77	1,69	27	LA-A	nein	EM	Behandlung B2
13	16	männlich	42	81	1,78	26	LA-A	nein	EM	Kontrolle A1
14	18	männlich	57	77	1,69	27	LA-B	nein	EM	Behandlung B2
15	20	männlich	56	103	1,74	34	LA-A	ja	EM	Kontrolle A1
16	21	männlich	51	86	1,82	26	LA-B	nein	EM	Behandlung B2
17	23	männlich	63	76	1,60	27	LA-B	ja	EM	Behandlung B2
18	24	männlich	68	85	1,73	28	LA-A	ja	EM	Behandlung B2
19	25	männlich	66	69	1,75	23	LA-A	ja	EM	Kontrolle A1
20	27	männlich	38	81	1,75	26	LA-B	ja	EM	Kontrolle A1
21	28	männlich	64	70	1,74	23	LA-B	ja	IM	Kontrolle A2

**Tabelle 2:** Komedikation der einzelnen Patienten während des Studienzeitraums

	<b>KOMEDIKATION</b>
<b>EM (wt/wt) 20 mg, A1</b>	
Patient 01	▪ keine
Patient 02	▪ Ezetimib
Patient 06	▪ keine
Patient 09	▪ Valsartan, Triamteren, HCT, Domperidon, Magnesium
Patient 16	▪ keine
Patient 20	▪ keine
Patient 25	▪ keine
Patient 27	▪ keine
<b>EM (wt/wt) 2 x 40 mg, B2</b>	
Patient 03	▪ Valsartan, Diclofenac, Tamsulosin, ASS, Levothyroxin, Colecalciferol
Patient 04	▪ Mesalazin, Salmeterol/Fluticason
Patient 13	▪ Trazodon
Patient 15	▪ Enalapril, Thiamazol, Levodopa/Benserazid
Patient 18	▪ Enoxaparin
Patient 21	▪ Bisoprolol, HCT
Patient 23	▪ keine
Patient 24	▪ Bisoprolol, Tamsulosin
<b>IM (wt/mt) 20 mg, A2/B1</b>	
Patient 07	▪ keine
Patient 08	▪ Levothyroxin, Candesartan
Patient 12	▪ Pangrol® (Pankreas-Pulver)
Patient 14	▪ Nebivolol, Allopurinol, Tamsulosin, ASS, Lercarnidipin
Patient 28	▪ keine

Rohdaten

Patient 01, EM (20 mg Omeprazol)						Konzentrationen				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,25	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,81	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	39,24	33,59	12,10	1,97	9,90
60	132,28	102,85	21,69	13,64	106,80	420,25	382,66	67,17	24,20	136,61
90	450,77	331,66	94,07	42,36	339,53	530,63	489,09	156,11	34,77	209,92
120	274,81	186,47	95,12	27,62	238,84	376,39	343,95	157,12	27,92	174,40
180	92,97	62,75	76,06	13,67	129,19	182,15	175,86	157,38	15,62	108,92
300	21,50	13,12	59,52	4,17	43,56	73,65	71,10	154,04	7,08	54,56
480	2,70	0,00	28,32	0,00	8,95	17,77	18,18	99,07	2,25	18,09
720	0,00	0,00	9,00	0,00	1,83	0,00	0,00	56,72	0,00	3,70
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,41	0,00	0,00

Patient 01	AUC [ng*h/ml]	HWZ [min]	Cmax [ng/ml]
S-Omeprazol, single dose	689,73	58,86	450,77
R-Omeprazol, single dose	475,80	45,51	331,66
Omeprazolsulfon, single dose	507,51	153,59	95,12
S-5OH-Omeprazol, single dose	78,55	66,54	42,36
R-5OH-Omeprazol, single dose	731,43	85,11	339,53
S-Omeprazol, multiple dose	1.256,82	89,22	530,63
R-Omeprazol, multiple dose	105,20	91,62	489,09
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.314,61	291,75	157,38
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	98,14	107,44	34,77
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	666,93	109,12	209,92



Rohdaten

Patient 02, EM (20 mg Omeprazol)						Konzentrationen				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	131,55	85,71	52,01	22,85	1,31	73,46	53,14	19,71	11,56	85,69
60	200,94	123,72	110,91	36,28	201,78	105,90	73,84	40,25	17,09	127,86
90	100,43	56,45	102,86	21,58	311,60	287,13	198,43	115,87	42,64	322,20
120	36,47	18,98	76,47	10,25	218,01	122,52	76,46	104,21	24,34	198,68
180	8,07	3,69	34,56	3,37	121,78	36,95	17,44	73,06	9,19	83,88
300	0,00	0,00	11,57	0,00	44,76	4,51	0,00	35,72	1,54	18,85
480	0,00	0,00	3,14	0,00	8,20	0,00	0,00	9,70	0,00	2,57
720	0,00	0,00	0,00	0,00	1,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Patient 02	AUC [ng*h/ml]	HWZ [min]	Cmax [ng/ml]
S-Omeprazol, single dose	218,14	25,48	200,94
R-Omeprazol, single dose	128,68	23,38	123,72
Omeprazolsulfon, single dose	264,53	87,34	110,91
S-5OH-Omeprazol, single dose	46,43	34,51	36,28
R-5OH-Omeprazol, single dose	492,06	53,33	311,60
S-Omeprazol, multiple dose	371,24	38,03	287,13
R-Omeprazol, multiple dose	231,54	25,98	198,43
Omeprazolsulfon, multiple dose	392,45	105,07	115,87
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	68,27	45,39	42,64
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	574,45	59,88	322,20

