

---

# **Analytik und pharmakologische Effekte selektiver Cyclooxygenase Inhibitoren**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt  
beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Lutz Bräutigam  
aus Lüneburg

Frankfurt am Main (2003)  
(DF1)

---

---

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang  
Goethe-Universität als Dissertation angenommen:

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber  
Prof. Dr. Gerd Geißlinger

Termin der Disputation: 13.02.2004

---

*„Schmerz tut weh!“*

*alte Volksweisheit*

Für Billy

Für Vincent

Für meine Mutter

---

---

Die vorliegende Arbeit entstand von Februar 2000 bis Dezember 2002 am *pharmazentrum frankfurt* im Institut für klinische Pharmakologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger für seine Anregungen und seine Hilfsbereitschaft, mit denen er diese Arbeit begleitet hat. Durch sein Engagement war es mir möglich, die Arbeit mit modernstem, technischem Equipment durchzuführen. Vor allem möchte ich ihm für das Vertrauen danken, dass er mir während des Aufbaus des Analytiklabors und der LC/MS/MS-Analytik entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. D. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, danke ich herzlich für seine Anregungen und Hilfestellungen, sowie die Mühe bei der Durchsicht der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für klinische Pharmakologie.

Für die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit möchte ich Frau PD Dr. Irmgard Tegeder, Frau Dr. Ellen Niederberger und Frau Dr. Sabine Grösch danken, ohne deren wissenschaftlichen Sachverstand ein Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Den Mitarbeitern des Analytiklabors möchte ich danken, allen voran Herrn Maic Seegel. Ich möchte ihm danken für dreieinhalb Jahre ausgezeichnete Mitarbeit, großartige Leistungen und unschätzbaren Humor, mit dessen Hilfe es gelang auch schwierigste Klippen zu umschiffen. Herrn Dr. Helmut Schmidt, Frau Anja Schmidt und Frau Karin Hehlert danke ich für die gute Zusammenarbeit, die vielen nützlichen Diskussionen und die wirklich ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre im Labor. Frau Käse möchte ich für die Unterstützung in allen administrativen Belangen danken.

Herrn Dr. Gregor Vetter und Herrn Dr. Jens U. Nefflen danke ich für die Erklärung und Durchführung der Microdialyseexperimente und viele wissenschaftliche und nichtwissenschaftliche Diskussionen. Der gleiche Dank gilt Herrn Dr. Christian Euchenhofer, der mir viele molekularbiologische Arbeitsweisen erklärt hat, Frau Dr. Maria Burian und Herrn Dr. Dietmar Zenker. Herrn PD Dr. Jörn Lötsch möchte ich für viele interessante wissenschaftliche Diskussionen danken. Ohne ihn wäre so mancher Bembel in Sachsenhausen ungeleert geblieben.

Ich möchte meiner Mutter danken für die Unterstützung und die rege Anteilnahme am Fortgang der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Sibylle Dürrbeck, auf die ich mich immer habe verlassen können. Sie hat mir trotz räumlicher Entfernung ihre Unterstützung gegeben und mich seelisch und moralisch aufgebaut, auch wenn dies nicht immer einfach war.

---

---

**Folgende Publikationen sind in diese Dissertation eingegangen:**

Bräutigam, L.; Vetter, G.; Tegeder, I.; Heinkele, G.; Geisslinger, G.;

Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry.

*J Chromatogr B*, 2001, **761**(2), 203-212.

Tegeder, I.; Niederberger, E.; Vetter, G.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.;

Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E(2) release in the spinal cord.

*J Neurochem*, 2001, **79**(4), 777-786.

Grösch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G. ;COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib.

*FASEB J*, 2001, **15**(14), 2742-2744.

Niederberger, E.; Tegeder, I.; Vetter, G.; Schmidtko, A.; Schmidt, H.; Euchenhofer, C.;

Bräutigam, L.; Grosch, S.; Geisslinger, G.;

Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB.

*FASEB J*, 2001, **15**(9), 1622-1624

---

## Zusammenfassung

Die LC/MS/MS Methoden zur Quantifizierung des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib und des selektiven COX-1-Hemmers SC-560 wurden auf einem Sciex API 3000 Tandem Massenspektrometer mit einer TurboIon Spray Quelle entwickelt und validiert. Die Methodenentwicklung umfasste die massenspektrometrische Darstellung der Molekülpeaks, die Fragmentierung der Analyte und des internen Standards, die Einstellungen des Massenspektrometers und die Auswahl des Eluenten hinsichtlich der Empfindlichkeit. Die Chromatographie wurde auf Peakform und kurze Laufzeit und die Extraktionsmethode auf die Wiederfindungsrate hin optimiert.

Für Celecoxib wurden zwei Assays mit internem Standard für die Quantifizierung aus Plasmaproben (Methode CLX-1, Methode CLX-2) und ein Assay ohne internen Standard für die Quantifizierung aus Microdialysaten entwickelt (Methode CLX-Microdialysate). Die Plasmaproben wurden mittels Festphasenextraktion über C<sub>18</sub> Material extrahiert. Zur Quantifizierung dienten im negativen Ionenmodus die Massenspuren  $m/z$  380,0  $\square$  316,1 für Celecoxib und  $m/z$  366,0  $\square$  302,1 für den internen Standard. Die Massenspuren  $m/z$  380,0  $\square$  276,2 und  $m/z$  366,0  $\square$  262,0 für Celecoxib und den internen Standard wurden als Qualifier verwendet.

Für die Methode CLX-1 wurde über eine RP-C<sub>18</sub> Säule (30 x 2 mm) isokratisch mit Methanol/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 80:20:0,1 v/v mit einer Flussrate von 0,2 ml/min eluiert. Die Methode wurde über den Konzentrationsbereich von 10-1000 ng/ml für Humanplasma und 10-500 ng/ml für Rattenplasma validiert.

Für die Methode CLX-2 wurde die Chromatographie mit einer RP-C<sub>18</sub> Säule (30 x 2 mm) isokratisch mit Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 85:15:0,1 v/v mit einer Flussrate von 0,2 ml/min eluiert. Die Methode wurde über den Konzentrationsbereich von 0,25-250 ng/ml für Humanplasma validiert.

Für die Methode CLX-Microdialysate wurde die Elution über eine RP-C<sub>18</sub> Säule (70 x 2 mm) isokratisch mit Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 65:25:0,1 v/v mit einer Flussrate von 0,2 ml/min durchgeführt. Das Assay wurde über den Konzentrationsbereich von 0,25-250 ng/ml validiert.

Die Analytik von SC-560 mittels LC/MS/MS wurde für den Nachweis in Microdialysaten entwickelt. Die Microdialysate wurden mit dem äquivalenten Volumen Acetonitril verdünnt, um den Analyten vollständig in Lösung bringen zu können. Eine RP-C<sub>18</sub> Säule (60 x 1 mm) wurde verwendet und die chromatographische Trennung mit einem Gradientenprogramm durchgeführt. Der Eluent A hatte die Zusammensetzung Acetonitril/Ammoniumacetat (2 mM) 30:70 v/v und der Eluent B Acetonitril/ Ammoniumacetat (2 mM) 85:15 v/v. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Zur Quantifizierung diente die Massenspur  $m/z$  353,1  $\square$  104,2. Die

---

---

Massenspektren  $m/z$  353,1 [258,0/132,2/137,1] wurden als Qualifier verwendet. Die Methode wurde über den Konzentrationsbereich von 0,5-20 ng/ml für Microdialysate validiert.

Die Assays wurden für pharmakologische Untersuchungen zur Wirkung und zum molekularen Wirkmechanismus von selektiven Cyclooxygenasehemmern eingesetzt.

Der Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf das Formalin-induzierte Schmerzverhalten und auf die spinale Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) wurden in der ersten Studie an Ratten untersucht. Um die spinale PGE<sub>2</sub>-Produktion verfolgen zu können, wurde die Microdialyse eingesetzt. SC-560 reduzierte das Schmerzverhalten der Tiere und hemmte die spinale Prostaglandinproduktion. Celecoxib reduzierte die spinale PGE<sub>2</sub>-Produktion nur geringfügig und änderte das Schmerzverhalten dementsprechend kaum. Der Formalin-induzierte schnelle PGE<sub>2</sub>-Anstieg wurde somit über die COX-1 vermittelt. Die freien Gewebekonzentrationen von Celecoxib, die aus den Microdialysaten ermittelt wurden, lagen weit oberhalb des IC<sub>50</sub> für die COX-2. Die Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass die Wirksamkeit von Celecoxib bei Trauma-bedingten Akutschmerzen der Wirksamkeit unselektiv wirkender NSAIDs unterlegen ist.

In der zweiten Studie sollte die Frage beantwortet werden, warum Celecoxib in klinischen Studien nach Dosierungen von 400 und 800 mg/d eine schlechtere Wirkung hatte als nach 200 mg/d. In Tierversuchen mit Zymosan-induzierten Entzündungen der Hinterpfoten konnte Celecoxib bei 50 mg/kg das Ödem in der Hinterpfote reduzieren, aber nicht bei Dosierungen  $\geq$  100 mg/kg. In Zellkultur konnte an Mesangiumzellen der Ratte gezeigt werden, dass eine Dosis von 50  $\mu$ M Celecoxib den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren kann. Dementsprechend kam es zu einer Überexpression der COX-2 und von TNF $\alpha$ . Im Rückenmark der Versuchstiere wurde ebenfalls eine vermehrte Expression von COX-2 und TNF $\alpha$  gefunden. Klinisch könnten die vermehrte Expression von TNF $\alpha$  und anderer durch NF- $\kappa$ B regulierter Proteine die Entzündung verstärken und somit den Verlust der antiinflammatorischen Wirkung von Celecoxib bei hohen Dosierungen erklären.

In einer dritten Studie wurde der Einfluss COX-abhängiger und -unabhängiger Mechanismen auf die antiproliferative Wirkung von Celecoxib untersucht. Dazu wurden die Effekte von Celecoxib und SC-560 auf den Zellzyklus und die Apoptose an drei Zelllinien getestet, die sich in ihrer COX-2-Expression unterschieden. Beide Substanzen verursachten einen Zellzyklus-Block. Celecoxib verringerte dabei die Expression Zellzyklus-regulierender Proteine und steigerte die Expression Zellzyklus-inhibierender Proteine. Im Gegensatz zu SC-560 induzierte Celecoxib Apoptose unabhängig vom COX-2 Status der Zellen. *In vivo* wurde das Wachstum von COX-2 defizienten Tumoren durch Celecoxib und SC-560 reduziert. Die *in vitro* und *in vivo* Daten deuten auf COX-2 unabhängige Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib hin.

---

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung..... 1

### Theoretischer Teil

## 2. Selektive Inhibitoren der Cyclooxygenasen ..... 3

- 2.1. Einleitung..... 3
- 2.2. Prostaglandine..... 4
- 2.3. Cyclooxygenasen ..... 6
- 2.4. Selektive Cyclooxygenase Inhibitoren..... 7
  - 2.4.1. Die Selektivität der COX-2 Inhibitoren ..... 7
  - 2.4.2. Klinische Anwendung der COX-2 Inhibitoren ..... 9

## 3. Electrospray Ionisation und Tandem Massenspektrometrie .....11

- 3.1. Electrospray Ionisation (ESI) ..... 11
  - 3.1.1. Einleitung ..... 11
  - 3.1.2. Bildung von Gasphasenionen ..... 12
    - 3.1.2.1. Entstehung geladener Tröpfchen an der Kapillarspitze ..... 12
    - 3.1.2.2. Zerfall der Initialtropfen (*fission*) ..... 14
    - 3.1.2.3. Ungeladene Analyte ..... 16
  - 3.1.3. Sprayquellen ..... 17
    - 3.1.3.1. Das differentiell bepumptes Vakuumsystem ..... 17
    - 3.1.3.2. TurboIon Spray ..... 18
- 3.2. Tandem-Massenspektrometer ..... 19
- 3.3. Sciex API 3000 ..... 22
  - 3.3.1. LINAC-Stoßzelle ..... 23

### Ergebnisse und Diskussionen

## 4. Sensitive Bestimmung von Celecoxib mittels LC/MS/MS .....25

- 4.1. Literaturübersicht..... 25
- 4.2. Methodenentwicklung..... 26
  - 4.2.1. Tuning des Massenspektrometers ..... 27
    - 4.2.1.1. Celecoxib ..... 27
    - 4.2.1.2. Interner Standard (IS) ..... 29
    - 4.2.1.3. Die MRM Methode ..... 29
    - 4.2.1.4. Die Wahl des Laufmittels ..... 30
    - 4.2.1.5. Chromatographie ..... 30
    - 4.2.1.6. Extraktionsverfahren ..... 34
    - 4.2.1.7. Matrixeffekte ..... 37
  - 4.3. Validierung der Methoden zur Bestimmung von Celecoxib mittels LC/MS/MS .... 39
    - 4.3.1. Bestimmung aus Human- und Rattenplasma (Methode CLX-1) ..... 39
      - 4.3.1.1. Spezifität der Chromatographie ..... 39
      - 4.3.1.2. Präzision und Genauigkeit des Assays ..... 40

---

4.3.2.	Bestimmung aus Humanplasma (Methode CLX-2)	41
4.3.2.1.	Spezifität der Chromatographie	41
4.3.2.2.	Matrixeffekte	41
4.3.2.3.	Extraktionswiederfindung	42
4.3.2.4.	Präzision und Genauigkeit des Assays	42
4.3.3.	Bestimmung aus Microdialysaten (CLX-Microdialysat)	43
4.3.3.1.	Spezifität der Chromatographie	43
4.3.3.2.	Matrixeffekte	43
4.3.3.3.	Präzision und Genauigkeit des Assays	43
4.4.	Diskussion zur Entwicklung und Validierung der analytischen Methoden für die Bestimmung von Celecoxib .....	45
4.4.1.	Massenspektrometrie	45
4.4.2.	Chromatographie	46
4.4.2.1.	Stabilität der Säulen	48
4.4.3.	Extraktionsverfahren	49
4.4.4.	Matrixeffekte	50
4.4.5.	Validierung	51
4.4.5.1.	Methode CLX-1	51
4.4.5.2.	Methode CLX-2	52
4.4.5.3.	Methode CLX-Microdialysat	52
<b>5.</b>	<b>Sensitive Bestimmung von SC-560 mittels LC/MS/MS .....</b>	<b>53</b>
5.1.	Methodenentwicklung .....	53
5.1.1.	Tuning des Massenspektrometers	53
5.1.1.1.	Detektion des Molekülions	53
5.1.1.2.	Die MRM Methode	54
5.1.1.3.	Optimierung des Laufmittels auf Empfindlichkeit	54
5.1.1.4.	Chromatographie von SC-560 Microdialysaten	54
5.1.1.5.	Probenvorbereitung	55
5.1.2.	Validierung der Methode zur Bestimmung von SC-560 in Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode SC-560 Microdialysat)	56
5.1.2.1.	Spezifität	56
5.1.2.2.	Matrixeffekte	56
5.1.2.3.	Präzision und Genauigkeit des Assays	56
5.2.	Diskussion zur Entwicklung und Validierung der analytischen Methode für die Bestimmung von SC-560 in Microdialysaten .....	58
5.2.1.	Massenspektrometrie	58
5.2.2.	Chromatographie	58
5.2.3.	Probenvorbereitung	59
5.2.4.	Validierung	60
<b>6.</b>	<b>Pharmakologische Effekte von Celecoxib .....</b>	<b>61</b>
6.1.	Effekte selektiver COX-1 und COX-2 Hemmer auf das Formalin induzierte Schmerzverhalten und die PGE <sub>2</sub> Freisetzung im Rückenmark .....	61
6.1.1.	Experimente zur selektiven COX-1 und COX-2 Hemmung auf die nozizeptive Transmission im Rückenmark	62
6.1.1.1.	Microdialyse-Experimente	62
6.1.1.2.	Analytik von SC-560, Celecoxib und PGE <sub>2</sub>	63
6.1.1.3.	Untersuchung des nozizeptiven Verhalten (Formalin-Test)	63

---

---

6.1.1.4.	Molekularbiologische Untersuchungen	63
6.1.2.	Ergebnisse der Experimentellen Untersuchungen	63
6.1.3.	Diskussion	68
6.2.	Wirkung von Celecoxib in hohen Dosierungen.....	70
6.2.1.	Untersuchungen zur Wirkung hoher Dosierungen von Celecoxib	70
6.2.1.1.	Tierversuche mit dem Zymosan-Entzündungsmodell	70
6.2.1.2.	Molekularbiologische Experimente	71
6.2.2.	Ergebnisse der Experimentellen Untersuchungen	71
6.2.3.	Diskussion	74
6.3.	Unterbrechung des Zellzyklus und Einleitung der Apoptose in Colon-Carzinom Zellen durch Celecoxib.....	76
6.3.1.	Untersuchungen zum Wirkmechanismus der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib	76
6.3.1.1.	Molekularbiologische Experimente	76
6.3.1.2.	Untersuchungen der antiproliferativen Wirkungen auf Tumore in Nacktmäusen	77
6.3.1.3.	Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Celecoxib und SC-560	77
6.3.2.	Ergebnisse	78
6.3.3.	Diskussion	80
<b>7.</b>	<b>Resümee .....</b>	<b>82</b>
 <b>Material und Methoden</b>		
<b>8.</b>	<b>Allgemeine Arbeitsvorschriften .....</b>	<b>87</b>
8.1.	Tunen des API 3000 mit Turbo Ion Spray Quelle .....	87
8.1.1.	Darstellung des Molekülpeaks	87
8.1.2.	Automatisches Tuning	88
8.1.3.	Flow Injection Analysis	88
8.2.	Bestimmung der Extraktionswiederfindung mit LC/MS/MS.....	89
8.3.	Bestimmung von Matrixeffekten .....	89
8.4.	Berechnung von Säulenparametern .....	90
<b>9.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>90</b>
9.1.	Chemikalien.....	90
9.2.	Geräte .....	91
9.3.	Analysegeräte.....	91
9.4.	Bearbeitung der Messdaten .....	92
<b>10.</b>	<b>Applikationen .....</b>	<b>93</b>
10.1.	Bestimmung von Celecoxib aus Human- und Rattenplasma mittels LC/MS/MS (Methode CLX-1).....	93
10.1.1.	Quantifizierung	94
10.1.2.	Herstellung der Stocklösungen und der Standards	94
10.1.3.	Extraktionsverfahren	94
10.2.	Bestimmung von Celecoxib aus Humanplasma mittels LC/MS/MS (Methode CLX-2). .....	95
10.2.1.	Quantifizierung	96

