

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 19, 1981, pp. 25–30

## Zur Biotransformation von Zipeprol (Mirsol®)\* beim Menschen: Gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen mit Ammoniak als selektivem Reaktandgas

Von W. Gielsdorf und P. Toffel-Nadolny

Direktion Polizeitechnische Untersuchungen Berlin (West)

(Eingegangen am 21. März/5. August 1980)

**Zusammenfassung:** Nach oraler Applikation von Zipeprol (Mirsol®) wurden im menschlichen Harn neben der unveränderten Ausgangsverbindung neun Abbauprodukte nachgewiesen; sechs Metabolite konnten hinsichtlich ihrer chemischen Struktur aufgeklärt werden.

Alle sechs Metabolite wurden im alkalischen Urinextrakt nachgewiesen; nach Säurespaltung konnte das N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin — als Artefakt — beobachtet werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erfolgt die Biotransformation des Zipeprol überwiegend nach den folgenden drei Abbauebenen:

1. Spaltung der  $\alpha$ -Bindung, die zu Metabolit M4 führt;
2. Spaltung der exocyclischen N-C-Bindung des Piperazinringes, die zu den Metaboliten M3, M4 und M6 führt;
3. Benzylspaltung zu Benzylalkohol (M1); Oxidation zu 2-Hydroxy-2-phenyllessigsäure (Mandelsäure, M2).

### *Biotransformation of Zipeprol (Mirsol®) in humans.*

#### *Gas chromatographic/mass spectrometric studies, using ammonia as a selective reactant gas*

**Summary:** After oral application of Zipeprol (Mirsol®) the unchanged drug and nine degradation products were detected in human urine; six of them could be identified.

All identified metabolites were detected in the alkaline urine fraction; after acid hydrolysis N-(2-hydroxyethyl)-piperazine was found as an artifact.

With respect to the presented results, biotransformation of Zipeprol in man mainly follows three degradation routes:

1.  $\alpha$ -cleavage leading to metabolite M4;
2. cleavage of the exocyclic N-C-bond of the piperazine ring leading to metabolites M3, M5, M6;
3. benzylic cleavage leading to benzylalcohol (M1); oxidation leading to 2-hydroxy-2-phenylacetic acid (mandelic acid, M2).

### Einführung

Zipeprol (Mirsol®, 1-(2-Methoxy-2-phenylethyl)-4-(2-hydroxy-3-methoxy-3-phenylpropyl)-piperazin-dihydrochlorid) gewinnt aufgrund der bekannten Einschränkungen für die Verordnung von Codein steigende medizinische Bedeutung als hustendämpfendes, expektorationsförderndes Bronchosekretolytikum.

Die Biotransformation im menschlichen und tierischen Organismus wurde bereits zwischen 1976 und 1978 von Constantin & Pognat (1) sowie Beckett & Achari (2) untersucht, wobei sie die aus dem menschlichen Harn isolierten Abbauprodukte mittels chromatographischer und

spektroskopischer Analysenmethoden charakterisierten. Danach entstehen die Hauptmetaboliten durch N-Desalkylierung, Oxidation, Hydroxylierung und Methylierung der Ausgangsverbindung.

Das Ziel unserer Arbeit war, eine rasche und zuverlässige qualitative Bestimmungsmethode im biologischen Material (Urin) zu entwickeln; außerdem sollte der Stoffwechsel des Zipeprols im menschlichen Organismus aufgeklärt werden.

### Methodik

Zwei gesunde männliche Probanden erhielten jeweils drei Tage lang zweimal täglich je 2 Tabletten Mirsol® (entsprechend 300 mg pro Tag).

\* in Frankreich: Respile®<sup>®</sup>, Winthrop, Clichy, Bd. Victor-Hugo  
in der Schweiz: Mirsol®, Mepha AG, Neu-Aesch, Basel

Die Aufarbeitung des Harns erfolgte entsprechend dem bei l. c. (3) beschriebenen Weg, jedoch wurde auf die Bleiacetatfällung verzichtet.

#### Papierchromatographie

System nach *Jatzkewitz*: 2 Phasen (ml:v/v).

Unterphase: Ameisensäure/Wasser = 80/560;

Oberphase: *n*-Butanol = 960 (mit der Unterphase gesättigt);

Kammersättigung;

Papier: *Schleicher* und *Schüll* 2045b, nur in die Oberphase eintauchend (Akklimationierung 1 h).