Rohdaten

<b>Patient 03, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,79	0,00	50,13	1,26	14,55
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,66	2,95	45,75	1,28	13,95
40	16,43	10,34	2,49	2,51	17,54	802,24	705,57	198,99	68,30	392,26
60	60,29	34,45	26,68	15,11	145,62	492,51	396,42	209,16	50,80	339,33
90	108,42	61,65	44,49	24,74	223,40	362,56	284,50	229,42	39,75	276,28
120	125,57	72,91	55,06	27,50	280,16	269,13	205,83	198,64	34,17	238,85
180	32,27	15,83	33,91	9,61	125,87	147,71	97,34	199,31	20,25	147,75
300	10,94	6,07	16,72	3,55	52,64	56,68	31,95	155,91	8,52	66,24
480	0,00	0,00	5,96	0,00	16,14	8,06	3,51	89,50	1,69	16,21
720	0,00	0,00	0,00	0,00	2,75	0,00	0,00	43,31	0,00	3,52
1440	0,00	0,00	6,32	0,00	3,99	18,82	10,54	88,38	4,49	39,44

<b>Patient 03</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	254,98	53,70	125,57
R-Omeprazol, single dose	142,38	53,41	72,91
Omeprazolsulfon, single dose	189,10	119,71	55,06
S-5OH-Omeprazol, single dose	63,46	63,39	27,50
R-5OH-Omeprazol, single dose	771,25	98,47	280,16
S-Omeprazol, multiple dose	1.252,20	72,03	802,24
R-Omeprazol, multiple dose	938,63	62,30	705,57
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.530,19	227,38	229,42
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	147,96	86,08	68,30
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	1.049,21	98,74	392,26

Rohdaten

<b>Patient 04, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	75,44	1,27	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	69,69	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	63,64	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	56,70	0,00	1,26
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	55,25	0,00	1,29
120	219,48	147,41	60,12	54,32	418,93	9,52	7,82	50,27	1,30	5,32
180	37,70	19,85	35,57	10,33	114,61	603,26	576,71	315,17	48,52	274,17
300	45,41	24,12	75,11	12,90	128,51	143,22	140,40	355,78	15,35	98,03
480	0,00	0,00	14,67	0,00	12,07	15,98	17,14	232,92	2,88	21,91
720	0,00	0,00	3,09	0,00	2,16	0,00	0,00	81,26	0,00	3,32
1440	0,00	0,00	12,05	0,00	2,37	2,82	0,00	90,48	0,00	6,56

<b>Patient 04</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	334,67	95,20	219,48
R-Omeprazol, single dose	200,63	82,64	147,41
Omeprazolsulfon, single dose	343,74	91,96	75,11
S-5OH-Omeprazol, single dose	88,48	105,32	54,32
R-5OH-Omeprazol, single dose	853,97	81,62	418,93
S-Omeprazol, multiple dose	1.326,01	57,24	603,26
R-Omeprazol, multiple dose	1.281,92	59,16	576,71
Omeprazolsulfon, multiple dose	2.485,85	194,54	355,78
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	122,42	73,70	48,52
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	744,83	86,11	274,17

Rohdaten

<b>Patient 06, EM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	231,48	175,74	64,72	32,90	208,42
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	89,54	53,80	58,89	19,69	139,47
120	18,12	9,84	3,26	4,01	24,47	103,87	68,75	61,22	21,21	148,68
180	169,31	82,99	79,40	37,43	286,45	21,97	11,54	40,86	7,32	58,25
300	13,41	6,36	33,01	5,66	61,25	58,77	36,56	52,52	11,50	82,53
480	0,00	0,00	5,51	0,00	6,57	3,67	0,00	22,57	1,80	14,99
720	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,13	0,00	1,46
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<b>Patient 06</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	301,08	-	169,31
R-Omeprazol, single dose	147,76	-	82,99
Omeprazolsulfon, single dose	223,37	77,22	79,40
S-5OH-Omeprazol, single dose	73,30	-	37,43
R-5OH-Omeprazol, single dose	624,15	55,15	286,45
S-Omeprazol, multiple dose	412,62	84,99	231,48
R-Omeprazol, multiple dose	260,99	114,45	175,74
Omeprazolsulfon, multiple dose	384,39	124,39	64,72
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	85,60	114,85	32,90
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	617,89	72,11	208,42

Rohdaten

<b>Patient 07, IM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,02	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,45	0,00	0,00
40	19,85	16,64	4,45	2,18	8,89	0,00	0,00	3,63	0,00	0,00
60	114,12	103,69	59,19	14,60	91,41	240,80	244,04	79,47	19,46	83,58
90	198,22	181,54	134,30	23,67	152,06	236,24	250,22	178,99	20,68	106,97
120	118,35	107,48	126,07	16,63	115,53	154,01	165,42	154,33	16,05	88,98
180	46,83	40,84	97,42	8,31	70,62	93,31	105,69	152,28	11,02	67,64
300	8,44	7,56	58,89	2,52	22,72	28,23	32,92	122,82	4,42	28,83
480	0,00	0,00	32,09	0,00	5,41	3,79	5,01	71,17	0,00	6,64
720	0,00	0,00	12,21	0,00	0,00	0,00	0,00	36,63	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,21	0,00	0,00