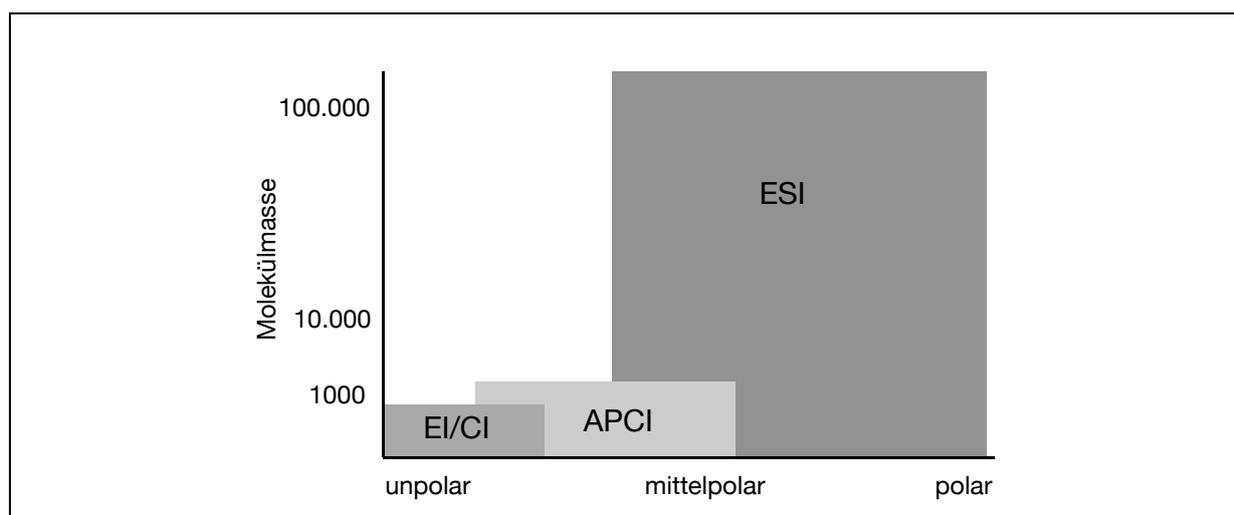
---

---

10.2.2.	Herstellung der Stocklösungen und der Standards	96
10.2.3.	Plasma Extraktionsverfahren	96
10.3.	Bestimmung von Celecoxib aus Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode CLX-Microdialysat) .....	97
10.3.1.	Quantifizierung	98
10.3.2.	Herstellung der Stocklösung und der Standards	98
10.3.3.	Aufarbeitung der Microdialysate	98
10.4.	Bestimmung von SC-560 aus Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode SC-560 Microdialysat) .....	99
10.4.1.	Quantifizierung	100
10.4.2.	Herstellung der Stocklösungen und der Standards	100
10.4.3.	Probenvorbereitung	101
10.5.	Bestimmung von SC-560 aus Ratten- und Mäuseplasma .....	101
10.5.1.	Herstellung der Stocklösungen und der Standards	101
10.5.2.	Plasma Extraktionsverfahren	102
<b>11.</b>	<b>Microdialyse Experimente .....</b>	<b>103</b>
11.1.	Tiere .....	103
11.2.	Microdialyse .....	103
11.2.1.	Geräte	103
11.2.2.	Katheterimplantierung	103
11.2.3.	<i>In vitro</i> Wiederfindung von Celecoxib in Microdialysaten	104
 <b>Anhang</b>		
<b>A.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>B.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>117</b>
<b>C.</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>118</b>
<b>D.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>120</b>

# 1. Einleitung

Konzentrationen von Wirkstoffen und deren Metabolite in Körperflüssigkeiten werden in der Pharmakokinetik überwiegend über chromatographische Methoden wie HPLC und GC bestimmt. Wurden in der Vergangenheit für die HPLC hauptsächlich UV- oder Fluoreszenz-Detektoren verwendet, werden seit einigen Jahren vermehrt Massenspektrometer (MS) oder Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) eingesetzt. Diese Entwicklung ist vor allem dem Fortschritt der Atmosphärendruck Ionisation (*atmospheric pressure ionisation*, API) zu verdanken. Mit der *Electrospray Ionisation* (ESI) und der *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI) ist eine relativ unproblematische Kopplung zwischen Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie ermöglicht worden. Zudem ist mit diesen Quellen ein sehr breites Spektrum an Substanzen unterschiedlicher Polarität und Masse nachweisbar (Abb.1-1).



**Abb. 1-1:** Arbeitsbereiche der Ionenquellen nach Polarität und Masse der Analyten. **EI:** electron impact, **CI:** chemical ionisation, **APCI:** atmospheric pressure chemical ionisation, **ESI:** electrospray ionisation

Mit Tandem-Massenspektrometern wird gegenüber den herkömmlichen Detektoren eine deutlich höhere Messempfindlichkeit erreicht. Durch die höhere Selektivität wird das chemische Untergrundrauschen (Störpeaks und Basislinie im Chromatogramm) erheblich vermindert und das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert. Durch das Ausblenden von Signalen störender Substanzen können die Laufzeiten erheblich verkürzt werden von durchschnittlich 20 min/Probe mit UV-Detektion auf 2-5 min/Probe mit LC/MS/MS. Dieses Zeitersparnis ist ein Hauptgrund für die weite Verbreitung von LC/MS/MS-Geräten in pharmakokinetischen Laboratorien, vor allem in der Industrie, in denen ein hoher Probendurchsatz gefordert wird.

---

In der vorliegenden Arbeit werden die Entwicklung analytischer Methoden für Cyclooxygenase-Inhibitoren und deren Anwendung in pharmakologischen Untersuchungen beschrieben.

Ein Teil der Arbeit war dabei die Entwicklung der analytischen Methoden. Celecoxib und SC-560 sollten mit schnellen und möglichst sensitiven Methoden mittels LC/MS/MS aus Plasmaproben und Microdialysaten bestimmt werden. Die entwickelten Methoden sollten dann nach den Richtlinien der FDA und des *Journals of Chromatography* [1] validiert werden.

Die pharmakologischen Untersuchungen befassten sich mit unterschiedlichen Wirkungen von Celecoxib. In der ersten Studie ging es um die Bedeutung der Cyclooxygenase-Isoformen, die sie im Rückenmark bei der akuten Nozizeption haben. SC-560 und Celecoxib dienten dabei als Werkzeuge, um zwischen den Beiträgen der beiden Isoformen zur nozizeptiven Transmission zu unterscheiden. Mit Hilfe der Microdialyse war es möglich, die Konzentrationsverläufe von Prostaglandin E<sub>2</sub>, Celecoxib und SC-560 im Rückenmark zu bestimmen.

In der zweiten Studie sollte für die klinische Beobachtung, dass höhere Dosen von Celecoxib schlechter wirksam sind, als die zugelassenen Dosen, eine Erklärung gefunden werden.

Die antiproliferative Wirkung von Celecoxib war das Thema der dritten Studie. Dazu sollten die molekularen Mechanismen untersucht werden.

# Theoretischer Teil

## 2. Selektive Inhibitoren der Cyclooxygenasen

### 2.1. Einleitung

Nichtsteroidale Antiphlogistika (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) gehören zu den weltweit am meisten verwendeten Arzneimitteln. Sie werden zur Behandlung von Fieber, Schmerzen und Entzündungen eingesetzt. Aspirin, das erste synthetisch hergestellte NSAID, wird nun seit mehr als 100 Jahren zur Schmerzlinderung verwendet. Die Bedeutung dieser Substanz lässt sich an der weltweiten Gesamtproduktion erkennen, die im Jahr 2000 ca. 50.000 t betrug [2].

Die analgetische, antiphlogistische und antipyretische Wirkung der NSAIDs beruht im Wesentlichen auf der Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität, die für die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure zuständig ist [3]. Durch die verminderte Prostaglandinsynthese werden nicht nur Analgesie und Entzündungshemmung bewirkt, sondern auch unerwünschte Effekte hervorgerufen. Als häufigste Nebenwirkung treten bei diesen Substanzen Probleme wie Dyspepsien, Ulzerationen und Blutungen im Gastrointestinaltrakt, sowie Störungen der Nierenfunktion und der Thrombozytenaggregation auf [4-7].

Anfang der neunziger Jahre wurde eine zweite durch inflammatorische Stimuli induzierbare Isoform der Cyclooxygenase beschrieben (COX-2) [8-13]. Die konstitutiv exprimierte COX-1 wird als die Isoform angesehen, die physiologisch notwendige Konzentrationen an Prostanoiden in der Magen-Darm Schleimhaut, den Thrombozyten und in der Niere gewährleistet [16]. Die induzierbare COX-2 produziert im Bedarfsfall die Prostaglandine, die Schmerz und Entzündung vermitteln [9, 17]. Sir John Vane stellte die Hypothese auf, dass eine selektive Hemmung der COX-2 die gewünschte Analgesie und Entzündungshemmung bewirke ohne die physiologischen Funktionen der Prostaglandine zu beeinträchtigen [14, 15]. Das Potential der selektiven COX-2 Hemmung zeigt sich, wenn man die Schmerzvermittlung im Rückenmark untersucht. Im Rückenmark nimmt nach einem peripheren Schmerzstimulus die Prostaglandinproduktion zu, die durch NSAIDs gehemmt werden kann [28-30]. Eine Eigenschaft der NSAIDs, der inzwischen eine immense Bedeutung für die analgetische Wirkung zugemessen wird [157]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei einem

peripheren Schmerzstimulus die COX-2 im Dorsalhorn des Rückenmarks hoch reguliert wird [19, 25-27]. Eine selektive COX-2 Hemmung müsste demnach eine analgetische und antiinflammatorische Wirkung ohne die üblichen Nebenwirkungen der Prostaglandinsynthesehemmung ermöglichen. Allerdings stellt sich die Realität etwas komplizierter dar, da die COX-2 im Gehirn, im Rückenmark, in den Nieren und verschiedenen anderen Geweben auch konstitutiv vorliegt [18-23]. Die Bedeutung des Enzyms in diesen Geweben ist jedoch noch unklar [24].

## 2.2. Prostaglandine

Prostaglandine werden über die Cyclooxygenasen aus Arachidonsäure gebildet, die von Phospholipasen des Typs A<sub>2</sub> aus dem Phosphatidylcholin der Zellmembran freigesetzt wird. Die Biosynthese der Prostaglandine vollzieht sich in mehreren Schritten, von denen die Cyclooxygenase bifunktionell als Cyclooxygenase und Peroxidase zwei übernimmt. Zunächst werden über die Cyclooxygenasefunktion zwei Sauerstoffmoleküle eingeführt und der Fünfring geformt. Das so gebildete, chemisch aktive Hydroperoxy-endoperoxy-Prostanoid PGG<sub>2</sub> wird an der Hydroperoxy-Gruppe von der Peroxidase Funktion der Cyclooxygenase zum Hydroxy-Endoperoxid PGH<sub>2</sub> reduziert.

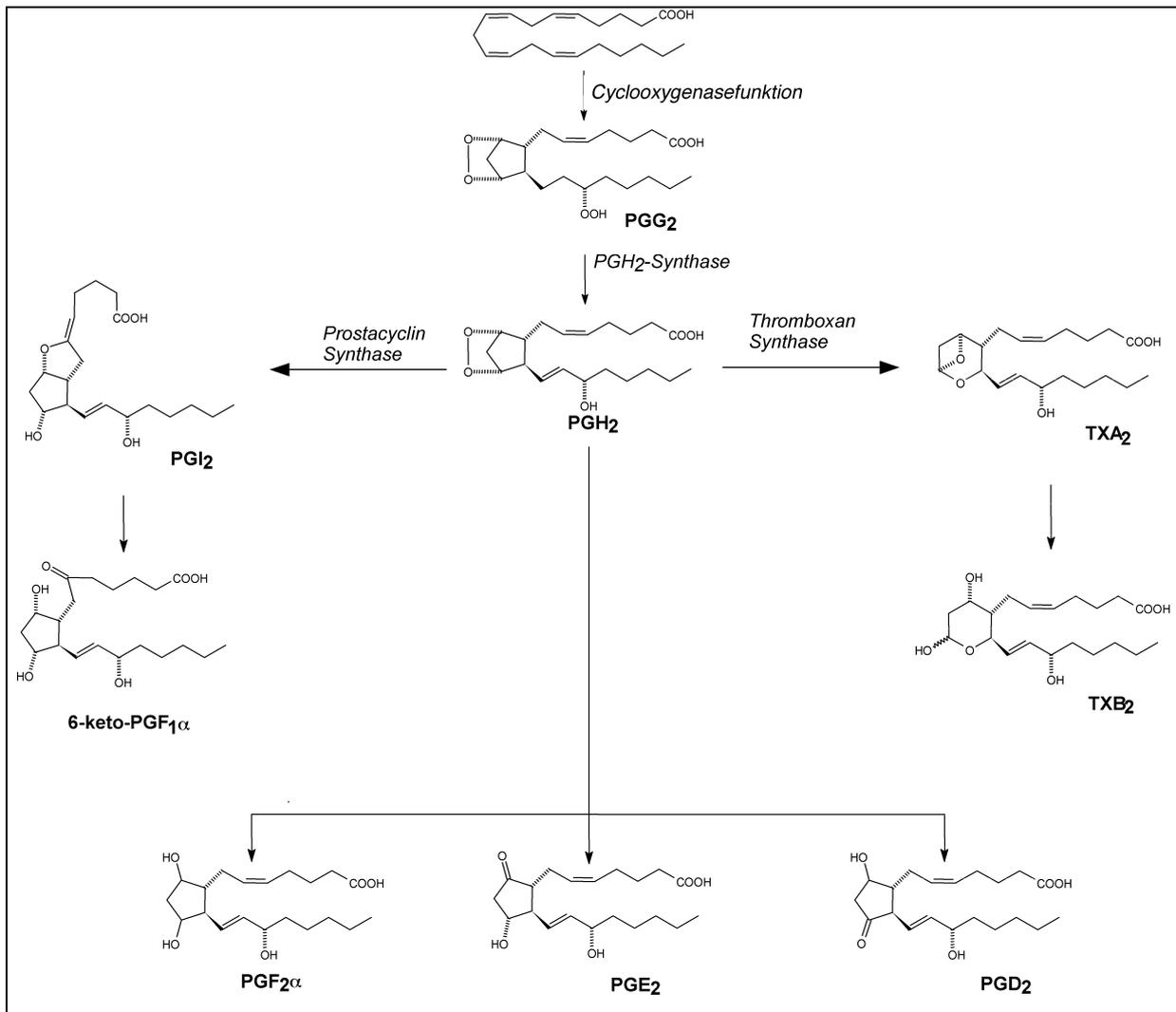
Aus dem PGH<sub>2</sub> werden durch entsprechende Synthasen PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> gebildet. TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> werden in wässrigen Lösungen schnell zu TBX<sub>2</sub> und 6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  hydrolysiert (Abb. 2-1). Die Synthasen werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert, so dass in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterschiedliche Prostaglandine gebildet werden.

Prostaglandine entfalten ihre biologische Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und wirken auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse [32, 33], wie z.B. die Vasoaktivität, die Nierendurchblutung, die Thrombozytenaggregation (TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), die Bronchokonstriktion (PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , TXA<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>) und -dilatation (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), die Regulation im ovariellen Zyklus und die Magenschleim- und Magensäureproduktion (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>). Außerdem vermitteln sie auch pathophysiologische Prozesse wie Fieber und Schmerzen.

Trotz ihrer umfangreichen physiologischen Aktivität unterscheiden sich die Prostaglandine in einigen Punkten von klassischen Hormonen. Sie werden in praktisch allen Geweben und nicht von einer „Hormondrüse“ synthetisiert. Sie sind metabolisch extrem instabil, weshalb sie nur in der Nähe ihres Entstehungsortes wirksam sein können. Im Blut ist die Konzentration der

Prostaglandine mit  $< 1 \text{ nM}$  weit unterhalb der Schwellenkonzentration für biologische Aktivitäten.

Die geringe Stabilität der Prostaglandine beruht einerseits auf strukturellen Eigenschaften, wie z.B. beim  $\text{TXA}_2$ , das im Blut eine Halbwertszeit von 30 s hat. Andererseits gibt es einen deaktivierenden Metabolismus durch Dehydrogenierung der 15-Hydroxylgruppe und durch  $\square$ -Oxidation, die vor allem in der Lunge und den Nieren stattfindet.