$R_F$  Zipeprol-Base = 0,81.

$R_F$  Metaboliten: Die Metaboliten verteilen sich gleichmäßig über die gesamte Laufstrecke.

#### Dünnschichtchromatographie

Es wurden Fertig-Platten HF<sub>254</sub> der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Als Fließmittel dienten (ml:v/v):

I Methanol/Ammoniak 100/1

II Cyclohexan/Diethylamin 90/10

III Chloroform/Aceton 85/15

IV Benzol/Essigester/Diethylamin 70/20/10

V Benzol/Ethanol/Ammoniak 80/20/1

Die Platten wurden im Trockenschrank bei  $T = 80^\circ\text{C}$  etwa 45 min getrocknet, im kurz- und langwelligen UV-Licht betrachtet und mit *Dragendorff*-Reagenz (nach *Munier & Macheboeuf* für Alkaloide) angesprüht (4); es ergaben sich orangefarbene Flecken auf gelbem Grund.

Die  $R_F$ -Werte des Zipeprol in den Systemen I bis V betragen jeweils: 0,84; 0,54; 0,30; 0,82 und 0,70.

Die sauren Urinextrakte wurden ebenfalls im Fließmittel V chromatographiert; die Detektion erfolgte mit Bromkresolgrün.

Ferner wurde die alkalische Harn-Fraktion (mit und ohne Hydrolyse) in den Laufmittelsystemen I bis V getestet. Diese Ver-

gleichsuntersuchungen ergaben, daß im System V – Benzol/Ethanol/Ammoniak – die beste Auftrennung der Zipeprol-Metaboliten erfolgt.

Eine entsprechend aufgearbeitete Leerharnprobe ergab, daß im Leerharnextrakt keine mit *Dragendorff* anfärbare Flecken auf der DC-Platte auftraten. Der überwiegende Teil der Abbauprodukte tritt in der alkalischen Fraktion (ohne Hydrolyse) auf.

Zipeprol ist weiterhin mit dem Indikatorreagenz Bromkresolgrün anfärbbar (weiße Flecken auf blauem Grund).

Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die substanzhaltigen Zonen abgekratzt, die Substanz mit warmem Methanol eluiert, das Kieselgel abzentrifugiert und das Eluat in vacuo eingengt. Die DC-Platten wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung mit Methanol/Ammoniak vorentwickelt (5).

#### Massenspektrometrie

Erwartungsgemäß lieferte die *elektronenstoßinduzierte Fragmentierung* von Zipeprol wenig aussagekräftige Spektren, die durch die  $\alpha$ -Spaltprodukte  $m/e$  121 bzw.  $m/e$  263 und einen wenig intensiven  $M + 1$  peak ( $< 1\%$  relative Intensität) bei  $m/e$  383 gekennzeichnet waren (Abb. 1); die Metaboliten des Zipeprols verhielten sich unter diesen Bedingungen entsprechend.

Um eindeutige Massenspektren zu erhalten, wurde das Verfahren der *chemischen Ionisation* angewendet, das wesentlich schonendere Ionisationsbedingungen gewährleistet (6–8). So konnte neben dem ausgeprägten „Quasimolekülion“ der Masse  $M + 1$  ( $MH^+$ ) eine fast vollständige Unterdrückung der Fragmentbildung erreicht werden; der Anteil der Fragmentionen am Totalionenstrom betrug weniger als 5% (absolut).

Im Vergleich zu den häufig verwendeten Reaktandgasen Methan und *iso*-Butan führen die vergleichsweise schwächeren *Brønsted*-Säuren  $(NH_3)_nH^+$  ( $n = 1, 2, 3$ ) zu noch intensiveren protonierten Molekülionen bei gleichzeitiger Unterdrückung der Ionisation der im biologischen Material enthaltenen Begleit- und Ballaststoffe, saurer Verbindungen und Substanzen, die auf das Säulenbluten zurückzuführen sind (9, 10).