<b>Patient 07</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	333,81	47,43	198,22
R-Omeprazol, single dose	300,67	47,32	181,54
Omeprazolsulfon, single dose	618,15	181,52	134,30
S-5OH-Omeprazol, single dose	49,94	65,24	23,67
R-5OH-Omeprazol, single dose	385,70	80,57	152,06
S-Omeprazol, multiple dose	558,58	64,68	240,80
R-Omeprazol, multiple dose	610,04	68,04	250,22
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.099,47	254,83	178,99
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	58,15	95,32	20,68
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	352,10	89,21	106,97

Rohdaten

<b>Patient 08, IM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,32	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,58	0,00	0,00
40	18,39	14,88	0,00	0,00	7,80	0,00	0,00	12,53	0,00	0,00
60	153,38	128,60	19,85	10,84	74,69	0,00	0,00	12,00	0,00	0,00
90	163,90	129,07	39,27	13,08	101,23	6,19	5,89	15,11	0,00	1,73
120	170,11	141,05	41,59	14,16	113,43	14,67	13,57	14,25	0,00	5,13
180	101,93	79,48	54,29	9,13	85,36	27,03	25,42	19,73	1,41	11,24
300	57,13	42,11	48,87	5,39	45,58	158,14	147,31	54,28	9,88	66,79
480	18,54	12,32	39,98	1,79	18,47	121,79	118,65	85,51	7,80	56,25
720	0,00	0,00	24,49	0,00	2,90	17,88	17,56	91,55	1,30	14,94
1440	0,00	0,00	3,53	0,00	0,00	0,00	0,00	39,16	0,00	0,00

<b>Patient 08</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	640,73	115,91	170,11
R-Omeprazol, single dose	496,93	105,52	141,05
Omeprazolsulfon, single dose	451,69	270,17	54,29
S-5OH-Omeprazol, single dose	35,60	123,65	14,16
R-5OH-Omeprazol, single dose	482,11	115,02	113,43
S-Omeprazol, multiple dose	912,02	129,77	158,14
R-Omeprazol, multiple dose	869,89	132,77	147,31
Omeprazolsulfon, multiple dose	682,17	-	91,55
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	56,73	139,43	9,88
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	415,32	188,80	66,79

Rohdaten

Patient 09, EM (20 mg Omeprazol)						Konzentrationen				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68	64,78	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64	54,29	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	285,53	277,13	99,08	10,91	41,26
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	746,75	736,83	232,78	29,58	121,20
90	55,02	47,47	15,39	2,75	16,75	575,79	586,80	263,27	24,63	110,35
120	761,76	682,00	248,65	39,43	219,75	425,35	445,56	270,66	20,24	97,35
180	343,94	306,45	248,00	25,55	153,78	270,02	316,78	314,52	14,68	73,03
300	115,58	116,52	291,27	10,08	67,55	132,92	183,71	243,37	7,37	42,00
480	32,10	35,94	248,92	3,10	23,20	52,12	85,93	198,71	3,28	21,87
720	5,79	7,66	225,58	0,00	6,83	11,70	24,44	130,63	1,40	8,90
1440	0,00	0,00	45,61	0,00	0,00	0,00	0,00	44,08	0,00	0,00

Patient 09	AUC [ng*h/ml]	HWZ [min]	Cmax [ng/ml]
S-Omeprazol, single dose	1.527,63	97,23	761,76
R-Omeprazol, single dose	1.427,31	106,99	682
Omeprazolsulfon, single dose	2.616,74	1159,50	291,27
S-5OH-Omeprazol, single dose	105,34	97,78	39,43
R-5OH-Omeprazol, single dose	667,58	127,50	219,75
S-Omeprazol, multiple dose	1.959,35	120,15	746,75
R-Omeprazol, multiple dose	2.314,26	146,00	736,83
Omeprazolsulfon, multiple dose	2.531,12	440,84	314,52
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	98,29	176,26	29,58
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	501,79	187,48	121,2

Rohdaten

<b>Patient 12, IM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,73	0,00	0,00
20	10,01	5,75	0,00	0,00	6,72	0,00	0,00	4,12	0,00	0,00
40	65,41	41,83	18,05	9,26	72,92	175,09	136,02	49,29	15,09	90,50
60	87,57	53,88	28,00	12,14	102,43	387,85	303,46	133,45	31,39	201,35
90	48,73	27,53	27,30	8,38	76,90	376,26	285,01	142,23	30,40	201,04
120	23,93	12,33	21,07	4,99	50,75	274,25	188,09	177,12	25,06	164,35
180	7,49	3,40	16,46	2,08	25,14	120,43	81,33	168,47	14,32	98,67
300	0,00	0,00	7,81	0,00	6,00	29,87	18,28	117,62	4,63	32,02
480	0,00	0,00	3,13	0,00	2,60	4,23	2,43	70,98	0,00	7,22
720	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,02	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	4,22	0,00	2,04	0,00	0,00	2,68	0,00	0,00