**Abb. 2-1:** Bildung verschiedener Prostanoiden aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase-Aktivität.

Im entzündeten Gewebe ist die Aktivität und Expression von Phospholipasen des Typs A2 erhöht. Die Phospholipasen setzen aus Zellmembranen Arachidonsäure frei, was zu einem erhöhten Angebot an Arachidonsäure für die COX-1 führt. Dadurch können vermehrt Prostaglandine gebildet werden. Wird bei diesem Überangebot an Arachidonsäure zusätzlich die COX-2 induziert, nimmt die Prostaglandinproduktion erheblich zu. Am Ort der Entzündung entstehen auf diese Weise vermehrte Mengen an  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\beta}$ ,  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  und

vor allem PGE<sub>2</sub>. Zusammen mit anderen Entzündungsmediatoren, wie Bradykinin, Histamin und Substanz P ist PGE<sub>2</sub> an der Entstehung der typischen Entzündungssymptome Schmerz, Erythem, Temperaturerhöhung, Schwellung und Funktionsstörung beteiligt (*dolor, rubor, calor, tumor, functio laesa*).

### 2.3. Cyclooxygenasen

Die Isozyme COX-1 und COX-2 ähneln sich in Struktur und katalytischer Aktivität. Sie haben ein Molekulargewicht von 71 kDa und besitzen fast die gleiche Kettenlänge mit ca. 600 Aminosäuren, von denen 63% in einer identischen Sequenz zueinander vorliegen. Sie sind im endoplasmatischen Reticulum und der Kernmembran lokalisiert [34]. Das Gen der COX-1 ist mit 22 kb jedoch viel größer als das Gen der COX-2 mit 8,3 kb. Die COX-1 scheint das Produkt eines *housekeeping* Gens zu sein, das einen konstanten Expressionslevel in den meisten Geweben aufrechterhält. Das COX-2 Gen hingegen gehört zur Klasse der *immediate-response* Gene. Die Induktion der Gentranskription nach einer Stimulation durch inflammatorische Cytokine erfolgt sehr schnell, so dass die Expression dieser Gene innerhalb von Minuten hoch reguliert wird. Die COX-2 hat eine relativ kurze Halbwertszeit von 5-30 min, so dass nach Ausbleiben des Entzündungsstimulus die zelluläre Konzentration der COX-2 schnell wieder abnimmt und die Prostaglandinproduktion auf ein physiologisch normales Maß zurückgeht.

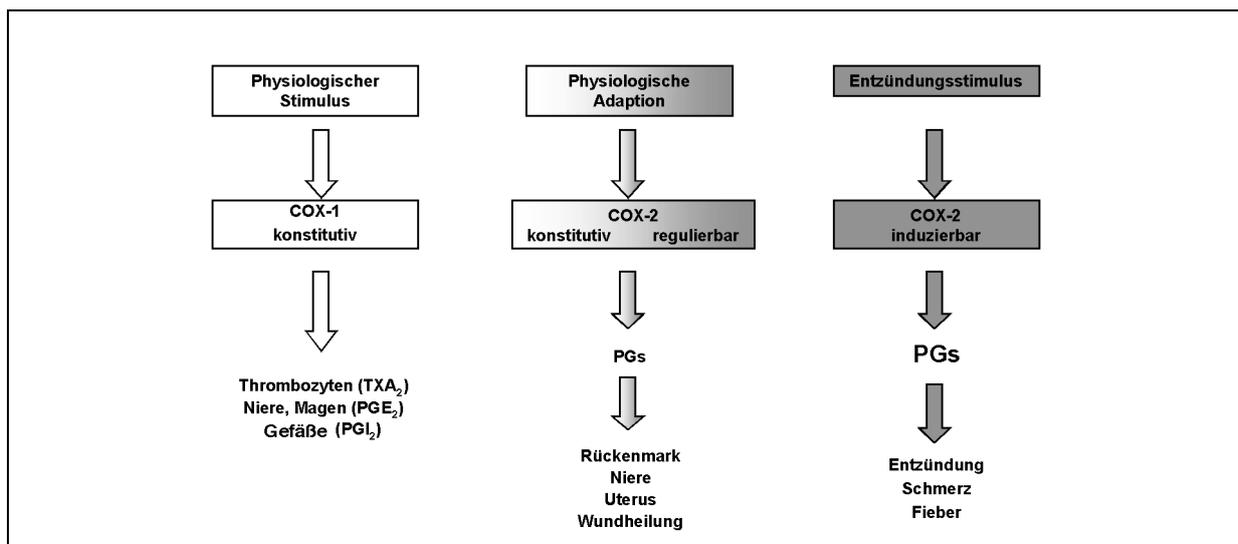


Abb. 2-2: Expression, Regulation und Funktion der COX-1 und COX-2 [62].

Die Bindungstaschen beider Isoformen sind bis auf zwei strukturelle Unterschiede nahezu identisch. In der COX-2 sind im Vergleich zur COX-1 die Isoleucine-434 und -523 gegen Valin und Histidin-513 gegen Arginin ausgetauscht. Daraus resultiert für die COX-2 eine um 25% größere „NSAID-Bindungstasche“ [35, 36].

Werden die Valine im COX-2 Bindungskanal wieder gegen Isoleucin ausgetauscht, ist COX-2 nicht mehr differentiell sensitiv gegenüber selektiven Inhibitoren [37, 38].

## 2.4. Selektive Cyclooxygenase Inhibitoren

1999 wurde in den USA mit Celecoxib eine COX-2 selektive Substanz zugelassen, die in Studien eine den klassischen NSAIDs vergleichbare analgetische Wirkung aufwies. Die Anzahl gastrointestinaler Beschwerden war mit Celecoxib jedoch im Vergleich deutlich geringer [39]. Vergleichbare Resultate wurden auch mit anderen, inzwischen zugelassenen Substanzen wie Rofecoxib [40], Etoricoxib [41] und Parecoxib/Valdecoxib [42, 43] erreicht. All diesen Substanzen ist gemeinsam, dass es sich um nicht-saure<sup>1</sup> Carbo- oder Heterocyclische Substanzen mit vicinalen Arylgruppen handelt.

Inzwischen ist mit Lumiracoxib ein weiterer selektiver COX-2 Inhibitor in der klinischen Entwicklung, der sich vom Diclofenac ableitet. Lumiracoxib ist der erste saure COX-2 Inhibitor und ähnelt strukturell nicht den Diarylheterocyclen.

Das ebenfalls selektiv die COX-2 inhibierende *o*-(Acetoxyphenyl)hept-2-ynylsulfid bindet anders als die anderen genannten Substanzen irreversibel an die COX-2, vergleichbar dem Wirkungsmechanismus der Acetylsalicylsäure [44].

Im Rahmen der Entwicklung dieser Substanzen sind auch selektive COX-1 Inhibitoren entdeckt worden wie z.B. das SC-560, das strukturell ebenfalls zu den Diarylheterocyclen gehört.

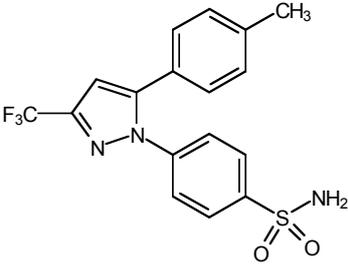
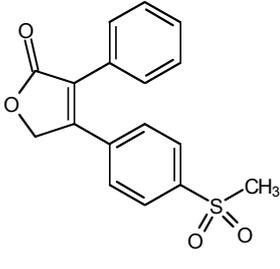
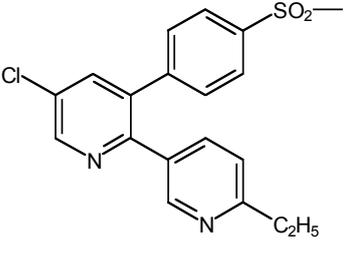
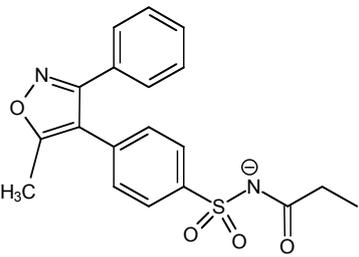
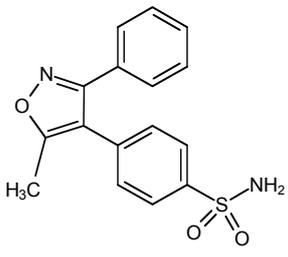
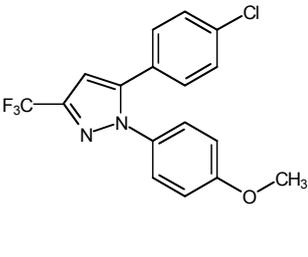
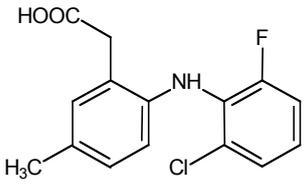
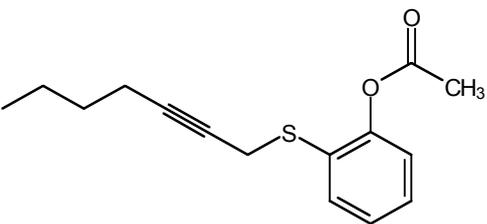
### 2.4.1. Die Selektivität der COX-2 Inhibitoren

Betrachtet man die Vielzahl selektiv wirkender Substanzen (mehr als 500 COX-2 selektiv inhibierende Substanzen sind bekannt), so lässt sich allein aus der Struktur kein gemeinsames Pharmacophor ersehen. Innerhalb von Gruppen mit gleicher Grundstruktur lassen sich bestimmte Tendenzen erkennen, wie die Sulfon- bzw. die Sulfonamid Gruppe für die

---

<sup>1</sup> Parecoxib ist ein Prodrug, das selbst nicht wirksam ist. Durch hepatische Carboxylasen wird die pharmakologisch aktive Substanz Valdecoxib gebildet. Aufgrund der Salzbildungsfähigkeit des Prodrugs ist Valdecoxib der erste selektive COX-2 Inhibitor, der *i.v.* verabreicht werden kann.

Diarylheterocyclen [45]. Das korrespondierende Sulfid besitzt keine derartige Selektivität oder ist sogar selektiver gegenüber COX-1.

 <p style="text-align: center;"><b>Celecoxib</b> IC<sub>50</sub> (COX-1/COX-2) 7,6-30</p>	 <p style="text-align: center;"><b>Rofecoxib</b> IC<sub>50</sub> (COX-1/COX-2) 35</p>	 <p style="text-align: center;"><b>Etoricoxib</b> IC<sub>50</sub> (COX-1/COX-2) 106</p>
 <p style="text-align: center;"><b>Parecoxib</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Valdecoxib</b> IC<sub>50</sub> (COX-1/COX-2) 30-150</p>	 <p style="text-align: center;"><b>SC-560</b> IC<sub>50</sub> (COX-1/COX-2) 0,003</p>
 <p style="text-align: center;"><b>Lumiracoxib</b> selektiver Cox-2-Hemmer</p>	 <p style="text-align: center;"><b>o-(Acetoxyphenyl)hept-2-ynylsulfid (APHS)</b> selektiver COX-2-Hemmer</p>	

**Abb. 2-3:** Strukturen einiger selektiver Cyclooxygenasehemmer, die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus *Human Whole Blood Assays* ermittelt.

Strukturelle Betrachtungen können die selektive Wirkung der Diarylheterocyclen zufrieden stellend erklären. Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass die Phenylsulfonamid oder –sulfon Gruppen dieser Substanzen mit der Seitentasche, die in der COX-2 Bindungstasche zugänglich ist, wechselwirken. Kinetische Betrachtungen ergänzen die strukturellen Überlegungen [37, 46-48].

Diarylheterocyclen können in die Bindungstaschen beider Isoformen diffundieren und einen Enzym-Inhibitor Komplex bilden. Tatsächlich wirken sie auch als schwache kompetitive Inhibitoren der COX-1. Treten keine weiteren Wechselwirkungen auf, kann der Inhibitor schnell wieder aus der Bindungstasche herausdiffundieren. Tritt die Phenylsulfon/-amid Gruppe mit der in der COX-2 zugänglichen Seitentasche in Wechselwirkung, wird der

Inhibitor-Enzym Komplex stabilisiert. So kann der Inhibitor nur langsam aus der Bindungstasche wieder herausdiffundieren. Diese kinetische Hemmung des Auseinanderdiffundierens von Enzym und Inhibitor ist letztendlich für die Selektivität der Inhibition verantwortlich.

#### 2.4.2. Klinische Anwendung der COX-2 Inhibitoren

Für die therapeutische Anwendung sind inzwischen Celecoxib, Rofecoxib, Parecoxib und Valdecoxib in Deutschland und Etoricoxib in den USA und Großbritannien zugelassen (Tab. 2-1). Alle Substanzen zeigen in klinischen Studien gute analgetische und antiinflammatorische Wirkungen, mit deutlich weniger ulcerogenen Eigenschaften. Trotz positiver Ergebnisse zahlreicher Studien zur gastrointestinalen Sicherheit wurde insbesondere eine Studie mit Celecoxib (*CLASS-study* [39]) angezweifelt [51-53]. Denn die Hemmung der COX-1 ist für die Entstehung gastrointestinaler Komplikationen scheinbar nicht allein verantwortlich. So entwickelten sich bei COX-1 *knock-out* Mäuse trotz des Fehlens der COX-1 keine gastrointestinalen Komplikationen [49]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung der gastrointestinalen Prostaglandinsynthese und des gastralen Blutflusses und die durch NSAIDs erhöhte Leukozytenadhäsion gemeinsam zur Pathogenese von Magenläsionen beitragen [50].

	Celecoxib	Rofecoxib	Etoricoxib	Parecoxib	Valdecoxib
Markenname	Celebrex	Vioxx	Arcoxia	Dynastat	Bextra
Dosierung Osteoarthritis Rheumatoide Arthritis Dysmenorrhö	200, 2x100 mg/d 2x100-200 mg/d	12,5-25 mg/d 25 mg/d	60 mg/d 90, 120 mg/d	50 mg i.v./i.m.	10 mg/d 10 mg/d  2x20 mg/d
Bioverfügbarkeit	~ 70 %	~ 93 %	~ 100%	100 %	83 %
t <sub>max</sub> (orale Gabe)	~ 3 h	~ 2-3 (-9) h	~ 1 h		~ 3 h
Plasmaeliminations- halbwertszeit	~ 11 h	~ 17 h	~ 22 h	~ 1-2 h	~ 8 h
Verteilungsvolumen im <i>steady state</i>	400-500 l	80-90 l	120 l	~ 7 l i.v. ~ 16 l i.m.	86 l
Proteinbindung	~ 97 %	~ 85 %	~ 92 %	~ 97 %	~ 98 %
Metabolismus	CYP 2C9	zytosolische Enzyme	CYP 3A4	Hepat. Carboxyl- esterasen	CYP 3A4 CYP 2C9

**Tab. 2-1:** Pharmakokinetische und –dynamische Daten der zugelassenen selektiven COX-2 Inhibitoren [56, 139-144]

Seit im Rahmen einer großen Vergleichsstudie zwischen Rofecoxib und Naproxen eine erhöhte Inzidenz kardiovaskuläre Ereignisse in der Rofecoxib Gruppe auftrat [40], wird über eine kardiovaskuläre Toxizität der COX-2 Inhibitoren diskutiert [55]. In einer ähnlichen

Studie mit Celecoxib [39] hingegen wurde für die Celecoxib-Gruppe keine erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse gefunden. Verschiedene Gründe werden für dieses Ergebnis angeführt, aber der Unterschied zwischen Rofecoxib und Celecoxib liegt vermutlich im unterschiedlichen Studiendesign der beiden Untersuchungen und der zufälligen Zuordnung der Patienten in die verschiedenen Testgruppen [56]. Dennoch wird für die Langzeittherapie mit selektiven COX-2 Hemmern ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko angenommen. Selektive COX-2 Inhibitoren haben immerhin keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation wie Acetylsalicylsäure oder Naproxen, da TXA<sub>2</sub> direkt in den Thrombozyten über die COX-1 gebildet wird. In den Endothelzellen wird zudem über die COX-2 das vasoaktiv wirksame PGI<sub>2</sub> gebildet. Bei der Einnahme der COX-2 Inhibitoren ist daher ein kardiovaskulärer Vorteil nicht zu erwarten.

Zudem wird diskutiert, ob zur Therapie von Schmerzen und Entzündungen die Hemmung der COX-2 allein ausreicht, da im Rückenmark auch die COX-1 am Schmerzgeschehen mit beteiligt ist. [53, 54].

Neben der Cyclooxygenasehemmung zeigen selektive COX-Inhibitoren davon unabhängige Effekte, die im wesentlichen auf der Hemmung bzw. Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B beruhen [57].

Es ist bekannt, dass die regelmäßige Einnahme von NSAIDs die Inzidenz für Kolontumore reduzieren kann. Dieser Effekt wurde bisher der Hemmung der COX-2 zugeschrieben [132, 103], scheint jedoch davon unabhängig zu sein [58, 104].

Celecoxib ist inzwischen in den USA zur Verminderung der Anzahl der Tumore bei familiärer adenomatöser Polyposis zugelassen. Weitere mögliche Indikationen werden untersucht so der Einsatz bei Mamma- [59], Kolon- [60], und Magenkarzinome [61], das Bartter Syndrom [63] und Hemmung vorzeitiger Wehen [64]. Für die Therapie von Morbus Alzheimer erwartete man sich durch den Einsatz von NSAIDs und COX-2 Inhibitoren eine Verlangsamung der Krankheitsprogression. Allerdings haben in einer Studie weder Naproxen noch Rofecoxib eine Wirkung auf den Krankheitsverlauf zeigen können [138].