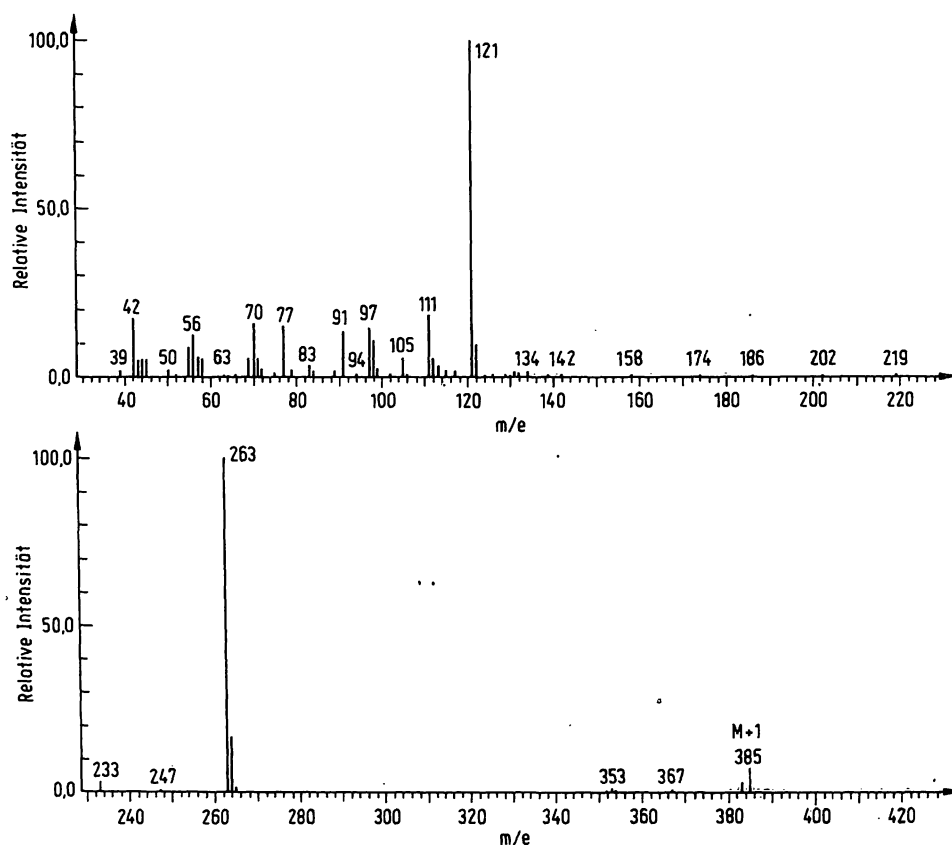


Abb. 1. Massenspektrum von Zipeprol, elektronenstoßinduzierte Fragmentierung.

Zusätzlich erhöht sich die Nachweisempfindlichkeit für basische Verbindungen, so daß sich das Aussehen des Massenspektrums durch die Wahl von Ionisierungsart und Reaktandgas leicht variieren läßt (11).

Zipeprol und seine Biotransformationsprodukte können als Modellverbindungen für die Anwendung der chemischen Ionisation mit Ammoniak als selektivem Reaktandgas zur Untersuchung basischer Arzneistoffe im biologischen Material dienen (Abb. 2).

Die Überlegenheit dieses Verfahrens zeigt sich besonders augenfällig an der Tatsache, daß einige Abbauprodukte nur mit Hilfe von Ammoniak als Reaktandgas nachweisbar sind, d. h. die Konzentrationen liegen bei Anwendung der Elektronenstoßionisation unterhalb der Nachweisgrenze.

#### Bedingungen für die GC/MS-Kombination

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Finnigan-Gerät Mod. 4023.

Trägergas: Helium 20 ml/min.

Reaktandgase für chemische Ionisation: Methan, *iso*-Butan, Ammoniak.

Quellendruck:  $1,5 \times 10^{-7}$  Torr (Elektronenstoßionisation)  
 $1,5 \times 10^{-5}$  Torr (chemische Ionisation)

Ionizer: 0,30 Torr (chemische Ionisation).

Temperatur von Einspritzblock, Ionenquelle: 250 °C.

Ofentemperatur: 100 °C für 1 min; Temperaturprogramm  
15 °C/min auf 280 °C, 10 min isotherm.

Elektronenenergie: 70 eV

Trennsäule: 4 ft.; Pyrex; 2 mm i.D.

Phase: 3% SP-2250 DB auf Supelcoport (100/120 mesh).