<b>Patient 12</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	115,53	33,59	87,57
R-Omeprazol, single dose	66,66	29,92	53,88
Omeprazolsulfon, single dose	102,43	515,98	28,00
S-5OH-Omeprazol, single dose	19,26	46,49	12,14
R-5OH-Omeprazol, single dose	207,96	266,74	102,43
S-Omeprazol, multiple dose	885,49	62,23	387,85
R-Omeprazol, multiple dose	632,80	59,43	303,46
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.128,23	208,73	177,12
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	85,29	73,85	31,39
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	415,32	80,13	201,35



Rohdaten

Patient 13, EM (2 x 40 mg Omeprazol)						Konzentrationen				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,35	13,86	81,85	4,93	40,31
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,72	12,99	79,50	4,62	31,24
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1292,57	1245,03	396,05	91,92	480,67
60	0,00	0,00	0,00	0,00	7,24	841,88	806,43	415,65	74,91	420,87
90	0,00	0,00	0,00	0,00	3,49	549,25	489,53	426,18	56,58	337,75
120	4,69	0,00	3,52	0,00	18,09	386,08	338,33	489,47	44,62	288,02
180	142,37	72,30	162,11	40,11	464,26	171,75	141,19	396,76	25,34	171,42
300	24,63	14,68	40,36	9,28	118,53	33,96	25,26	256,23	7,71	54,83
480	0,00	0,00	6,49	0,00	19,07	3,55	2,54	133,52	1,72	11,28
720	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27	0,00	0,00	47,07	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	9,83	0,00	22,46	14,96	10,59	85,85	4,07	39,13

Patient 13	AUC [ng*h/ml]	HWZ [min]	Cmax [ng/ml]
S-Omeprazol, single dose	278,66	-	142,37
R-Omeprazol, single dose	145,15	-	72,30
Omeprazolsulfon, single dose	369,43	64,89	162,11
S-5OH-Omeprazol, single dose	83,36	-	40,11
R-5OH-Omeprazol, single dose	1.082,38	73,83	464,26
S-Omeprazol, multiple dose	1.716,44	53,13	1.292,57
R-Omeprazol, multiple dose	1.544,70	50,97	1.245,03
Omeprazolsulfon, multiple dose	2.724,39	178,57	489,47
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	189,66	76,14	91,92
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	1.173,33	76,67	480,67

Rohdaten

Patient 14, IM (20 mg Omeprazol)						Konzentrationen				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,58	51,95	0,00	1,59
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,17	4,59	48,81	0,00	1,59
40	31,08	29,52	4,02	0,00	5,17	418,67	414,20	110,41	14,69	43,50
60	361,90	365,24	94,39	20,07	105,07	433,42	481,16	160,94	20,71	80,37
90	280,45	291,05	117,64	17,29	101,58	332,78	381,33	160,20	15,86	68,87
120	252,60	262,69	146,65	17,07	107,45	275,53	326,54	188,09	14,37	67,69
180	156,44	172,94	142,07	11,37	85,69	201,55	256,52	190,39	11,21	59,61
300	53,15	64,57	126,76	4,80	42,19	112,77	153,39	171,33	7,22	41,34
480	15,96	21,86	106,45	1,83	16,06	36,78	65,26	154,56	2,88	21,98
720	5,82	7,75	79,69	0,00	5,98	12,76	25,33	116,08	1,30	10,76
1440	0,00	0,00	19,90	0,00	0,00	0,00	0,00	41,78	0,00	0,00

Patient 14	AUC [ng*h/ml]	HWZ [min]	Cmax [ng/ml]
S-Omeprazol, single dose	927,11	106,47	361,90
R-Omeprazol, single dose	1.018,68	114,89	365,24
Omeprazolsulfon, single dose	1.271,74	387,58	146,65
S-5OH-Omeprazol, single dose	65,32	111,39	20,07
R-5OH-Omeprazol, single dose	479,42	140,62	107,45
S-Omeprazol, multiple dose	1.434,86	132,27	433,42
R-Omeprazol, multiple dose	1.825,87	160,05	481,16
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.837,45	503,84	190,39
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	79,88	169,97	20,71
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	425,54	216,76	80,37

Rohdaten

<b>Patient 15, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	45,06	48,87	222,09	5,70	38,91
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,04	39,99	222,29	4,62	33,15
40	18,68	15,30	7,72	1,99	22,20	430,05	395,03	262,23	18,48	84,53
60	137,21	108,24	51,93	21,56	197,26	1342,21	1348,03	553,76	67,29	269,85
90	90,11	66,23	43,50	14,68	152,02	957,57	1010,87	569,96	54,92	224,06
120	67,74	49,91	40,24	12,84	139,71	697,71	787,82	592,13	41,41	193,46
180	19,43	11,46	26,30	4,08	56,75	453,40	560,35	641,29	29,55	146,59
300	238,85	187,72	110,44	34,41	296,63	208,68	288,92	609,29	15,78	88,19
480	54,49	40,85	75,78	9,51	90,28	57,52	86,12	467,94	6,84	46,57
720	3,06	0,00	24,98	0,00	10,67	7,41	11,05	251,36	0,00	9,54
1440	24,04	16,48	142,51	3,96	34,19	15,48	17,42	257,17	2,69	22,90