### 3. Electrospray Ionisation und Tandem Massenspektrometrie

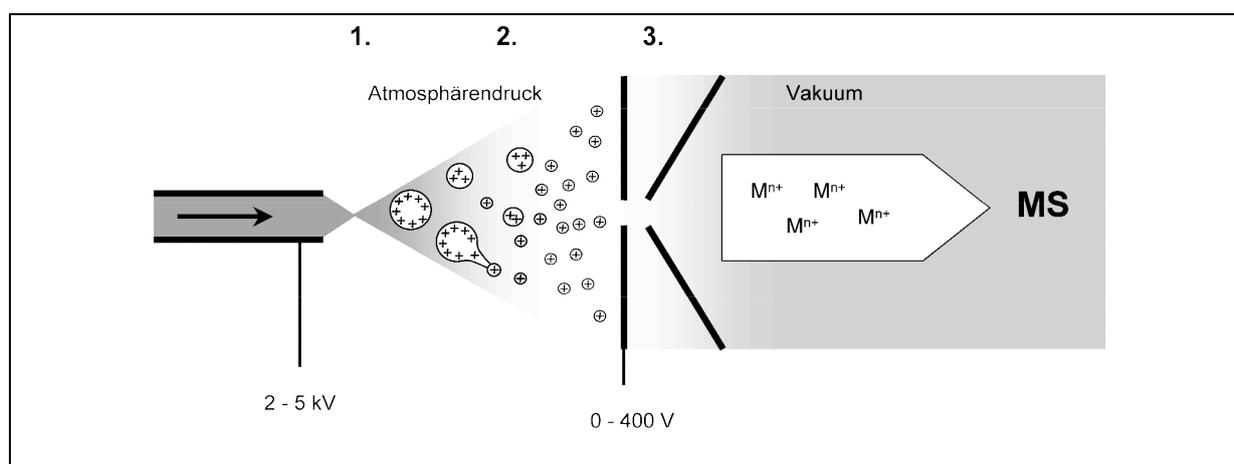
#### 3.1. Electrospray Ionisation (ESI)

##### 3.1.1. Einleitung

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wird das Zerstäuben von Lösungen im elektrischen Feld experimentell untersucht. Der Nutzen als Ionisierungsmethode für die Massenspektrometrie wurde erst 1984 durch Yamashita und Fenn [65, 66] und Aleksandrov et al. [67] gezeigt. Fenn hat für seine Arbeiten 2002 den Nobelpreis für Chemie erhalten.

ESI ist eine inzwischen weit verbreitete, sanfte Ionisierungsmethode zur Bestimmung unterschiedlicher Analyte. Der Prozess der Solvatisierung von Ionen beim Übergang in Lösung verläuft ohne weitere Schwierigkeiten, der Übergang von solvatisierten Ionen in die Gasphase ist jedoch äußerst endotherm, da die Solvatisierungsenergie überwunden werden muss. So benötigt ein C-C Bindungsbruch 398 kJ/mol und die Überführung eines  $\text{Na}^+$  Ions in die Gasphase 427 kJ/mol. Um Ionen aus der Lösung in die Gasphase zu überführen, wird in der Elektrospray-Ionisierung den Ionen allerdings so gut wie keine innere Energie zugeführt, anders als beim FAB (Fast Atom Bombardement) oder der Plasma Desorption. Mit diesen Ionisierungsmethoden kann es schon von Anfang an zu Fragmentierungen kommen.

Die Möglichkeiten der Analyse mittels ESI reichen von geladenen Ionen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{BH}^+$ ,  $\text{X}^-$ ) bis hin zu hitzelabilen Verbindungen und hochmolekularen Stoffen wie Proteinen, Peptiden oder sogar Mikroorganismen [68, 69].



**Abb. 3-1:** Schematische Darstellung des Elektrospray Prozesses im positiven Ionenmodus [96]: **1.** Tropfenbildung, **2.** Sukzessives Schrumpfen und Zerfallen der Initialtropfen (*fission*), **3.** Freisetzung von Gasphasenionen. An der Kapillare liegen üblicherweise 2-5 kV, an der Gegenelektrode 0-400 V an.

Die Entstehung von Gasphasenionen im Elektrospray verläuft im Wesentlichen in drei Schritten:

1. Entstehung geladener Tröpfchen an der Kapillarspitze
2. Schrumpfen der Tropfen durch Verdampfen von Lösungsmittel und unsymmetrischer Zerfall in kleinere, hochgeladene Tröpfchen, die fähig sind Gasphasenionen zu bilden (*fission*)
3. Produktion von Gasphasenionen

### 3.1.2. Bildung von Gasphasenionen

#### 3.1.2.1. Entstehung geladener Tröpfchen an der Kapillarspitze

Die Feldstärke in der Umgebung der Kapillarspitze ist aufgrund der kleinen Abmessungen sehr groß. Flüssigkeit, die aus der ESI Kapillare austritt, wird teilweise vom Feld durchdrungen. Im Solvent gelöste Ionen reagieren entsprechend ihrer Ladung auf dieses Feld. Ist die Kapillare der positive Pol, wandern positive Ionen an die Oberfläche und negative in das Innere der Flüssigkeit, bis das äußere Feld aufgehoben ist.

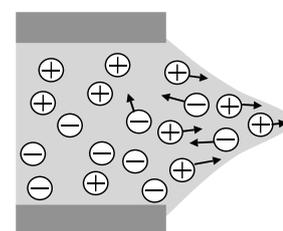
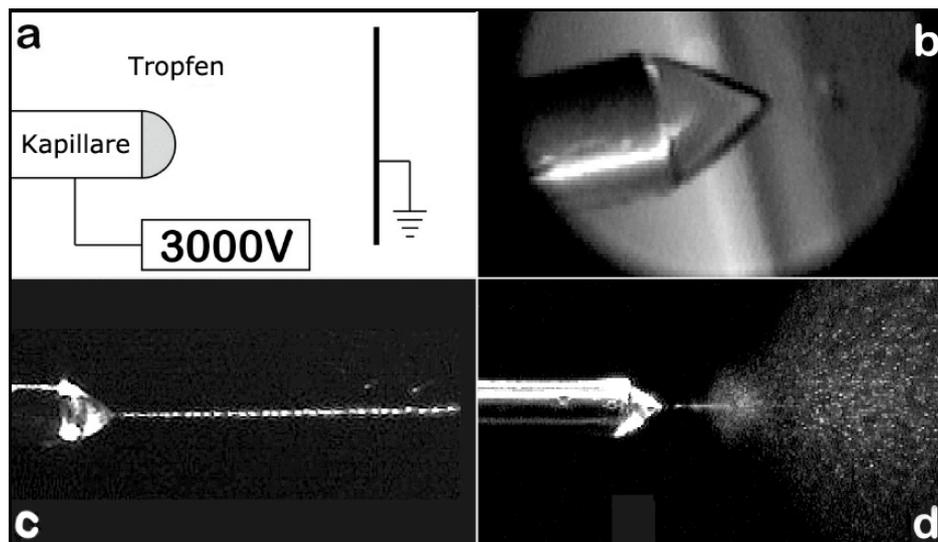


Abb. 3-2: Zur Entstehung des *Taylor-cones*

An der Oberfläche akkumulieren positive Ionen, die entlang des Feldgradienten driften und die Oberfläche der Lösung destabilisieren, da sie nicht aus der Flüssigkeit entweichen können. Dadurch verformt sich die Flüssigkeit zu einem Konus, dem so genannten *Taylor-cone* (Abb.3-3b). Durch die konische Form nimmt die Feldstärke zur Spitze des Konus hin zu [70]. Bei hinreichend großem Feld wird die Spitze instabil und ein Flüssigkeitsstrahl (*jet*) mit einem Durchmesser einiger Mikrometer wird ausgestoßen. Dieser Flüssigkeitsstrahl ist mit den an der Oberfläche des Konus akkumulierten positiven Ionen angereichert (Abb.3-3c). Der *jet* zerfällt weiter in Tropfen, deren Oberfläche ebenfalls mit positiven Ionen angereichert ist. Mit steigender Feldstärke nimmt die Länge des *jets* ab und es bildet sich ein Spray (Abb.3-3d), bis bei hohen Feldstärken kein *jet* mehr entsteht und Multispray-Konditionen erreicht werden [71].



**Abb. 3-3:** a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus eines Electrospays. Die Kapillare hat einen Durchmesser von  $\sim 0,5\text{mm}$  und einen Abstand von  $\sim 5\text{cm}$  zur Gegenelektrode. b) *Taylor-cone*. c) *cone-jet\** Zerfall. d) Electrospay. [72]

Die Instabilität der Konusspitze beruht auf repulsiven Wechselwirkungen der gleich geladenen Ionen zueinander, die der Oberflächenspannung entgegenwirken. Ab einem bestimmten Punkt übersteigt die Summe der repulsiven Wechselwirkungen die Oberflächenspannung und Flüssigkeit wird emittiert. Damit dies geschehen kann muss die Potentialdifferenz einen bestimmten Schwellenwert überschreiten (*onset voltage*) [74]. Der weitere Zerfall des *jets* führt zur Tröpfchenbildung [75].

Der Transport positiv geladener Tröpfchen führt an der Kapillare zu einem Defizit an positiver Ladung. Dieses Defizit kann ausgeglichen werden mit der Entladung von Anionen aus der Lösung ( $2\text{Cl}^- \rightarrow \text{Cl}_2 + 2\text{e}^-$ ) oder mit der Produktion positiver Ladungsträger durch Oxidation des Kapillarenmaterials ( $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^-$ ). Redoxreaktionen an der Spraykapillare ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$  oder  $4\text{OH}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$ ) können zu einer pH Änderung der Lösung führen [78].

Die ESI-Quelle kann als eine besondere Art der Elektrolysezelle angesehen werden, mit der Besonderheit, dass der Ladungstransport über die Gasphase in Form eines Sprays stattfindet [76]. Vergleichbar mit der Elektrolysezelle steigt mit erhöhter Leitfähigkeit der versprühten Lösung auch der Stromfluss an [77].

### 3.1.2.2. Zerfall der Initialtropfen (*fission*)

Im Initialtropfen befinden sich dem elektrophoretischen Mechanismus folgend die positiv geladenen Ionen an der Oberfläche und die Gegenionen sowie ungeladene Teilchen im Tropfeninneren. Analytmoleküle befinden sich entsprechend ihres Ladungszustandes an der Oberfläche, wenn sie selbst an der Aufladung des Tropfens beteiligt sind, oder im Inneren des Tropfens. Durch Verdampfen von Lösungsmittel nimmt der Radius des Tropfens ab, die Anzahl der

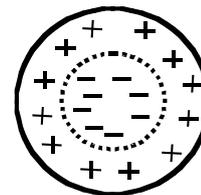


Abb. 3-4: Verteilung der Ladungen im Tropfen im elektrischen Feld

geladenen Teilchen bleibt dabei aber konstant. Je höher der Dampfdruck des Lösungsmittels ist, desto besser verdampft es und desto schneller nimmt der Tropfenradius ab. Mit abnehmendem Tropfenradius nehmen die repulsiven Wechselwirkungen der in der Tropfenoberfläche befindlichen Ionen zu. Irgendwann kann die Oberflächenspannung des Tropfens den repulsiven Kräften nicht mehr entgegenwirken, der Tropfen wird instabil und zerfällt (*coulomb-explosion*). Nach Rayleigh [79] kann die Ladung  $q_{Ry}$ , bei der ein sphärischer Tropfen gerade noch stabil ist (*Rayleigh-Stabilitätslimit*) wie folgt berechnet werden:

(Gl. 3-1)

$$q_{Ry} = 8\epsilon_0 \sqrt{\epsilon_0 \sigma} R^3$$

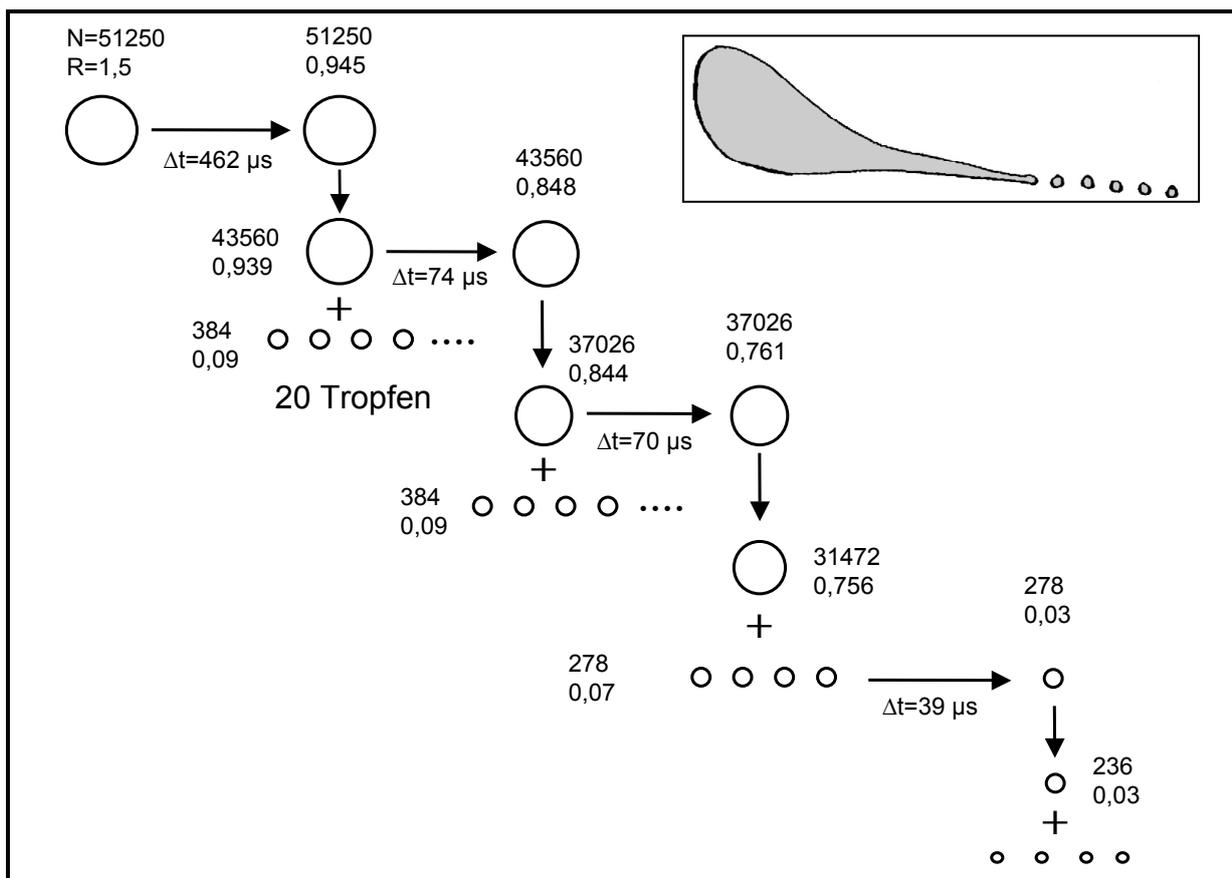
$q_{Ry}$ : Tropfenladung

$\epsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante des Vakuums

$\sigma$ : Oberflächenspannung

$R$ : Tropfenradius

Aufgrund elliptischer Verformung der Tropfen liegt der Zerfall allerdings in der Praxis bei ca. 80% des Grenzwertes. Der Zerfall des Initialtropfen vollzieht sich unter Ausbildung eines *jets* [80, 81] und ist unsymmetrisch. Auf ca. 20 gebildete Tröpfchen (*offspring-droplets*) verteilen sich nur 2% der Tropfenmasse aber 15% der Ladung. Der verbleibende Resttropfen und auch die *offspring-droplets* können durch weiteres Verdampfen von Lösungsmittel und dadurch weiteres Schrumpfen in einer weiteren *coulomb-explosion* zerfallen. Und je kleiner der Tropfen ist, desto schneller wird das Rayleigh-Stabilitätslimit erreicht (Abb. 3-5).



**Abb. 3-5:** Schematische Darstellung des Verlaufes des Tropfenzerfalls. Der Tropfen links oben ist typisch für einen Tropfen, der in der Nähe der Kapillare bei Atmosphärendruck gebildet wird.  $N$ : Anzahl der Elementarladungen auf der Tropfenoberfläche,  $R$ : Radius des Tropfens. Die  $\Delta t$  Werte geben die Zeit an, die ein Tropfen braucht, um durch Verdampfen von Lösungsmittel das Rayleigh-Stabilitätslimit zu erreichen. Nur die ersten drei Zerfälle sind gezeigt [82]. Der Einschub rechts oben illustriert den Zerfall eines Tropfens [82].

Durch den asymmetrischen Zerfall weisen *offspring-droplets* ein deutlich höheres Ladungs-Masse-Verhältnis auf als der Ausgangstropfen. Ladungsträger werden somit durch den Tropfenzerfall angereichert.

Analytionen müssen mit in den *offspring-droplets* enthalten sein, um nachgewiesen werden zu können. Rein formal erhöht sich durch den Tropfenzerfall die Konzentration des Analyten. Der nach dem ersten Zerfall übrig gebliebene Resttropfen endet nach Verdampfung des Lösungsmittels als analytisch nicht nutzbarer, relativ niedrig geladener Rest. Niedrig geladene Reste der *offspring-droplets* können als breite, nicht aufgelöste Ionensignalverteilungen mit hohem  $m/z$ -Verhältnis massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

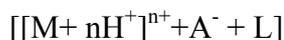
Zur Erklärung der Bildung von Gasphasenionen gibt es zwei gängige Modelle, von denen keines bisher mit ausreichender Sicherheit experimentell gesichert werden konnte: Das *ion-evaporation* Modell (IEM) und das *charged-residue* Modell (CRM) [73, 82].