#### Ergebnisse und Diskussion

In den sauer extrahierten Urinen konnten erst *nach* Hydrolyse (Salzsäure) zwei Abbauprodukte des Zipeprols nachgewiesen werden. Nach Aufnahme von Vergleichsmassenspektren mit authentischem Material wurden die Metaboliten M1 und M2 als Benzylalkohol und Mandelsäure identifiziert; für Metabolit M2 wurde die physiologische Mandelsäurekonzentration berücksichtigt (12).

Die Hauptmenge der Abbauprodukte wurde erwartungsgemäß im alkalischen Extrakt gefunden.

Im alkalischen Extrakt ohne Hydrolyse wurden 6 Ausscheidungsprodukte nachgewiesen, u. a. geringe Mengen der unveränderten Ausgangsverbindung und der Hauptmetabolit M3, auf dessen GC-peak im Chromatogramm allein über 30% des Totalionenstromes entfallen!

M3, das 1-(2-Hydroxy-3-methoxy-3-phenyl)-propylpiperazin lieferte unter den Bedingungen der Elektronenstoßionisation, wie auch das Zipeprol selbst, nur ein uncharakteristisches Massenspektrum mit einem base-peak m/e 99 und einem Molpeak bei m/e 250 mit < 1% relativer Intensität (Abb. 3).

Außer dem Ion bei m/e 232 (das den Verlust von Wasser anzeigt), den Spaltprodukten des Piperazinringes m/e 56 und 44 und dem aus der Benzylspaltung resultierenden

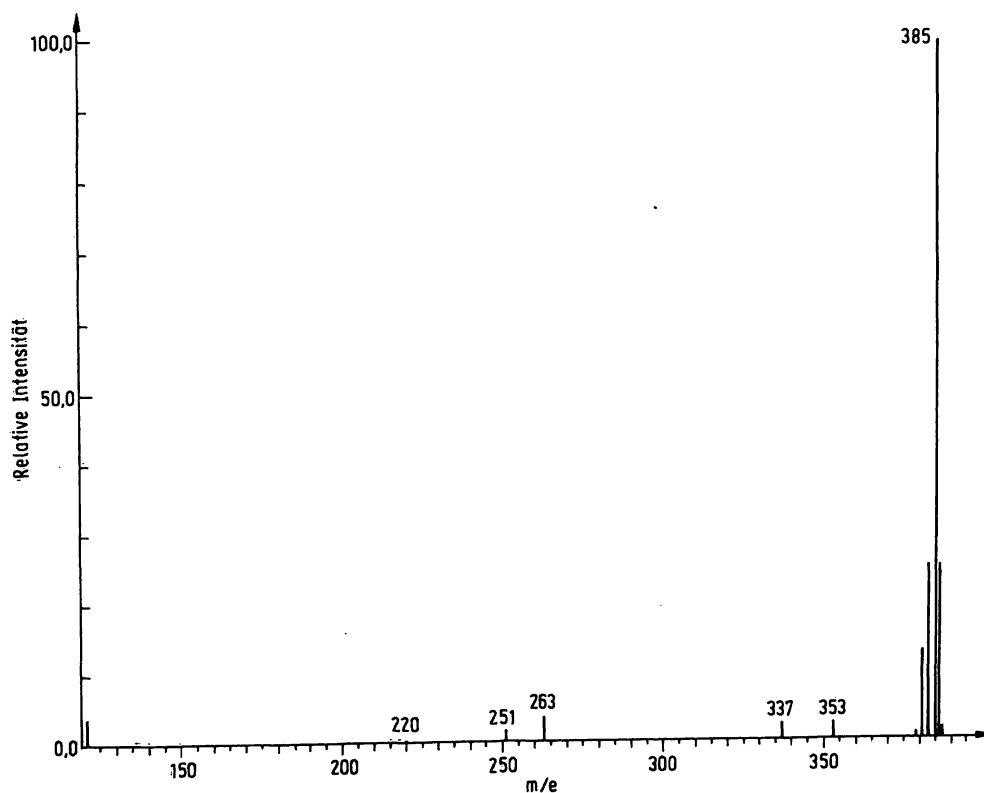


Abb. 2. Massenspektrum von Zipeprol, chemische Ionisation mit Ammoniak.