<b>Patient 15</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	982,83	66,25	238,85
R-Omeprazol, single dose	750,61	-	187,72
Omeprazolsulfon, single dose	707,05	192,67	110,44
S-5OH-Omeprazol, single dose	152,11	-	34,41
R-5OH-Omeprazol, single dose	1.435,12	86,97	296,63
S-Omeprazol, multiple dose	3.147,79	92,02	1342,21
R-Omeprazol, multiple dose	3.702,41	98,90	1348,03
Omeprazolsulfon, multiple dose	5.785,20	324,79	641,29
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	203,15	142,65	67,29
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	1.038,57	143,93	269,85

Rohdaten

<b>Patient 16, EM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,31	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,03	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,65	0,00	0,00
60	78,69	63,09	31,38	11,67	86,70	336,44	316,05	88,68	30,45	156,83
90	185,10	142,72	86,95	27,96	182,13	318,23	305,93	174,91	30,51	183,80
120	165,80	121,04	119,65	25,91	197,61	195,30	177,63	133,56	22,28	146,48
180	56,60	37,30	77,02	13,74	118,94	104,62	88,28	160,03	13,16	93,71
300	9,81	5,99	46,37	3,23	35,46	30,21	22,91	93,81	4,63	34,48
480	0,00	0,00	18,51	0,00	5,35	5,48	3,80	74,01	0,00	6,74
720	0,00	0,00	6,04	0,00	0,00	0,00	0,00	37,63	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,85	0,00	0,00

<b>Patient 16</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	359,37	44,57	185,1
R-Omeprazol, single dose	259,56	42,03	142,72
Omeprazolsulfon, single dose	454,72	145,60	119,65
S-5OH-Omeprazol, single dose	67,01	59,56	27,96
R-5OH-Omeprazol, single dose	561,46	66,96	197,61
S-Omeprazol, multiple dose	698,54	69,85	336,44
R-Omeprazol, multiple dose	621,92	65,02	316,05
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.036,16	275,63	174,91
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	76,07	79,44	30,51
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	518,00	78,79	183,8

Rohdaten

<b>Patient 18, EM (2x 40 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	361,62	0,00	0,00	104,18	121,81	343,72	11,35	56,14
20	0,00	0,00	191,14	0,00	0,00	87,00	102,88	310,72	10,40	47,44
40	0,00	0,00	267,03	0,00	0,00	82,99	98,46	357,79	8,78	41,93
60	0,00	0,00	256,55	0,00	0,00	92,83	103,10	320,05	10,52	43,47
90	51,51	43,80	216,09	4,86	7,07	204,51	197,60	303,18	15,61	57,83
120	217,05	193,44	203,37	11,01	36,14	431,18	387,15	305,24	22,77	82,41
180	444,79	412,70	250,05	26,54	91,19	776,48	746,31	363,68	42,08	138,11
300	814,47	822,96	364,93	43,39	139,07	419,04	482,95	484,72	36,77	121,87
480	324,61	376,44	458,08	30,14	99,48	173,45	233,71	509,92	18,33	73,34
720	83,48	124,63	410,03	11,33	52,14	34,65	54,88	422,29	6,14	30,43
1440	33,72	48,60	449,12	7,04	30,14	50,45	67,71	337,62	8,80	35,77

<b>Patient 18</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	4.195,01	127,50	814,47
R-Omeprazol, single dose	4.410,24	154,03	822,96
Omeprazolsulfon, single dose	4.291,25	-	458,08
S-5OH-Omeprazol, single dose	287,13	213,63	43,39
R-5OH-Omeprazol, single dose	967,58	294,32	139,07
S-Omeprazol, multiple dose	3.427,03	120,99	776,48
R-Omeprazol, multiple dose	3.774,11	143,40	746,31
Omeprazolsulfon, multiple dose	5.180,68	-	509,92
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	269,00	162,04	42,08
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	977,33	208,58	138,11

Rohdaten

<b>Patient 20, EM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,68	0,00	0,00
40	17,62	16,57	6,95	1,29	21,40	0,00	0,00	4,01	0,00	0,00
60	188,44	183,46	75,24	24,67	199,69	31,51	28,53	9,88	1,80	13,73
90	165,09	144,40	129,50	20,14	185,34	268,40	259,43	123,92	22,34	167,08
120	100,10	81,73	127,23	13,71	139,71	207,19	187,02	123,75	19,07	128,53
180	36,44	25,45	74,68	5,92	74,93	67,47	51,99	120,32	7,61	63,90
300	7,87	5,01	42,02	1,22	26,48	64,85	51,86	111,27	6,53	51,44
480	0,00	0,00	24,59	0,00	4,76	12,15	7,31	89,26	0,00	15,68
720	0,00	0,00	9,68	0,00	0,00	0,00	0,00	41,32	0,00	2,63
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,90	0,00	0,00

<b>Patient 20</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	317,01	48,07	188,44
R-Omeprazol, single dose	266,82	44,50	183,46
Omeprazolsulfon, single dose	516,60	187,99	129,5
S-5OH-Omeprazol, single dose	43,08	51,76	24,67
R-5OH-Omeprazol, single dose	483,73	74,22	199,69
S-Omeprazol, multiple dose	608,68	93,69	268,4
R-Omeprazol, multiple dose	515,20	81,81	259,43
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.016,45	519,33	123,92
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	53,97	114,54	22,34
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	470,32	97,64	167,08