### 3.1.2.3. Ungeladene Analyte

In den bisherigen Ausführungen wurde die Überführung von Analyten in die Gasphase besprochen, die von sich aus schon geladen sind (z.B. Alkaliionen, Ammoniumionen).

Ungeladene Analyte können einen Ladungszustand abhängig vom pH besitzen, je nachdem ob das Molekül deprotoniert oder protoniert vorliegen kann. ESI-Massenspektren können jedoch nur bedingt die Säure-Basen Reaktionen in Lösung wiedergeben [86-90].

Im positiven Ionenmodus führen saure Lösungen mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel oft zu guten Ionenausbeuten und damit zu hohen Empfindlichkeiten. Betrachtet man den Tropfenzerfall nach dem CRM Modell, verbleibt der Analyt (M) in einem Cluster zusammen mit Lösungsmittelmolekülen (L), Gegenionen (A) und weiteren Ladungsträgern.



Der weitere Zerfall führt zu Protonenübertragungsreaktionen auch auf den Analyten.



Die verschiedenen Bestandteile des Clusters (z.B. L, A<sup>-</sup>) konkurrieren mit dem Analyten um die vorhandenen Protonen. Das Verhältnis der Protonentransferreaktionen auf die verschiedenen Bestandteile des Clusters hängt vom Verhältnis der Protonenaffinitäten der Bestandteile zueinander ab. Je höher die Protonenaffinität des Analyten ist, desto besser ist dessen Ionenausbeute. Im gegenteiligen Fall, wenn die Protonenaffinität eines Anions deutlich höher als die des Analyten ist, kann die Ionenausbeute für den Analyten gegen Null gehen. Ladungsübertragungen können alternativ auch ohne Protonen durch Adduktbildung mit positiv geladenen Ionen wie Na<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> möglich sein.

In Lösung deprotonierte Analyte können u.U. im ESI als protonierte Gasphasenionen nachgewiesen werden, und umgekehrt. Dieses Phänomen wird als *wrong-way-around-ESI* bezeichnet. Es ist ein Beispiel für den Einfluss von Gasphasenreaktionen, den diese auf die Ionisierung und die Ionenfreisetzung im Elektrospray haben können.

Allerdings ist die Signalintensität von protonierten Analyten aus alkalischer Lösung bzw. deprotonierten Analyten aus saurer Lösung gering, da sich ein in alkalischer Lösung negativ geladenes Ion im positiven Ionenmodus im Tröpfcheninneren befindet, und so mit deutlich geringerer Wahrscheinlichkeit in die Gasphase übertritt.

Die obigen Ausführungen legen den Schluss nahe, dass eine verbesserte Ionenausbeute für den Analyten, und damit eine optimale Empfindlichkeit dann erreicht werden kann, wenn möglichst wenig konkurrierende Moleküle neben dem Analyten in der Probe enthalten sind.

So kommt der Probenpräparation eine große Bedeutung zu. Eine andere und ergänzende Möglichkeit besteht darin, eine effiziente Chromatographie vorzuschalten, um den Analyten von störenden Bestandteilen *on-line* chromatographisch zu trennen.

### 3.1.3. Sprayquellen

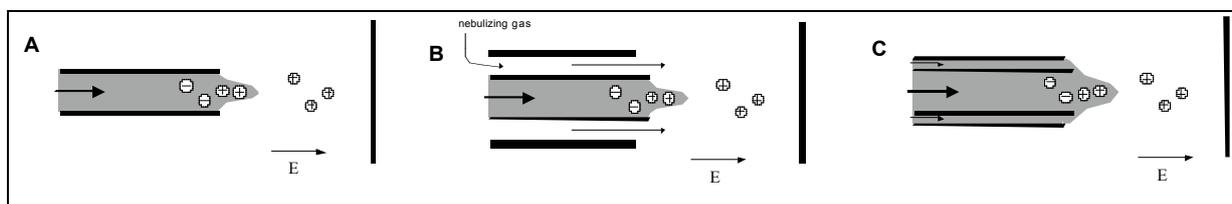
Die Eigenschaften des Lösungsmittels haben auf den Zerstäubungsvorgang einen deutlichen Einfluss. Dabei ist die Flussrate ein kritischer Parameter. Der Tropfenradius der entstehenden Initialtropfen nimmt mit der Flussrate zu. Dadurch wird die effiziente Freisetzung von Analytionen in die Gasphase erschwert. Durch eine größere Probenmenge kann dieser Effekt jedoch kompensiert werden.

In der Standard-ESI werden Edelstahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  verwendet. Der Fluss beträgt 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  und die angelegte Potentialdifferenz 3-5 kV.

In diesem Aufbau wird die maximale Flussrate bei 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  erreicht. Bei Flüssen unter 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  verläuft der Abbau der Flüssigkeit schneller, als für Nachschub an Flüssigkeit gesorgt werden kann. Dadurch wird das Spray ungleichmäßig oder reißt völlig ab.

Um einen effizienten Zerstäubungsvorgang auch bei größeren Flüssen gewährleisten zu können, wie sie in der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie zu finden sind, wird die Spraybildung durch einen koaxialen, pneumatischen Fluss von Stickstoff unterstützt (*nebulizing gas*). Dadurch ist zudem eine geringere Potentialdifferenz als in der Standard-ESI nötig, um ein Spray zu erhalten.

Hat man hingegen mit sehr kleinen Flussraten zu tun, wird koaxial ein organisches Lösungsmittel zugesetzt, um einen ausreichenden Flüssigkeitsnachschub zu gewährleisten (*sheath liquid*) (Abb.3-6).



**Abb. 3-6:** Grundtypen von Sprayquellen A) einfache ESI B) ESI mit pneumatischer Unterstützung durch einen koaxialen Gasstrom; C) ESI mit *sheath-liquid*

#### 3.1.3.1. Das differentiell bepumptes Vakuumsystem

Um die notwendige Druckdifferenz zwischen Elektrospray (Atmosphärendruck;  $10^4$  Pa) und Massenanalysator ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$  Pa) zu gewährleisten, wird ein differentiell bepumptes Vakuumsystem verwendet.

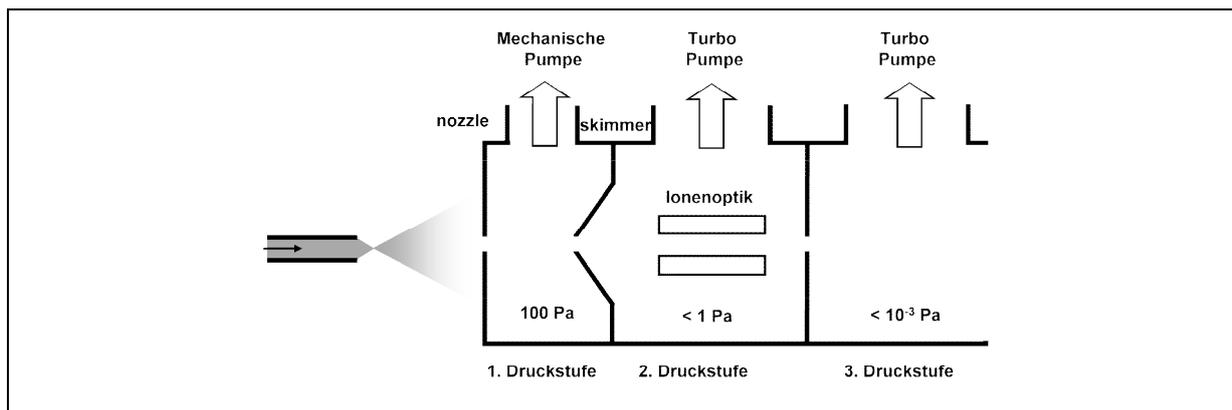


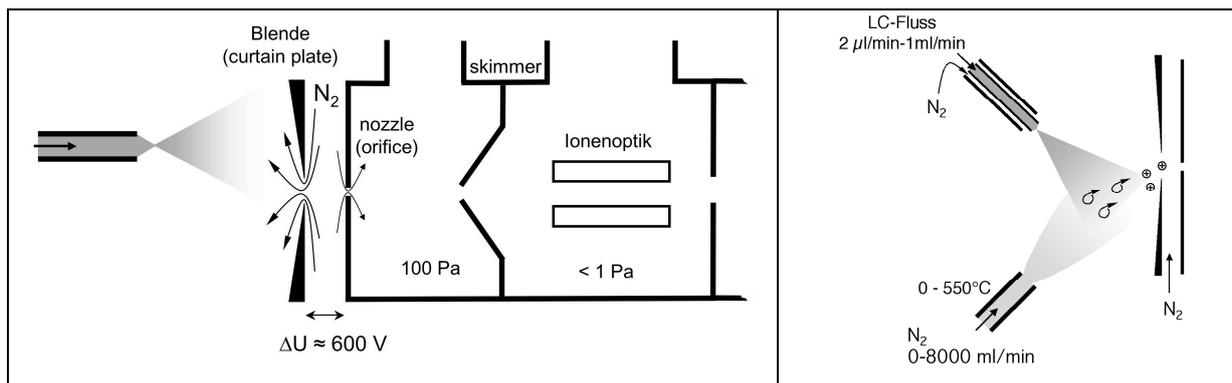
Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Ionenquelle für *atmospheric pressure ionisation* [92]

Dazu werden drei Druckstufen installiert: Vorvakuumbereich mit zwei Druckstufen (1 Pa, Ionenoptik  $< 1$  Pa) und Hauptvakuum (bis  $10^{-6}$  Pa). Die Druckstufen sind durch Lochblenden und *skimmer* voneinander getrennt. Die Lochblende, die den Atmosphärendruck vom ersten Vorvakuumbereich trennt wird *nozzle* oder *orifice* genannt. Für einen effizienten Ionen-transport sind zusätzlich Ionenoptiken installiert.

### 3.1.3.2. TurboIon Spray

Der Aufbau der TurboIon Spray-Quelle basiert auf der *Bruins-Sciex* Quelle (Abb. 3-8) [93]. Das Spray kann mit einem koaxial zugeführten *nebulizing gas* unterstützt werden. Senkrecht zum Spray wird ein bis zu  $550^{\circ}\text{C}$  aufgeheizter Stickstoffstrom mit einem Fluss von 0-8000 ml/min zugeführt, um die Verdampfung des Lösungsmittels und damit die Effizienz der Ionenbildung zu erhöhen (Abb. 3-8). Dieser Aufbau erlaubt Flussraten von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  bis zu 1 ml/min. Der Chromatographie des vorgeschalteten HPLC-Systems wird dadurch ein größerer Spielraum gewährt.

In der *Bruins-Sciex* Quelle befindet sich vor dem *orifice* noch eine zusätzliche Blende (*curtain plate*), die auch als Gegenelektrode zur Spraykapillare dient. Zwischen *curtain plate* und *orifice* strömt Stickstoff (*curtain gas*), was einerseits die Anlagerung nichtflüchtiger Stoffe am *orifice* verhindert und durch den Gegenstrom aus der *curtain plate*-Öffnung die Desolvatisierung (*declustering*) der geladenen Teilchen durch Stöße unterstützt. Die Stärke des Stickstoffstroms und die Beschleunigung der Teilchen zwischen *curtain plate* und *orifice*, d.h. die Potentialdifferenz zwischen diesen Bauteilen, tragen somit entscheidend zur Effizienz des Desolvatisierungsprozesses bei. Weitere Desolvatisierung erfolgt im Bereich der ersten



**Abb. 3-8:** Schematische Darstellungen der Bruins-Sciex-Quelle und des Turboionsprays.

Druckstufe bei einem Druck von 100 Pa durch Stöße der geladenen Teilchen mit den vorhandenen Gasmolekülen. Dazu werden die Teilchen zum *skimmer* hin mit einer Potentialdifferenz von 10-300 V beschleunigt. Diese Potentialdifferenz und der Druck zwischen *skimmer* und *orifice* sind somit entscheidende Parameter für die Desolvatisierung.

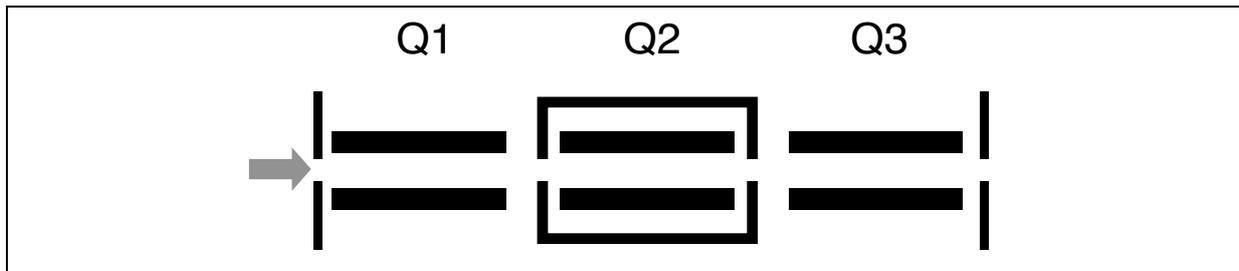
Wird beim Desolvatisierungsprozess zuviel Energie zugeführt, kann es zur Fragmentierung des Analyten durch Stöße mit Gasmolekülen kommen [94]. Daher ist eine genaue Abstimmung der verschiedenen Parameter nötig, um das intakte Molekülion detektieren zu können. Zu beachten ist dabei, dass mehrfach geladene Ionen erheblich stärker beschleunigt werden, und somit eher fragmentieren können als einfach geladene Ionen.

Diese stoßaktivierten Fragmentreaktionen (*collision induced dissociation*, CID) können analytisch genutzt werden. So ähneln die Produktspektren dieser *in-source* CID (oder „*poor Man's MS/MS*“ [95]) denen der MS/MS Fragmentierung in einer Stoßzelle. Allerdings ist hier keine Vorauswahl des Vorläuferions möglich. Mittels der *in-source* CID an linearen Quadrupol Massenspektrometern lassen sich Folgefragmentierungen durchführen, die in einer herkömmlichen Stoßzelle bei diesen Geräten nicht beobachtet werden können.

### 3.2. Tandem-Massenspektrometer

Aufgrund der schonenden Ionisierung mit ESI können aus den Massenspektren keine Informationen über die Struktur der Analyte erhalten werden, da die Moleküle (meistens) nicht fragmentieren. Mit der Entdeckung, dass stoßinduzierte Zerfallsprozesse Informationen über die physikalischen Eigenschaften und Strukturen organischer Ionen liefern, wurden verschiedene Kombinationen von Massenspektrometern eingesetzt, um Gasphasenionen zu untersuchen [98]. Mit Sektorfeldgeräten wurden *Hochenergie-Stoßaktivierungen* durchgeführt, da die Ionen in einem Sektorfeldgerät eine kinetische Energie von 3-10 keV

besitzen. Die Einführung des Triple-Quadrupol Massenspektrometers hat analytische Möglichkeiten weit über die chemisch-physikalische Grundlagenforschung hinaus eröffnet, da verschiedene Ionenquellen benutzt werden können und eine Kopplung mit chromatographischen Analysemethoden möglich ist. Die Ionen im Quadrupol besitzen eine kinetische Energie von 0-200 eV. Der Stoßprozess in Triple-Quadrupol Geräten wird daher als *Niedrigenergie-Stoßaktivierung* bezeichnet.



**Abb. 3-9:** Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol Massenspektrometers. Die Quadrupole Q1 und Q3 arbeiten als Massenselektoren. Der Quadrupol Q2 arbeitet nur mit Radiofrequenz und dient als Stoßzelle.