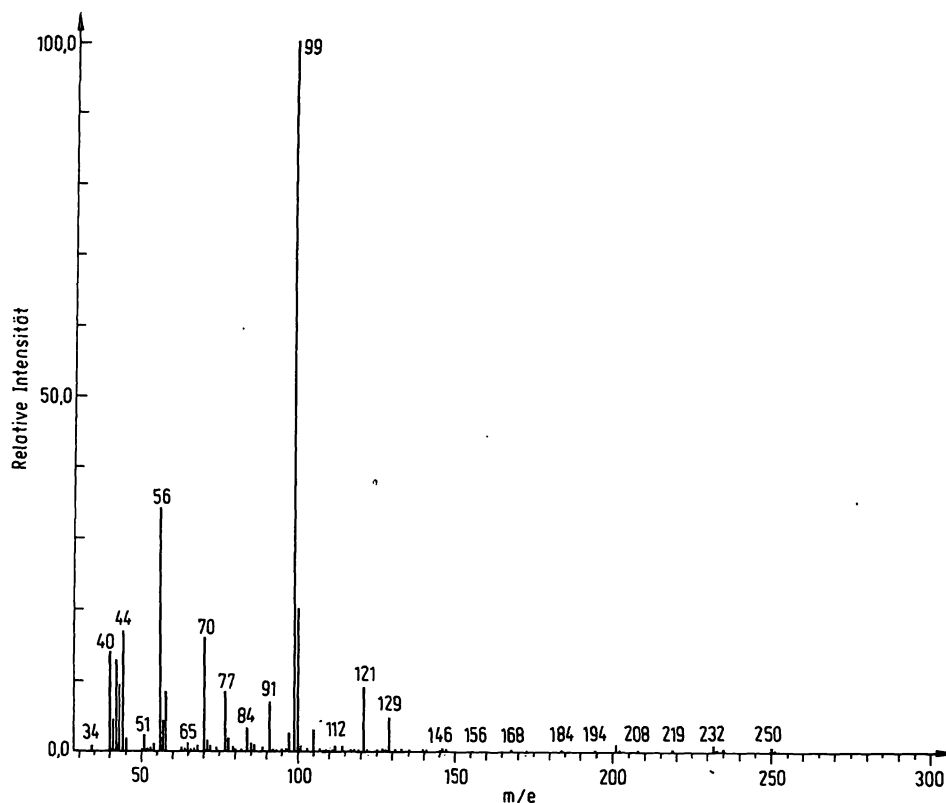


Abb. 3. Massenspektrum von Metabolit M3, elektronenstoßinduzierte Fragmentierung.

Ion  $m/e$  121 findet man nur wenige diagnostisch verwertbare Ionen.

Im Spektrum nach chemischer Ionisation mit  $\text{NH}_3$  ist neben dem  $\text{MH}^+$ -peak  $m/e$  251 (100% relative Intensität) noch das Fragmentation  $m/e$  219 ( $\text{MH}^+$ -32) als Indikator für die Methoxy-Funktion erwähnenswert.

Das schon im Zipeprol-Spektrum beobachtete  $\alpha$ -Spaltprodukt der Masse 263 konnte als Metabolit M4 ( $M_r = 264$ ) identifiziert werden.

Die Tatsache, daß die im Massenspektrometer induzierten chemischen Abbaureaktionen der Ausgangsverbindung durch Aufzeigen der „Schwachstellen“ im Molekül Hinweise auf potentielle Metaboliten liefern, ist in der Literatur ausführlich dokumentiert.

Die Massenspektren von M3 und M4 unterscheiden sich nur durch den mass shift des den Piperazin-Ring tragenden Bruchstückes der  $\alpha$ -Spaltung von  $m/e$  99 zu  $m/e$  113 ( $-\text{CH}_2-$ ) und lassen so eine eindeutige Strukturzuordnung zu.

Metabolit M5 wurde aufgrund seines Massenspektrums als 1-(2-Methoxy-2-phenyl)-ethylpiperazin erkannt.

Die Benzyl- bzw.  $\alpha$ -Spaltung liefert als die einzig wichtige Primär-Fragmentierung das den Phenylrest enthaltende Bruchstück  $m/e$  121 und das Piperazinmethylion  $m/e$  99.

Das Spektrum nach chemischer Ionisation zeigt neben

dem  $\text{MH}^+$ -Ion bei  $m/e$  221 (100% relative Intensität) nur noch ein Signal bei  $m/e$  189 (Methanol-Eliminierung).

Die Demethylierung von M5 führt zum Metaboliten M6, dem 1-(2-Hydroxy-2-phenyl)-ethylpiperazin.