Rohdaten

<b>Patient 21, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,61	22,34	51,02	5,69	40,05
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,82	14,06	85,38	4,61	30,23
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,21	12,72	143,55	4,55	24,55
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,77	16,91	102,39	4,06	23,95
90	2,83	0,00	0,00	0,00	2,87	51,33	43,38	149,80	6,32	36,58
120	6,03	3,87	2,84	0,00	11,96	88,59	77,48	157,62	9,38	58,02
180	112,67	78,26	45,98	22,75	196,35	48,68	38,54	173,23	6,91	42,29
300	57,36	35,14	62,32	18,38	166,46	74,98	60,43	145,48	8,22	59,67
480	16,17	9,37	33,56	4,93	57,45	76,44	65,22	115,52	9,09	55,02
720	0,00	0,00	15,67	0,00	12,28	126,26	116,56	162,06	15,08	93,17
1440	14,57	8,08	99,72	3,90	37,52	19,94	22,51	370,40	4,60	32,69

<b>Patient 21</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	374,93	106,38	112,67
R-Omeprazol, single dose	240,94	97,68	78,26
Omeprazolsulfon, single dose	375,68	211,27	62,32
S-5OH-Omeprazol, single dose	97,34	131,47	22,75
R-5OH-Omeprazol, single dose	946,69	111,46	196,35
S-Omeprazol, multiple dose	900,41	-	126,26
R-Omeprazol, multiple dose	769,79	-	116,56
Omeprazolsulfon, multiple dose	1.672,77	-	173,23
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	108,78	-	15,08
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	688,20	-	93,17

Rohdaten

<b>Patient 23, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,39	15,01	272,11	0,00	3,90
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,19	14,09	285,87	0,00	3,45
40	93,13	93,41	25,07	3,97	22,24	13,56	22,52	235,92	0,00	4,47
60	777,83	774,60	149,50	32,51	136,23	27,14	34,56	234,29	0,00	5,03
90	862,93	923,60	315,71	39,00	187,48	36,20	45,90	283,66	2,64	7,59
120	658,87	737,25	315,59	35,09	165,00	538,98	550,64	331,39	19,69	52,95
180	453,52	563,12	401,92	24,24	127,32	800,31	923,28	527,66	35,05	105,57
300	222,65	328,86	423,25	13,62	74,43	353,29	566,14	607,71	19,41	76,41
480	74,15	142,35	386,04	4,37	36,76	111,12	261,24	591,14	7,35	41,32
720	17,85	45,38	275,68	1,40	14,71	22,90	82,88	415,11	2,18	18,25
1440	95,05	181,67	343,51	6,05	37,45	53,42	143,67	520,19	5,86	29,67

<b>Patient 23</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	2.815,60	115,26	862,93
R-Omeprazol, single dose	3.627,16	146,91	923,6
Omeprazolsulfon, single dose	4.029,23	665,58	423,25
S-5OH-Omeprazol, single dose	149,32	128,60	39,0
R-5OH-Omeprazol, single dose	817,29	179,67	187,48
S-Omeprazol, multiple dose	2.958,14	106,34	800,31
R-Omeprazol, multiple dose	4.345,49	151,14	923,28
Omeprazolsulfon, multiple dose	5.917,02	738,90	607,71
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	147,26	134,09	35,05
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	579,38	203,32	105,57



Rohdaten

<b>Patient 24, EM (2 x 40 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	39,36	17,78	142,20	9,25	69,55
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	29,68	13,73	116,75	6,98	56,64
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,16	12,10	113,29	6,38	49,93
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,44	8,19	109,07	4,85	42,17
90	3,19	0,00	0,00	0,00	7,01	35,00	22,82	114,60	6,63	46,05
120	14,51	7,02	6,31	3,37	44,89	548,47	454,96	223,21	51,02	308,57
180	310,48	186,62	38,64	63,88	534,17	529,36	421,20	314,00	56,33	361,23
300	103,99	53,93	32,21	31,87	353,86	196,60	136,43	289,51	30,60	197,42
480	9,30	4,29	11,41	3,99	80,75	46,80	28,36	207,83	10,08	69,35
720	0,00	0,00	2,81	0,00	12,79	6,89	3,59	126,23	2,10	17,49
1440	2,84	0,00	16,92	0,00	34,08	6,30	0,00	126,98	2,34	14,69

<b>Patient 24</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	770,71	58,60	310,48
R-Omeprazol, single dose	435,05	54,61	186,62
Omeprazolsulfon, single dose	188,79	119,32	38,64
S-5OH-Omeprazol, single dose	191,98	73,54	63,88
R-5OH-Omeprazol, single dose	2.031,30	87,82	534,17
S-Omeprazol, multiple dose	1.924,87	86,87	548,47
R-Omeprazol, multiple dose	1.446,91	80,05	454,96
Omeprazolsulfon, multiple dose	2.545,12	349,75	314,0
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	250,04	108,52	56,33
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	1.632,16	120,15	361,23