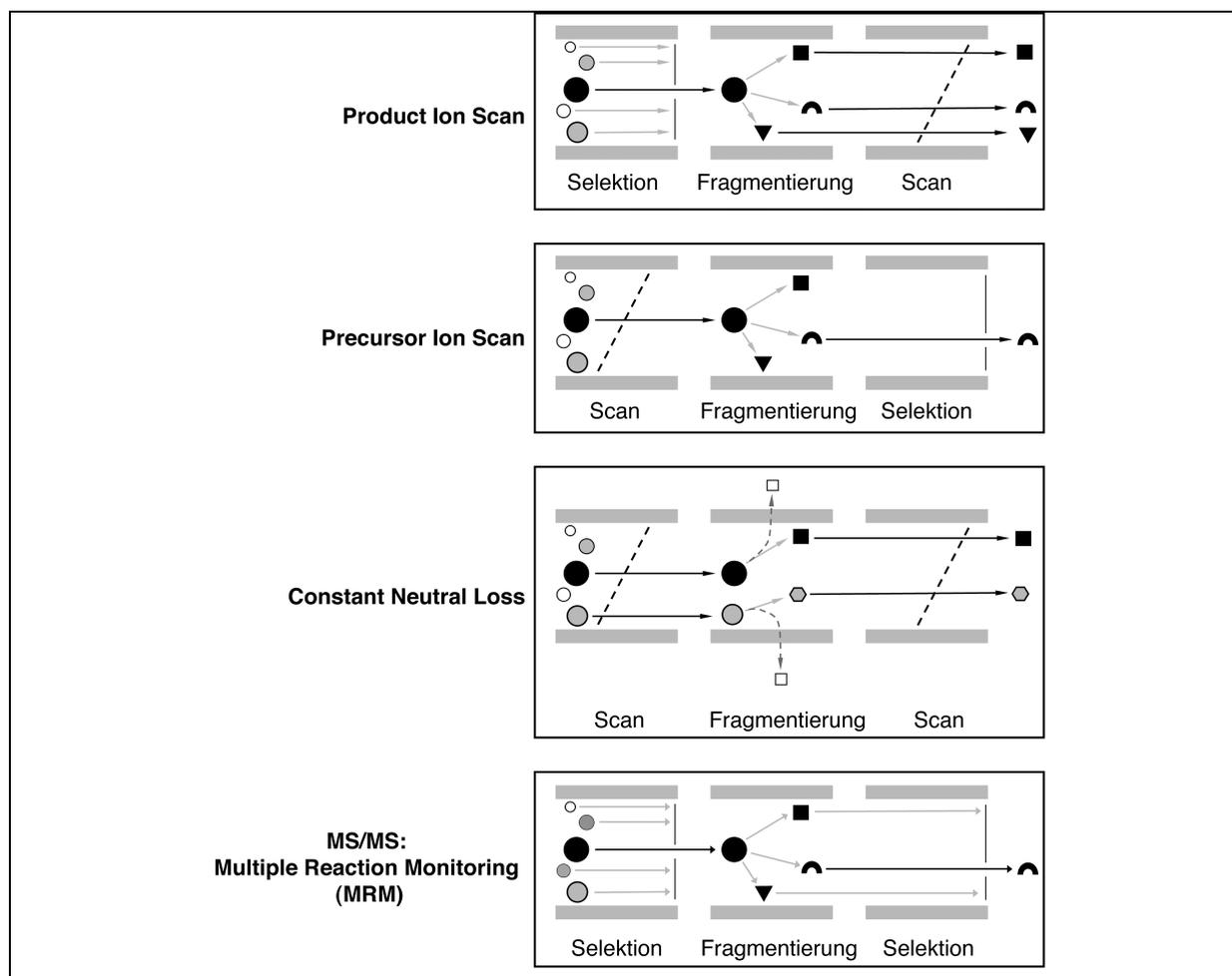
Abb.3-9 zeigt die schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol Massenspektrometers. Der Quadrupol Q1 selektiert ein Ion mit dem gewählten  $m/z$ -Verhältnis. Die Stoßzelle besteht aus einem Quadrupol (Q2), der nur mit Radiofrequenz arbeitet, und mit einem inerten Gas wie Stickstoff oder Argon befüllt ist. Durch den Zusammenstoß des Ions mit den Gasmolekülen kann es zu spezifischen Fragmentierungsreaktionen kommen. Die entstandenen Fragmente werden mit dem dritten Quadrupol (Q3) untersucht, der als normaler Massenselektor arbeitet.

Ein Triple-Quadrupol kann in verschiedenen Modi arbeiten, die jeweils andere Informationen zu einem Ion oder einem Gemisch verschiedener Substanzen liefern können (Abb. 3-10) [97]. Im *Product Ion Scan* selektiert der Q1 ein Ion mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis, das in die Stoßzelle eingelassen wird, und der Q3 scannt über einen ausgewählten Massenbereich. Alle aus der Stoßzelle austretenden Ionenfragmente mit einem  $m/z$ -Verhältnis innerhalb des gewählten Massenbereichs werden detektiert und ergeben ein Produktionenspektrum.

Im *Precursor Ion Scan* werden die Ionenfragmente mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis mit dem Q3 selektiert und mit dem Q1 wird über einen festgelegten Massenbereich gescannt. Bildet ein Ion ein Fragment mit dem selektierten  $m/z$ -Verhältnis, wird das Fragment registriert und das *Precursor* Ion ermittelt. So kann z.B. untersucht werden, ob verschiedene Ionen ein Fragment mit dem gleichen  $m/z$ -Verhältnis liefern.

Im *Neutral Loss Scan* kann die Abspaltung eines Neutralteilchens aus stoßaktivierten Ionen nachgewiesen werden. Der Q1 scannt einen gewählten Massenbereich ab und lässt die Ionen

zyklisch in die Stoßzelle. Synchron zum Q1 scannt der Q3 den um die Masse des nachzuweisenden Neutralverlustes zurückgesetzten Massenbereich ab. Dadurch werden nur Ionen am Detektor registriert, wenn der Q1 Ionen in die Stoßkammer lässt, die ein Fragment mit der gewählten Massendifferenz erzeugen. So lassen sich z.B. Substanzen in einem Gemisch nachweisen, die dasselbe Strukturelement aufweisen [99].



**Abb. 3-10:** Übersicht über die spezifischen Scan Moden, die mit einem Triple-Quadrupol möglich sind.

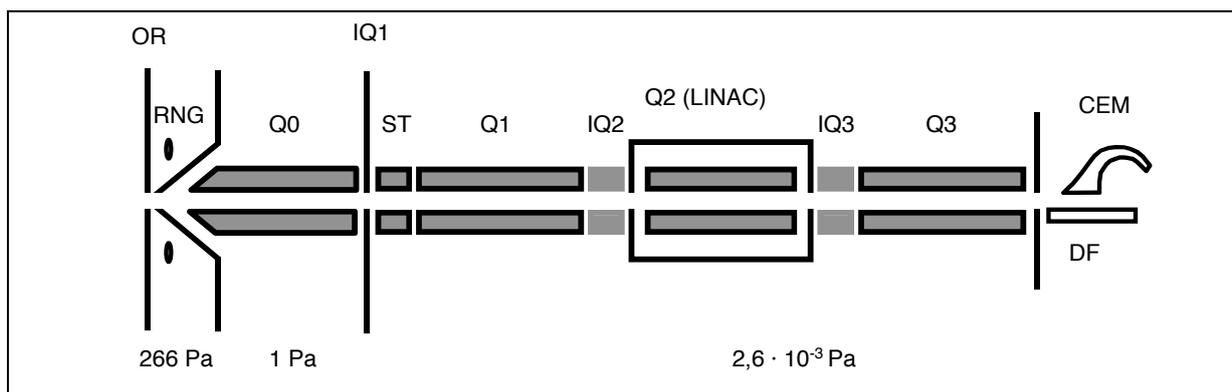
Das *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) ist für Quantifizierungen am besten geeignet. Q1 und Q3 sind fest auf ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis eingestellt. Der Q3 selektiert eine spezifische Fragmentmasse des vom Q1 transferierten Ions. Am Detektor wird somit nur ein bestimmtes Ion-Fragment Paar nachgewiesen.

Ein Triple-Quadrupol kann auch als Single-Quadrupol genutzt werden. Dazu wird in die Stoßkammer kein Gas eingelassen und der Q3 auf Radiofrequenz eingestellt, damit alle Ionen ungehindert durch Q2 und Q3 passieren können. Der Q1 scannt z.B. über einen gewählten

Massenbereich. Das Massenspektrum zeigt dann alle nachweisbaren Ionen innerhalb des gewählten Massenbereichs, die aus der Ionenquelle in das Massenspektrometer gelangt sind.

### 3.3. Sciex API 3000

Der Übergangsbereich vom Atmosphärendruck zum Vakuum besteht beim Sciex API 3000 aus einem differentiell bepumpten System mit einem Aufbau, der der Bruins-Sciex Quelle entspricht.



**Abb. 3-11:** Schematische Darstellung des Aufbaus des API 3000. **OR:** Orifice, **RNG:** Ringelektrode (Fokussiererring), **Q0:** Quadrupol mit Radiofrequenz, **IQ1:** erste Inter-Quadrupol Ionenlinse, **ST:** Stubbies, **Q1:** erster Massenanalysator, **IQ2:** zweite Inter-Quadrupol Ionenlinse, **Q2:** Stoßzelle (LINAC: linear acceleration cell), **IQ3:** dritte Ionenlinse, **Q3:** zweiter Massenanalysator, **DF:** Deflektor, **CEM:** channel electron multiplier, Detektor. Die vorherrschenden Drücke der jeweiligen Bereiche sind ebenfalls mit angegeben.

Die Ionen gelangen durch die Curtainplate und das *orifice* entlang eines elektrischen Gradienten in den ersten Vakuumbereich (266 Pa). Der Gradient wird durch die an die Curtainplate, das *orifice* und die Ringelektrode angelegten Spannungen erzeugt. Die Potentialdifferenz, die zwischen dem *orifice* und dem geerdeten *skimmer* liegt wird *declustering potential* (DP) genannt und bestimmt die kinetische Energie der Ionen in diesem Bereich. Der Druck liegt bei ca. 266 Pa. Hier brechen die Solvent-Analyt Cluster auf und es kann bei genügend hohem Potential ein Kollisions-induzierter Zerfall des Analyten stattfinden (CID). Die Ringelektrode (oder das *focusing potential* (FP)), unterstützt die Ionen auf dem Weg durch den *skimmer* in den zweiten Vakuumbereich (ca. 1 Pa) mit dem Q0. Der Q0 arbeitet nur mit Radiofrequenz und fokussiert die Ionen. Der relativ hohe Umgebungsdruck sorgt dafür, dass die Flugbahn der Ionen durch Stöße mit den umgebenden Gasmolekülen auf das Zentrum der Quadrupolstäbe fokussiert wird (*collisional focusing*). Dabei verlieren die Ionen radiale und axiale Energie, bevor sie in den Hochvakuumbereich ( $2,6 \cdot 10^{-3}$  Pa) gelangen, was wiederum die Auflösung und Sensitivität des Q1 verbessert. Die Ionen treten

durch die erste Inter-Quadrupol Ionenlinse (IQ1) durch und werden durch die *stubbies* (ST) in den ersten analytischen Quadrupol (Q1) fokussiert. Die Potentialdifferenz zwischen Q0 und Q2 bestimmt die kinetische Energie der Ionen, mit der sie in den Q2 eintreten (*collision energy* (CE)). Der Q2 dient als Stoßzelle. Die Potentialdifferenz zwischen Q2 und IQ3 wird *collision cell exit potential* (CXP) genannt. Gelangen die Ionen durch den zweiten analytischen Quadrupol (Q3), werden sie durch das am Deflektor angelegte Potential (DF) in den Elektronen Multiplier (*channel electron multiplier* (CEM)) gelenkt. Durch Veränderung der Spannung am CEM lässt sich die Intensität des detektierten Signals steuern.

### 3.3.1. LINAC-Stoßzelle

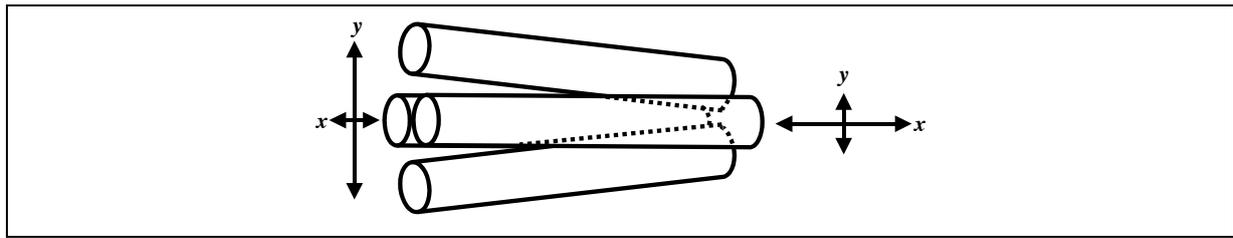
Die Stoßzelle des API 3000 hat eine bestimmte Geometrie, wodurch Ionen linear beschleunigt werden und die Transmission verbessert wird. Daher wird diese Form der Stoßzelle *linear acceleration cell* (LINAC) genannt.

Stößt ein Ion mit den umgebenden Gasmolekülen zusammen verliert es beständig an kinetischer Energie bis es nur noch durch Diffusion und die Repulsion nachrückender, gleich geladener Ionen aus der Stoßzelle gelangen kann. Dadurch sinkt die Transmission ab und die Verweilzeit steigt an. Eine lange Verweilzeit limitiert die Geschwindigkeit, Daten aufzunehmen, da die Ionen erst einmal die Zelle verlassen haben müssen, bevor die nächste Masse analysiert werden kann. So ist ein schnelles Umschalten auf verschiedene  $m/z$ -Verhältnisse im MRM Modus nicht möglich, ohne dass die Fragmente verschiedener Ionen dem falschen *Precursor* Ion zugewiesen werden (*cross-talk*) [100].

Seit der Einführung der Hochdruckstoßzelle durch Douglas and French [101] sind verschiedene Ansätze unternommen worden, um die Verweilzeit der Ionen in der Stoßzelle zu verkürzen [83, 102, 103].

Indem z.B. die Quadrupolstäbe gegeneinander gekippt werden (Abb. 3-12), entsteht im positiven Ionenmodus axial ein negativer Gradient, der positiv geladene Ionen entlang der  $z$ -Achse beschleunigt [102]. Die Verweildauer der Ionen kann durch diesen Aufbau verkürzt und die Transmission verbessert werden.

Mit dieser Form der Stoßzelle ist ein sehr schnelles Umschalten zwischen verschiedenen  $m/z$ -Verhältnissen im MRM Modus möglich, ohne *cross-talk* befürchten zu müssen. Scanzeiten (*dwell times*) von weniger als 20 ms sind möglich, wodurch eine große Anzahl unterschiedlicher Substanzen gleichzeitig gemessen werden kann.



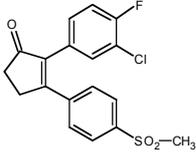
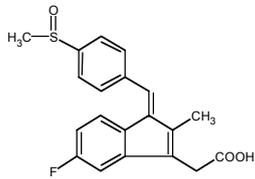
**Abb. 3-12:** LINAC Stoßzelle. Die Quadrupolstäbe sind zueinander gewinkelt angeordnet. Die Koordinatenkreuze stellen die Abstände der jeweiligen Stäbe zueinander dar. Der durch diese Anordnung axial entstehende elektrische Feldgradient zieht die sich zwischen den Stäben befindlichen Ionen und deren Fragmente aus der Zelle heraus. So wird ein *cross-talk* bei schnellem Schalten zwischen verschiedenen Massen vermieden.

## Ergebnisse und Diskussionen

### 4. Sensitive Bestimmung von Celecoxib mittels LC/MS/MS

#### 4.1. Literaturübersicht

Während der Entwicklung der analytischen Methode von Celecoxib wurde für die Quantifizierung eine HPLC Methode mit UV-Detektion von Rose et al. [104] und eine LC-MS Methode von Abdel-Hamid et al. [105] veröffentlicht (Tab. 4-1). Eine weitere LC/MS/MS Methode wurde von Zhang et al. beschrieben, die zur Identifizierung der Metabolite, aber nicht zur Quantifizierung von Celecoxib genutzt wurde [106].

	Rose et al. [104]	Abdel-Hamid et al. [105]
Extraktion, Probenvolumen Wiederfindung	Festphasenextraktion 1 ml 91%	Flüssig-flüssig Extraktion, 1ml 100 %
Säule	Vorsäule: Nucleosil-NO <sub>2</sub> 10 x 3,2 mm, 5µm Analyt. Säule: Nucleosil-NO <sub>2</sub> 150 x 4,6 mm, 5µ 27°C	Shim Pack GLC-CN C <sub>18</sub> 150 x 6mm, 5µm
Laufmittel, Flussrate	Hexan/Dichlormethan/Isopropanol 70:25:5 v/v/v, 1,4 ml/min	Acetonitril/Essigsäure 1% 80:20 v/v, 1ml/min
Detektion	UV, 260 nm	Finnigan LCQ Mass spectrometer (Ion-Trap), APCI, positiver SIM Mode mit m/z 382 (Celecoxib) und m/z 357 (Sulindac)
Injektionsvolumen	65 µl	20 µl
Konzentrationsbereich	25-2000 ng/ml	50-1000 ng/ml
Interner Standard		Sulindac 
Laufzeit	12 min	6 min
Retentionszeit Celecoxib, interner Standard	7,2 min 5,5 min	3,6 min 3,5 min

**Tab. 4-1:** Übersicht der publizierten über die Assays zur Quantifizierung von Celecoxib.

Rose et al. benutzen eine Säulenschaltung, um die Laufzeit zu verkürzen. Spät eluierende endogene Substanzen eluieren erst nach 20 min. Durch den Wechsel zwischen zwei Säulen konnte die Laufzeit auf 12 min verkürzt werden. Die Normalphasen-Chromatographie zeigte im Gegensatz zu einer RP-Chromatographie (Inertsil ODS-2, Acetonitril/Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,0 65:35 v/v) keine Störungen des Analyt-Peaks durch endogene Substanzen. Die bessere Trennung von Celecoxib und endogenen Substanzen auf der NO<sub>2</sub>-Säule beruhte auf Charge-Transfer Mechanismen zwischen Celecoxib und den NO<sub>2</sub>-Gruppen des Säulenmaterials, die unter Normalphasenbedingungen auftreten. Die Festphasenextraktion wurde mit C<sub>18</sub> Sorbens bei pH 3,0 ausgeführt. Mit Wasser und Acetonitril/Wasser 25:75 v/v wurde gewaschen und mit Acetonitril in der Zentrifuge eluiert, wodurch eine gegenüber der Vakuumkammer bessere Wiederfindung erreicht wurde. Nach dem Verdampfen des Acetonitrils wurde die Probe in 250 µl Laufmittel aufgenommen, was bedeutet, dass die Probe um den Faktor 4 aufkonzentriert wurde.