Die Produkte der  $\alpha$ -Spaltung sind  $m/e$  105/107 und 99; im Spektrum nach chemischer Ionisation tritt neben dem  $\text{MH}^+$ -Ion bei  $m/e$  207 (100% relative Intensität) noch  $m/e$  185 als diagnostisch verwertbares Ion auf.

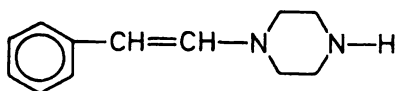
Nach der Hydrolyse mit Salzsäure konnte das N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin nachgewiesen werden: base-peak ist wieder  $m/e$  99, die Ionen  $m/e$  42, 56, 70, 88 und 112 ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ) treten mit hohen Intensitäten auf. Die relative Molekülmasse konnte mit Hilfe der chemischen Ionisation bestätigt werden.

Offensichtlich handelt es sich bei dieser Verbindung um ein Artefakt, das etwa bei der Hydrolyse des Urins oder unter den Bedingungen der GC/MS-Kombination (Temperatur!) entstanden ist.

Die Identität dieser Verbindung wurde durch Vergleich mit authentischem Material (EGA-Chemie) bestätigt.

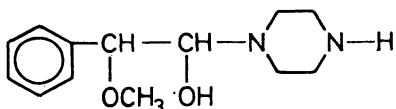
Im alkalischen Extrakt waren außerdem noch eine Reihe von Verbindungen nachweisbar, bei denen eine sichere Strukturzuordnung aus verschiedenen Gründen nicht möglich war. So muß beispielsweise ungeklärt bleiben, ob eine mit  $M_r = 188$  gefundene Verbindung ein genui-

ner Metabolit oder ein auf der GC-Säule entstehendes Dehydratisierungsprodukt von M6 darstellt:

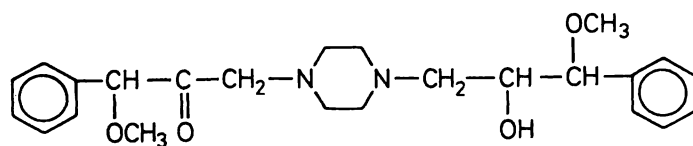


Nur mit Hilfe der chemischen Ionisation mit NH<sub>3</sub> wurden zwei weitere Abbauprodukte entdeckt, die in äußerst geringer Konzentration vorlagen und die im Spektrum nach Elektronenstoßionisation nicht nachweisbar waren.

Beide Verbindungen erschienen erst nach Hydrolyse; die erste Verbindung besitzt ein M<sub>r</sub> von 236 (MH<sup>+</sup> = 237; 100% relative Intensität) und ein den Verlust von Wasser anzeigendes Ion bei m/e 219 (15% relative Intensität). Im Hinblick auf die mit diesen Verbindungen gewonnenen Erfahrungen könnte es sich um folgende Abbauprodukte handeln:



Das Massenspektrum der zweiten Verbindung mit einem M<sub>r</sub> von 412 könnte in einem Zusammenhang mit den von Constantin & Pognat (1) beschriebenen Metaboliten 4 (M<sub>r</sub> = 418) bzw. Metaboliten 7 (M<sub>r</sub> = 414) stehen:



Der im alkalischen Urinextrakt nachgewiesene Hauptmetabolit M3 wird in einer größeren Menge ausgeschieden als die anderen Metaboliten (einschließlich der Ausgangsverbindung) zusammen. Der qualitative – und auch der quantitative – Nachweis einer Zipeprol-Einnahme sollte daher über diese Verbindung geführt werden, etwa mit Hilfe der chemischen Ionisations-GC/MS mit Ammoniak als Reaktandgas und single/multiple Ion Detection.