Rohdaten

<b>Patient 25, EM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	68,91	52,93	8,66	7,10	47,01
120	6,63	4,41	0,00	0,00	14,08	97,70	66,43	54,57	17,47	146,42
180	0,00	0,00	0,00	0,00	7,11	30,25	16,26	41,79	6,99	73,22
300	48,24	29,64	40,11	12,78	147,96	24,06	13,24	49,46	5,66	56,75
480	0,00	0,00	8,34	0,00	16,22	0,00	0,00	16,87	0,00	7,81
720	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	4,38	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<b>Patient 25</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	125,57	-	48,24
R-Omeprazol, single dose	77,41	-	29,64
Omeprazolsulfon, single dose	129,47	-	40,11
S-5OH-Omeprazol, single dose	31,95	-	12,78
R-5OH-Omeprazol, single dose	451,89	68,19	147,96
S-Omeprazol, multiple dose	213,25	99,80	97,70
R-Omeprazol, multiple dose	133,77	87,46	66,43
Omeprazolsulfon, multiple dose	299,39	120,27	54,57
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	41,29	123,38	17,47
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	412,35	90,10	146,42

Rohdaten

<b>Patient 27, EM (20 mg Omeprazol)</b>						<b>Konzentrationen</b>				
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	187,37	126,89	110,87	38,06	318,09
60	5,42	2,90	0,00	0,00	8,51	111,19	65,17	97,85	25,63	254,88
90	24,03	12,79	8,61	4,91	60,25	48,89	25,12	67,56	14,05	162,29
120	12,11	6,20	8,08	2,67	44,79	24,79	12,83	50,18	8,84	116,17
180	36,01	20,06	16,19	9,42	109,70	8,37	3,97	26,12	3,13	60,07
300	36,88	19,47	24,52	9,52	130,95	5,45	2,87	15,38	0,00	27,77
480	0,00	0,00	4,10	0,00	16,41	0,00	0,00	4,19	0,00	3,78
720	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<b>Patient 27</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	169,58	-	36,88
R-Omeprazol, single dose	91,03	-	20,06
Omeprazolsulfon, single dose	110,30	-	24,52
S-5OH-Omeprazol, single dose	42,39	-	9,52
R-5OH-Omeprazol, single dose	619,63	65,26	130,95
S-Omeprazol, multiple dose	178,68	50,80	187,37
R-Omeprazol, multiple dose	105,20	48,16	126,89
Omeprazolsulfon, multiple dose	241,97	101,04	110,87
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	41,87	41,33	38,06
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	554,63	71,26	318,09

Rohdaten

<b>Patient 28, IM (20 mg Omeprazol)</b>			<b>Konzentrationen</b>							
Zeitpunkt [min]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]	S-Omeprazol [ng/ml]	R-Omeprazol [ng/ml]	Omeprazol-sulfon [ng/ml]	S-5OH-Omeprazol [ng/ml]	R-5OH-Omeprazol [ng/ml]
Tag 1 (single dose)						Tag 15 (multiple dose)				
-10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,38	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,86	0,00	0,00
40	87,36	71,75	15,18	9,91	55,05	66,15	57,72	16,53	5,50	29,09
60	319,91	257,41	219,41	39,45	262,00	374,02	317,52	76,33	30,68	179,68
90	158,93	100,31	230,51	21,51	160,78	339,23	284,43	187,42	31,01	182,43
120	Blutabnahme nicht möglich					276,25	210,28	129,36	26,33	166,03
180	59,21	33,88	138,62	11,43	83,32	121,90	79,86	53,54	14,64	95,09
300	8,01	4,05	92,27	2,39	19,79	30,78	19,62	117,14	4,95	32,62
480	0,00	0,00	35,02	0,00	3,64	5,41	2,88	48,39	1,33	7,41
720	0,00	0,00	4,19	0,00	0,00	0,00	0,00	44,66	0,00	1,35
1440	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,72	0,00	0,00

<b>Patient 28</b>	<b>AUC [ng*h/ml]</b>	<b>HWZ [min]</b>	<b>Cmax [ng/ml]</b>
S-Omeprazol, single dose	409,20	46,83	319,91
R-Omeprazol, single dose	274,16	42,14	257,41
Omeprazolsulfon, single dose	897,64	93,14	230,51
S-5OH-Omeprazol, single dose	63,73	62,55	39,45
R-5OH-Omeprazol, single dose	465,43	68,65	262,0
S-Omeprazol, multiple dose	789,08	64,10	374,02
R-Omeprazol, multiple dose	596,30	62,77	317,52
Omeprazolsulfon, multiple dose	1059,79	237,63	187,42
S-5OH-Omeprazol, multiple dose	85,41	84,11	31,01
R-5OH-Omeprazol, multiple dose	529,36	86,76	182,43

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Frau Prof. Dr. med. Dr. h. c. Stefanie M. Bode-Böger am Institut für Klinische Pharmakologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