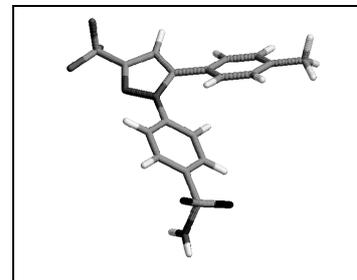
Das Assay von Abdel-Hamid et al. benutzte eine Ionenfalle und arbeitet im Single Ion Monitoring (Single-Quadrupol). Der Vorteil der massenspektrometrischen Detektion gegenüber der UV Detektion bestand in der besseren Selektivität. Endogene Substanzen störten kaum oder gar nicht. Der hohe Anteil an Acetonitril im Laufmittel bewirke eine schnelle Elution des Analyten von der Säule und damit eine schnellere Analytik. Da im positiven Ionenmodus gearbeitet wurde, unterstützte die Essigsäure die Ionisierung der Analyten. 1 ml Plasma wurde mit Ethylacetat bei pH 5 extrahiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 100-200 µl Laufmittel aufgenommen, was einem Aufkonzentrieren um den Faktor 10-5 entspricht.

## 4.2. Methodenentwicklung

Am Anfang der Methodenentwicklung für ein LC/MS/MS Assay steht die Einstellung, oder das *Tuning*, des Massenspektrometers. Als erstes muss getestet werden, ob sich Celecoxib überhaupt im Electrospray ionisieren lässt und analytisch verwertbare Fragmente produziert. Dann werden die Einstellungen der jeweiligen Spannungen auf Sensitivität optimiert und eine MRM-Methode erstellt und nachoptimiert. Schließlich wird noch die geeignete Zusammensetzung eines möglichen Eluenten gesucht und die Chromatographie getestet. Kann die Substanz auf dem Massenspektrometer gemessen werden, wird die Probenaufarbeitung entwickelt. Ist eine akzeptable Extraktionsmethode gefunden, werden

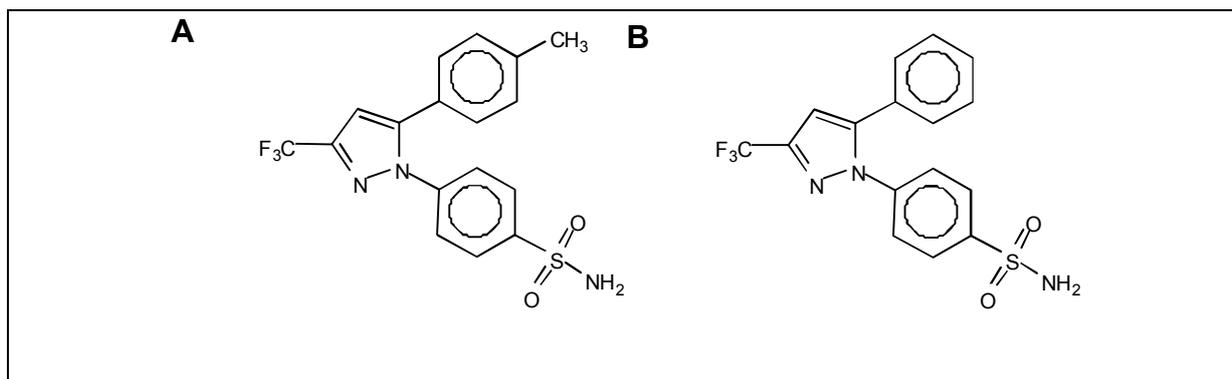
Extraktion und Messungen auf ihre Stabilität und Reproduzierbarkeit getestet und der valide Konzentrationsbereich für die Analytik bestimmt.

Celecoxib (4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamid) ist eine aromatische Substanz mit der Molekülmasse  $M_r$  381,37. Das Molekül ist nicht vollständig planar, da sich die Phenylringe aus sterischen Gründen aus der Ebene herausdrehen (Abb. 4-1). Die Sulfonamid-Gruppe reagiert schwach basisch. Celecoxib ist in Wasser unlöslich, daher wurde kein  $pK_a$ -Wert bestimmt. In organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril und DMSO löst sich Celecoxib gut. Die Lösung ist bei Raumtemperatur stabil.



**Abb. 4-1:** Optimierte Struktur von Celecoxib

Als interner Standard (IS: 4-[5-phenyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide) wurde eine Substanz genutzt, die im Vergleich zu Celecoxib an der 4-Position des Phenylrings keine Methylgruppe besitzt (Abb. 4-2).



**Abb. 4-2:** Strukturen von Celecoxib (A) und dem internen Standard (B)

## 4.2.1. Tuning des Massenspektrometers

### 4.2.1.1. Celecoxib

#### Detektion des Moleküliions

Um das Moleküliion zu detektieren wurde eine Lösung von 1000 ng/ml Celecoxib in Acetonitril/Wasser 80:20 v/v hergestellt und mit einer Flussrate von 10  $\mu$ l/min infundiert.

Im positiven Ionenmodus konnte das protonierte Moleküliion  $[M+H]^+$  einwandfrei bei  $m/z$  382,0 detektiert werden.

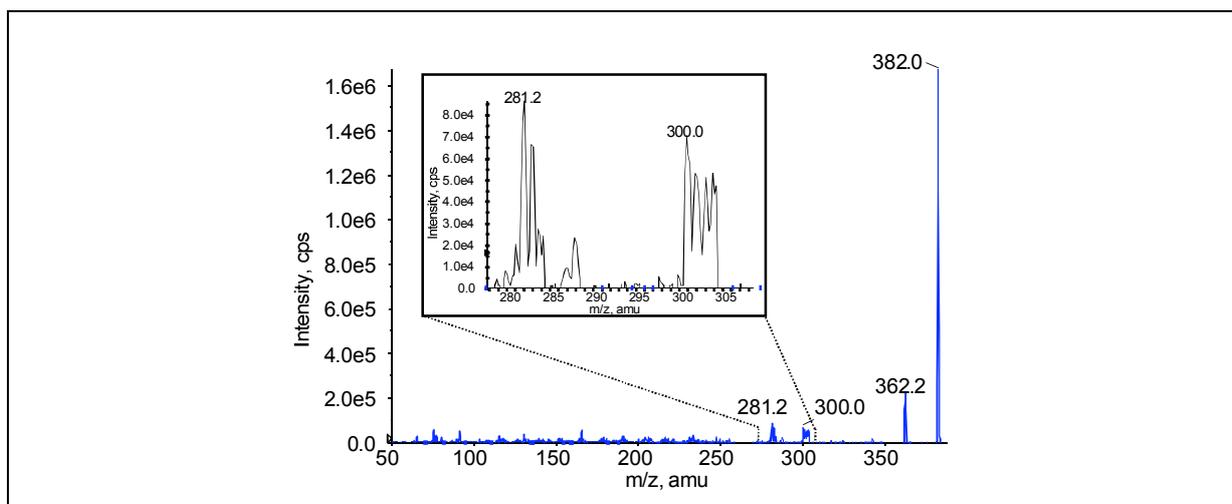
Keines der Elemente, aus denen Celecoxib aufgebaut ist, besitzt ein auffälliges Isotopenmuster, so dass sich das erhaltene Isotopenmuster aus  $^{13}\text{C}$ -Atomen (relative Häufigkeit 1,1 %) zusammensetzt ( $m/z$  383:  $1 \times ^{13}\text{C}$ ;  $m/z$  384:  $2 \times ^{13}\text{C}$ ) mit den der Auftretswahrscheinlichkeit entsprechenden Intensitäten (1:0,2:0,06).

Auch im negativen Ionenmodus konnte der Peak des deprotonierten Moleküls  $[\text{M}-\text{H}]^-$  bei  $m/z$  380,0 detektiert werden. Die Intensität des Signals war der Intensität im positiven Ionenmodus vergleichbar.

### Fragmentspektren

Im positiven Ionenmodus fand sich ein Fragment bei  $m/z$  362,2, was einem Massenverlust von  $m/z$  20 entspricht. Dies ist ein Hinweis auf eine Abspaltung von HF. Allerdings konnte diese Fragmentierung nicht immer reproduziert werden.

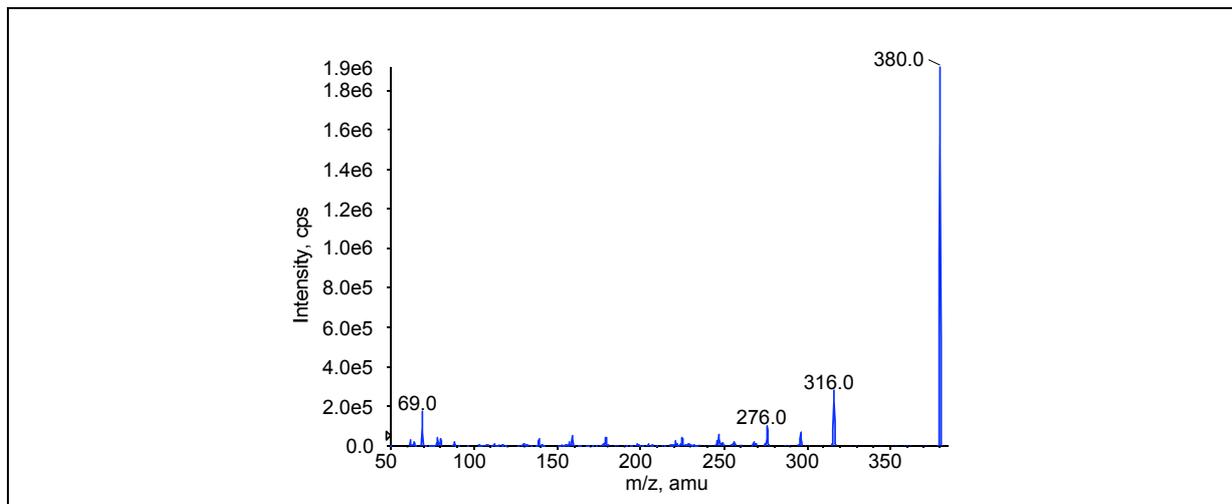
Weitere analytisch verwertbare Fragmente wurden im positiven Ionenmodus nicht gebildet. Die Fragmente bei  $m/z$  300,0 und 281,2 setzen sich aus mehreren sich überlagernden Signalen zusammen und sind daher analytisch nicht nutzbar (Abb. 4-3).



**Abb. 4-3:** Fragmentspektrum von Celecoxib im positiven Ionenmodus

In negativer Ionisierung wurden mehrere diskrete und analytisch verwertbare Fragmente mit dem  $m/z$ -Verhältnis 316,0, 276,0 und 69,0 gebildet (Abb. 4-4). Mittels des automatischen Tuning Tools der Analyst Software wurden die Parameter des Massenspektrometers (DP, FP, CE, CXP und CEM) auf die Empfindlichkeit hin optimiert. Die fertige MRM Methode wurde verwendet, um DP und FP manuell zu optimieren. Dazu wurde eine Lösung von 10 ng/ml Celecoxib in Methanol/Wasser 80:20 v/v mit einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  infundiert. Das organische Lösungsmittel wurde von Acetonitril auf Methanol gewechselt, weil Methanol

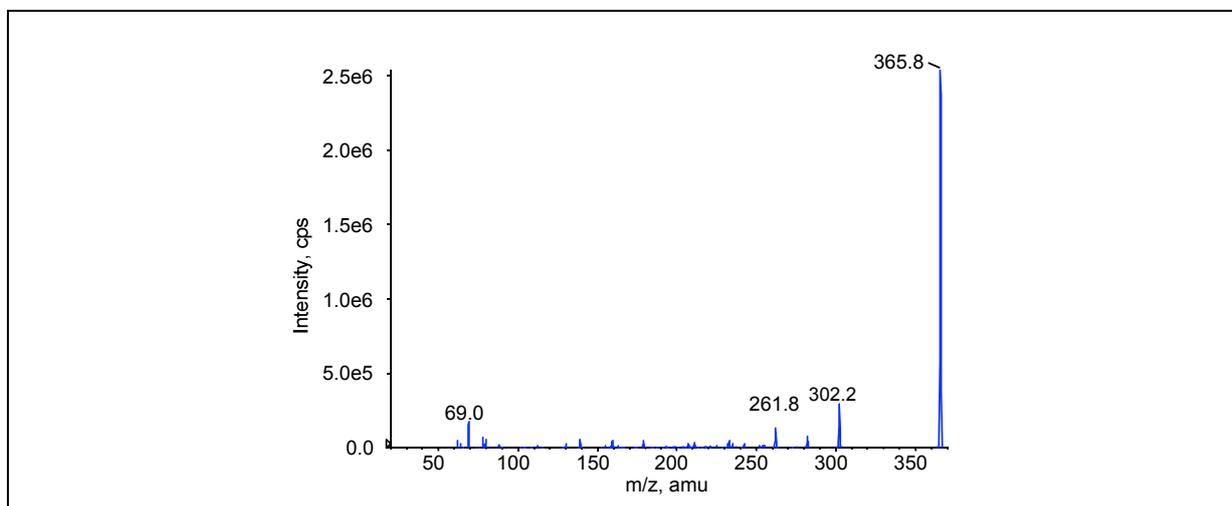
eine ökonomisch günstigere Alternative darstellt und in diesem Stadium keine Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen Methanol und Acetonitril auffällig waren.



**Abb. 4-4:** Fragmentspektrum von Celecoxib im negativen Ionenmodus

#### 4.2.1.2. Interner Standard (IS)

Analog zum Celecoxib wurde die Methode für den IS entwickelt. Das Fragmentspektrum ähnelt dem Fragmentspektrum des Celecoxib. Da der IS um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe leichter ist als Celecoxib, ist das Fragmentspektrum gegenüber dem Fragmentspektrum von Celecoxib um  $m/z$  14 zu kleineren Werten\* hin verschoben.



**Abb. 4-5:** Fragmentspektrum vom internen Standard im negativen Ionenmodus

#### 4.2.1.3. Die MRM Methode

Die Werte des Tunings wurden übernommen um die MRM Methode zu erstellen. Zunächst wurde je eine Massenspur für Celecoxib ( $m/z$  380.0 $\rightarrow$ 316) und den internen Standard ( $m/z$  365,8 $\rightarrow$ 302,2) aufgenommen. Im Verlauf der Methodenoptimierung wurde bei der

Umstellung der organischen Phase von Methanol auf Acetonitril für Celecoxib und den IS je eine weitere Massenspur aufgenommen, die als Qualifier dienen sollte. Für Celecoxib war dies  $m/z$  380,0 $\rightarrow$ 276,0 und für den IS  $m/z$  365,8 $\rightarrow$ 261,8.

#### 4.2.1.4. Die Wahl des Laufmittels

Im negativen Ionenmodus kann die Deprotonierung des Analyten und damit die Ionisierung durch die Zugabe einer Base noch verstärkt werden. Mittels *Flow Injection Analysis* wurde das Laufmittel mit Methanol/Wasser 80:20 v/v mit Methanol/Wasser/20%ige Ammoniumhydroxid-Lösung (NH<sub>4</sub>OH 20%) 80:20:0,1 v/v/v verglichen. Proben mit einer Konzentration von 10 ng/ml wurden in dem entsprechenden Laufmittel angesetzt und davon jeweils 10  $\mu$ l eingespritzt. Das *auxiliary gas* wurde auf einen Fluss von 4000 ml/min und einer Temperatur von 300 °C eingestellt. Die Zugabe von NH<sub>4</sub>OH (20%) verdoppelte die Intensität der Signale.

Die Quelleneinstellungen wurden ebenfalls mittels FIA, einer Lösung von 10 ng/ml und einem Injektionsvolumen von 10  $\mu$ l auf das Laufmittel hin nachgebessert.

#### 4.2.1.5. Chromatographie

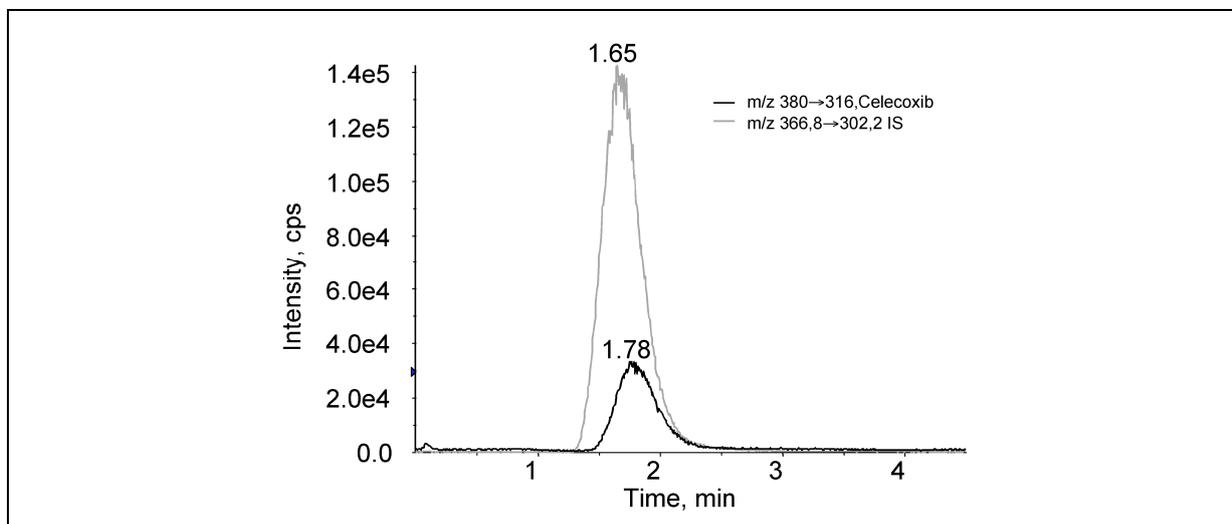
##### Plasma Proben

Von Anfang an wurde auf eine schnelle Analytik Wert gelegt, ähnlich einer High-Troughput Methode, basierend auf einer LC/MS/MS-Methode für Remifentanyl [107]. Daher wurde eine kurze, 30 mm lange Säule mit einem Innendurchmesser von 2 mm als analytische Säule mit Nucleosil C<sub>18</sub> Material (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 5  $\mu$ ) eingesetzt. Eine Trennung des Analyten von störenden Substanzen war aufgrund der MS/MS Technologie nicht zwingend notwendig.