Insgesamt konnten durch dünn- und gaschromatographischen Vergleich etwa 20% der eingenommenen Ausgangsmenge des Zipeprols wiedergefunden werden.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen wird Zipeprol (Mirsol®) im menschlichen Körper auf folgenden Wegen abgebaut (Abb. 4):

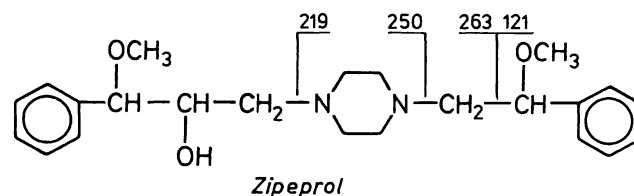
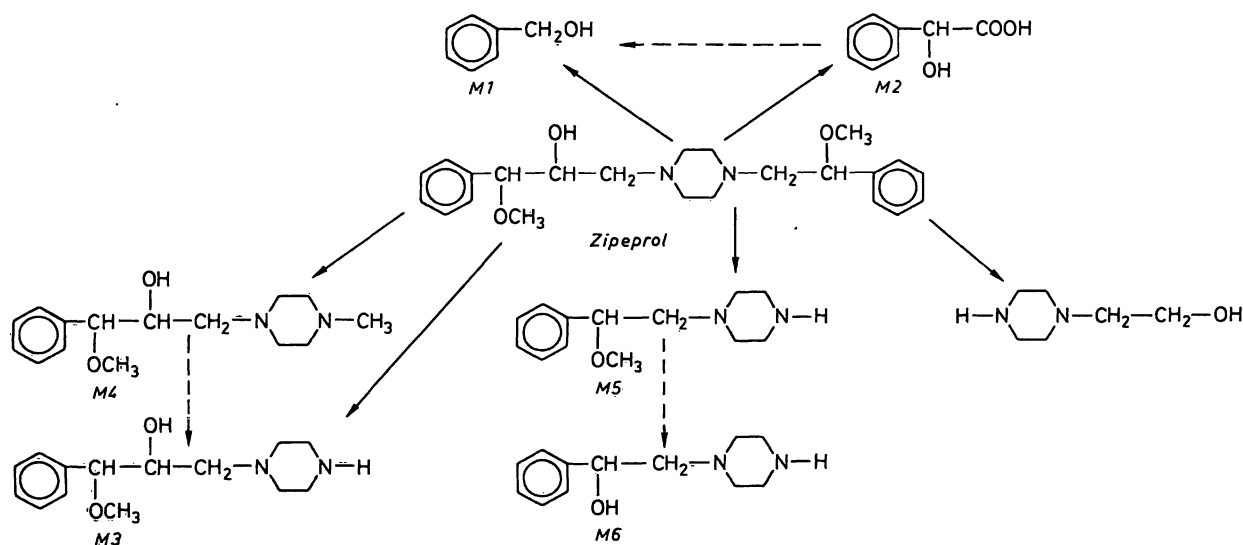


Abb. 4. Die Biotransformation von Zipeprol (Mirsol®) beim Menschen.



Die Abbauprodukte M3 und M5 wurden auch von Beckett & Achari (2) beschrieben, die – in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen – ebenfalls keine

konjugierten Metaboliten oder N-Oxide nachweisen konnten.

**Literatur**

1. Constantin, M. & Pognat, J. F. (1978), *Arzneimittelforsch.* (Drug Res.) 28, 64.
2. Beckett, A. H. & Achari, R. zit. nach: Pfeifer, S. (1979), *Biotransformation von Arzneimitteln* (Bd. 3) Verlag Chemie, Weinheim.
3. Toffel-Nadolny, P. & Gielsdorf, W. (1981), *Arzneimittelforsch.* (Drug Res.) im Druck.
4. Merck, E. (1980), *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Darmstadt.

5. Eckhardt, G., Goenechea, S. und Gielsdorf, W. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **15**, 115–120.
6. Arsenault, G. P. (1972), in: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry* (Waller, G. R., ed.) J. Wiley, N. Y.
7. Richter, W. J. & Schwarz, H. (1978), *Angew. Chem.* **90**, 449–469.
8. Munson, B. (1977), *Anal. Chem.* **49**, 772A–778A.
9. Kauert, G., Drasch, G. & v. Meyer, L. (1979), *Beitr. Gerichtl. Med.* **37**, 329–335.
10. Gielsdorf, W. & Holz, H. (1980), *Deutsche Apoth. Zeitung* **120**, 1353–1355.
11. Gielsdorf, W. (1980), *Fresenius Z. Anal. Chem.* **301**, 434–435.
12. Donike, M. & Gielsdorf, W. (1978), *Deutsch. Z. Sportmedizin* **1**, 4–8.

Dr. rer. nat. W. Gielsdorf  
c/o der Polizeipräsident in Berlin  
Direktion Polizeitechnische Untersuchungen  
Gothaer Straße 19  
D-1000 Berlin 62