- Frau Prof. Dr. Stefanie M. Bode-Böger für ihre ausgezeichnete fachliche und menschliche Betreuung, sowie für die interessante Aufgabenstellung, die Anregungen und vielfältige Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. Andreas Langner für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Herrn Dr. Uwe Träger für seine vielfältige fachliche und moralische Unterstützung. Mit Hilfe seiner Betreuung und seinem Engagement trug er wesentlich zum Zustandekommen dieser Dissertation bei.
- Herrn Dr. Jens Martens-Lobenhoffer für seine hervorragenden Ideen und fachliche Unterstützung bei der Durchführung und Entwicklung der Analytik.
- allen Mitarbeitern der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, insbesondere Frau Dr. Ulrike von Arnim, Herrn Dr. Arne Kandulski, Herrn Dr. Sven Kolfenbach, Herrn Prof. Dr. Peter Malfertheiner, Herrn Dr. Klaus Mönkemüller, Herrn Dr. Helmut Neumann und Herrn Dr. Jochen Weigt für die Rekrutierung der Patienten und die Durchführung aller gastroenterologischen Untersuchungen.
- Frau Dr. Sibylle Jakubiczka für die Durchführung der CYP2C19-Genotypisierung.
- Frau Martina Leucke für die Hilfe bei der Betreuung der Studienpatienten.
- Frau Dagmar Ratzmann für die tatkräftige Unterstützung bei der Aufbereitung und Analyse des Probenmaterials.
- Frau Regina Kubla für ihre schnelle Hilfe bei vermeintlich unauffindbarer Literatur.
- allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Magdeburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die fachliche und menschliche Unterstützung sowie die schöne Zeit in Magdeburg, an die ich mich immer gern zurück erinnere.
- allen Patienten für die Bereitschaft zur Teilnahme an der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie.
- meiner Familie und meinen Freunden, die alle auf Ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen habe

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Ines Reiche  
 Anschrift: Alter Bahnhof 3  
 06237 Leuna OT Zöschen  
 Geburtsdatum: 01.02.1982  
 Geburtsort: Merseburg  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1988 – 1991 POS „Bertold Brecht“, Zöschen  
 1991 – 1992 Grundschule Wallendorf, Zöschen  
 1992 – 2000 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Merseburg  
 01.07.2000 Abitur

### Beruflicher Werdegang

10/2000 – 11/2004 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Gesamtnote: 2,32)  
 12/2004 – 05/2005 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Prädikat: sehr gut)  
Thema: Herstellung und Charakterisierung von polymerstabilisierten Nanokapseln; Technologie, Prof. Dr. Mäder  
 06/2005 – 12/2005 Pharmaziepraktikum in der Neuen Apotheke  
 23.02.2006 Approbation als Apothekerin  
 seit 01.04.2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion) am Institut für Klinische Pharmakologie der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg  
Thema: Stereoselektive Pharmakokinetik und CYP2C19-Genotypisierung als Prädiktoren des Therapieerfolges einer Omeprazol-Therapie bei Patienten mit GERD, Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens  
 seit 01.04.2008 Fernstudium „Management im Gesundheitswesen“ an der Hochschule Magdeburg-Stendal (Masterstudiengang, FB Wirtschaft)  
 seit 01.04.2010 Apothekerin (Schwerpunkt: Arzneimittelinformation, Stationsapothekerin) am Klinikum Chemnitz gGmbH  
 seit August 2010 Weiterbildung zum Fachapotheker für Klinische Pharmazie

## Publikationen

Reiche I, Westphal S, Martens-Lobenhoffer J, Tröger U, Luley C, Bode-Böger SM. Pharmacokinetics and dose recommendations of Niaspan® in chronic kidney disease and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26: 276-82

Tröger U, Reiche I, Jepsen MS, Huth C, Bode-Böger SM. Esomeprazole-induced rhabdomyolysis in a patient with heart failure. *Intensive Care Med*. 2010; 36: 1278-9

Reiche I, Tröger U, Martens-Lobenhoffer J, Kandulski A, Neumann H, Malfertheiner P, Bode-Böger SM. Omeprazole-induced cough in a patient with gastroesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22: 880-2

Reiche I, Tröger U, Postel SC, Wolf R, Bode-Böger SM. Valproic acid-induced myopathy in a patient with schizoaffective disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2009; 29: 402-3

Martens-Lobenhoffer J, Reiche I, Tröger U, Mönkemüller K, Malfertheiner P, Bode-Böger SM. Enantioselective quantification of omeprazole and its main metabolites in human serum by chiral HPLC-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 857: 301-7. Erratum in: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 859: 289.

Pretz C, Rube A, Reiche I, Hause G, Mäder K. Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomedicine*. 2008; 4: 106-14.

## Posterpräsentationen

Reiche I, Tröger U, Mönkemüller K, Kandulski A, Neumann H, Weigt J, Bode-Böger SM. Stereoselective pharmacokinetic and CYP2C19-genotyping as outcome predictors of omeprazole therapy for gastroesophageal reflux disease (GERD) – a pilot clinical trial (phase IV). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009; 379: 92.

Tröger U, Reiche I, Postel C, Bode-Böger SM. Identification of increased serum concentrations of linezolid in patients with common predisposing risk factors for adverse drug reaction by synergistic use of clinical pharmacological ward rounds and therapeutic drug monitoring (TDM). *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68: 7.

Reiche I, Postel SC, Tröger U, Bode-Böger SM. Qualitätsmanagement der Pharmakotherapie am Universitätsklinikum Magdeburg – Therapieoptimierung, Vermeidung von UAW und Kostensenkung durch klinisch-pharmakologische Visiten. 2. Deutscher Kongress für Patientensicherheit bei medikamentöser Therapie, Bonn 2007.

Zöschen, den 01.08.2011

Ines Reiche

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Stereoselektive Pharmakokinetik und CYP2C19-Genotypisierung als Prädiktoren des Therapieerfolges einer Omeprazol-Therapie bei Patienten mit GERD, Entwicklung eines neuen Analyseverfahrens“ eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Sie hat bislang weder in Teilen noch als Ganzes einem Promotionsverfahren zugrunde gelegen.

Zöschen, den 01.08.2011

.....

Ines Reiche