##### *Methode CLX-1*

Das Laufmittel setzte sich zusammen aus Methanol/Wasser/ NH<sub>4</sub>OH (20%) 80:20:0,1 v/v/v. Mit einer Flussrate von 0,2 ml/min ergab sich eine geeignete Chromatographie (Abb. 4-6). Die Peaks zeigten sowohl ein leichtes Fronting als auch ein leichtes Tailing. Die Retentionszeit von Celecoxib war stets ca. 0,1 min länger als die des internen Standards. Die Peakbreite auf halber Peakhöhe  $w_{1/2}$  betrug für Celecoxib und den internen Standard 0,32 min.

Die Kapazität  $k'$  dieser chromatographischen Trennung betrug bei einer Totvolumenlaufzeit  $t_0$  von 0,42 min für Celecoxib  $k'=2.97$ , und für IS  $k'=2,80$ .

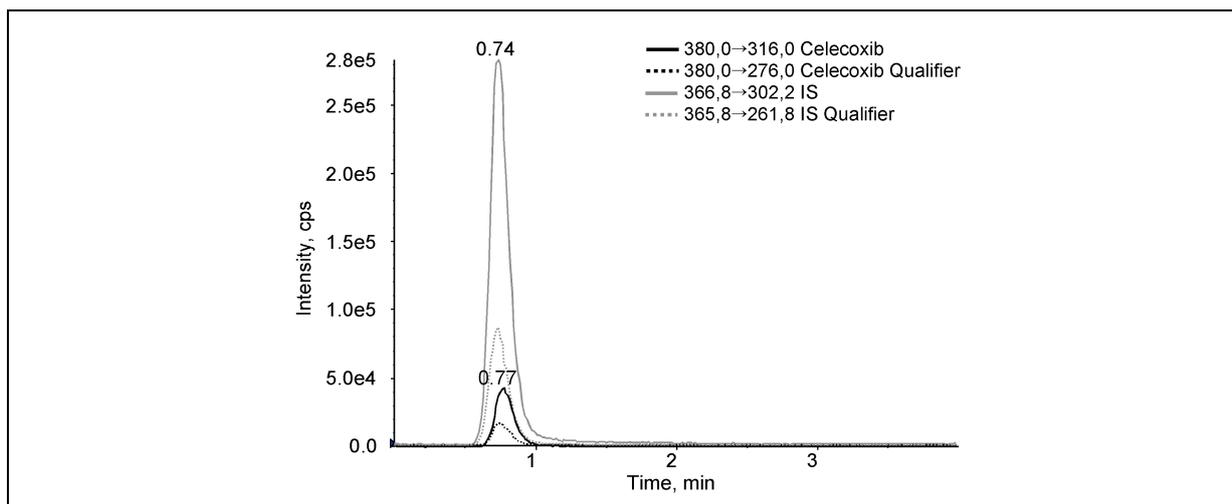


**Abb. 4-6:** Methode CLX-1: Repräsentatives Chromatogramm eines extrahierten Humanplasma-Standards: Säule Nucleosil C<sub>18</sub> (30 x 2 mm, 100 Å, 5 µm) Laufmittel: Methanol/Wasser/NH<sub>4</sub>OH (20%) 80:20:0,1 v/v/v, Flussrate: 0,2 ml/min; Celecoxib 10 ng/ml, IS 5 ng/ml

#### Methode CLX-2

Die Empfindlichkeit konnte durch den Wechsel von Methanol auf Acetonitril und die Erhöhung des organischen Anteils verbessert werden. Das neue Laufmittel setzte sich zusammen aus Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 85:15:0,1 v/v/v. Die Retentionszeit verkürzte sich von 1,5 min auf 0,8 min (Abb. 4-7). Die Laufzeit wurde bei 4 min belassen, da ein langes *tailing* bei hohen Konzentrationen auftrat und die Säule in der Zeit rekali­brieren konnte. Der Peak wurde schmaler ( $w_{1/2}=0,15$  min), das Signal/Rausch Verhältnis verbesserte sich und dadurch auch die Empfindlichkeit der Methode. Der Kapazitätsfaktor war für beide Substanzen  $k'=0,85$ . Gleichzeitig wurde eine Qualifier Massenspur für Celecoxib und IS eingeführt. Die Konzentration des IS wurde auf 50 ng/ml erhöht, um die Stabilität der Methode zu verbessern.

Die Temperatur des *auxiliary gas* wurde auf 400°C bei einem Fluss von 4500 ml/min eingestellt.



**Abb. 4-7:** Methode CLX-2: Repräsentatives Chromatogramm eines extrahierten Humanplasma-Standards: Säule Nucleosil C<sub>18</sub> (30 x 2 mm, 100 Å, 5 µm) Laufmittel: Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 85:15:0,1 v/v/v, Flussrate: 0,2 ml/min; Celecoxib 10 ng/ml, IS 50 ng/ml

## Microdialysate

### *Methode CLX-Microdialysat*

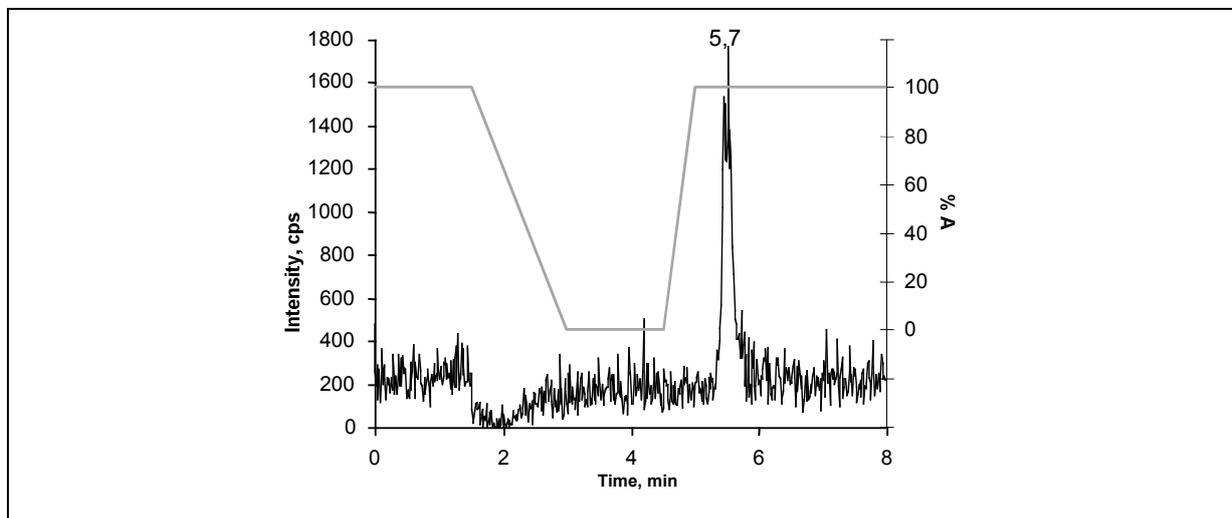
Die im Dialysat enthaltenen Salze verursachten eine erhebliche Signalsuppression („Salzpeak“). Koeluierten die Salzbestandteile des Dialysats mit dem Analyten, konnte der Analyt nicht mehr nachgewiesen werden. Daher war es wichtig, den Analyten chromatographisch ausreichend von den Salzbestandteilen des Dialysats zu trennen.

Eine Extraktion der Dialysate war aufgrund der kleinen Probenmenge von 30-50 µl und der zu erwartenden geringen Konzentrationen schwierig bis unmöglich. War allerdings eine chromatographische Trennung möglich, konnte das Dialysat ohne Aufarbeitung injiziert werden. Da es nur geringe Mengen an biologischer Matrix enthielt, war eine schnelle Kontamination des Massenspektrometers durch diese nicht zu erwarten.

Um eine ausreichende Retention der Analyte zu erreichen, wurde eine längere Säule verwendet (70 x 2 mm) mit Nucleosil C<sub>18</sub> Material (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 5 µ). Um den Salzanteil sauber abtrennen zu können, wurde zunächst mit einem Gradientenprogramm aus zwei Laufmitteln mit unterschiedlichen organischen Anteilen gearbeitet.

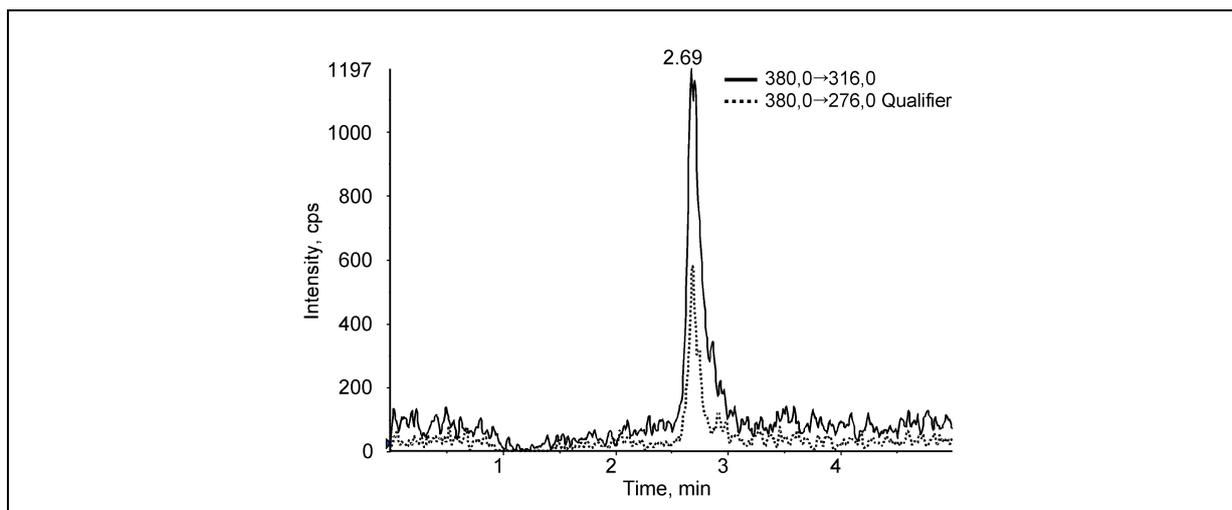
Laufmittel A setzte sich zusammen aus Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 10:90:0,1 v/v/v und Laufmittel B aus Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 90:10:0,1 v/v/v. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Die ersten 1,5 min wurden mit 100% A gespült, um den Salzpeak mit hohem wässrigem Anteil möglichst schnell zu eluieren. Von 1,5 bis 3 min wurde auf 100% B

gefahren und für 1,5 min belassen. Nach 4,5 min wurde innerhalb von 0,5 min wieder auf 100% A zurückgefahren, um die Säule für 3 min bis zur nächsten Probe rekalisieren zu lassen. Das Gradientenprogramm ist zusammen mit dem sich daraus ergebenden Chromatogramm graphisch in Abb. 4-8 dargestellt.



**Abb. 4-8:** Gradientenprogramm und resultierendes Chromatogramm von Celecoxib aus Microdialysaten (ACSF, *artificial cerebrospinal fluid*). Säule Nucleosil C<sub>18</sub> (70 x 2 mm, 100 Å, 5 µm) Laufmittel: Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 65:35:0,1 v/v/v, Flussrate: 0,2 ml/min; Celecoxib 1 ng/ml.

Mit dem dargestellten Gradienten gelang eine sehr gute Chromatographie ( $w_{1/2}=0,2$  min,  $k'=11,7$ ). Kürzere Laufzeiten konnten nicht erreicht werden, da der Salz- und der Analytenpeak zusammenliefen, oder die Rekalibrierungszeit zu kurz war und die Chromatographie der nächsten Probe dadurch nur ungenügend gelang.



**Abb. 4-9:** Repräsentatives Chromatogramm der isokratischen Elution eines Standards mit 1ng/ml Celecoxib in ACSF.

Mittels einer isokratischen Elution konnte die Laufzeit auf 5 min gesenkt werden. Mit derselben Säule (70 x 2 mm), einem Laufmittel der Zusammensetzung Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH (20%) 65:35:0,1 v/v/v und einer Flussrate von 0,2 ml/min ergab sich eine ausreichend gute Trennung des Analyten vom Salzpeak ( $w_{1/2}=0,12 \text{ min}$ ,  $k'=4,76$ ). Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde die Temperatur des *auxiliary gas* auf 500°C bei einem Fluss von 6000 ml/min eingestellt.

### 4.2.1.6. Extraktionsverfahren

Verschiedene Extraktionsmethoden wurden getestet, um einerseits die Methode mit der besten Wiederfindung zu ermitteln, um aber auch eine Methode zu finden, die schnell und einfach in der Durchführung ist. Diese Methode sollte verschiedenen Matrices gerecht werden, sei es die Bestimmung von Celecoxib aus Plasma, Zellkulturmedium oder Gewebeproben. Flüssig-flüssig Extraktion, Festphasenextraktion, Proteinfällung mit Acetonitril und Ultrafiltration wurden mit je 200 µl Plasma durchgeführt. Für die verschiedenen Experimente wurde humanes Leerplasma verwendet, da dieses in ausreichender Menge stets verfügbar war.

Mit 100 ng/ml Celecoxib versetzte Plasmaproben wurden über sukzessives Verdünnen mit Plasma aus der Stocklösung von Celecoxib (1 mg/ml in Acetonitril) hergestellt. Die Wiederfindung wurde mit dem Verhältnis der Peaks der extrahierten Proben zu den Peakflächen der Standards in Lösungsmittel bestimmt<sup>2</sup>.

Da zu diesem Zeitpunkt keine Matrixeffekte bestimmt wurden, sind die in Tab. 4-2 genannten Werte nur richtungweisend. Die angegebenen Wiederfindungen können jedoch untereinander verglichen werden, weil für Celecoxib später kein nennenswerter Matrixeffekt gefunden wurde

### Flüssig-flüssig Extraktion

Als organisches Extraktionsmittel wurden Ethylacetat, Dichlormethan, Diethylether und Heptan verwendet um eine möglichst große Breite verschiedener organischer Lösungsmittel abzudecken. Diese Lösungsmittel unterscheiden sich jeweils in ihren Polaritäten und funktionellen Gruppen. Ethylacetat ist als kurzkettiger Ester das polarste der genannten

---

<sup>2</sup> Zu diesem Zeitpunkt war die Bedeutung der Matrixeffekte noch nicht bekannt. Korrekterweise sollten zu jedem Extraktionsverfahren neben gespikten Proben auch Leerplasmaproben aufgearbeitet werden, die vor dem Verblasen des Lösungsmittels mit Substanz versetzt werden und dann als Referenzstandards dienen. Auf diese Weise werde eventuelle Matrixeffekte beim Vergleich der Peakflächen von Standards und extrahierten Proben ausgeschlossen.

Lösungsmittel, Dichlormethan besteht aus einem relativ kleinen, schwach polarisiertem Molekül, Diethylether ist zwar unpolarer als Dichlormethan, besitzt aber ein Sauerstoffatom, das für gewisse Solvationseffekte sorgen kann, und Heptan ist ein langkettiges Molekül, das als reiner Kohlenwasserstoff völlig unpolar ist. Toluol als unpolares, aromatisches Lösungsmittel wurde von Anfang an wegen des hohen Siedepunktes und der damit erheblich verlängerten Verdampfungszeit verworfen. Gemische aus zwei der genannten Lösungsmittel wurden ebenfalls getestet.

Die flüssig-flüssig Extraktion lief nach folgendem Schema ab: 200 µl Plasma mit 500 ng/ml Celecoxib wurden mit 200 µl 0,1 M Puffer versetzt, am Vortex kurz geschüttelt und mit organisches Lösungsmittel am Überkopfschüttler für 20 min extrahiert. Bei 3300 g wurde die Mischung 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und im Stickstoffstrom bei 50°C eingetrocknet. Nach dem Abtrennen der organischen Phase wurde bei einigen Versuchen nochmals mit der gleichen Menge Lösungsmittel extrahiert. Der Rückstand wurde in Methanol/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 80:20:0,1 v/v/v aufgenommen.

Extraktionsmittel	Puffer	Extraktionen	Wiederfindung Celecoxib in %	Wiederfindung IS in %
Diethylether	PP, pH 3,0	1 x 3 ml	40	-
Heptan	PP, pH 3,0	1 x 3 ml	0,1	-
Ethylacetat	PP, pH 3,0	1 x 3 ml	20	-
Dichlormethan	PP, pH 3,0	1 x 3 ml	49	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	PP, pH 7,0	2 x 3 ml	74	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	AmAc, pH 9	2 x 3 ml	69	-
Dichlormethan/Acetonitril 50:50 v/v	AmAc, pH 9	1 x 5 ml	36	-
Ethylacetat	AmAc, pH 9	2 x 3 ml	29	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	AmAc, pH 9	2 x 3 ml	60	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	PP, pH 7	2 x 3 ml	60	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	PP, pH 4	2 x 3 ml	74	-
Heptan/Diethylether 50:50 v/v	AmAc, pH 4	1 x 5 ml	43	41
Dichlormethan	AmAc, pH 4	1 x 5 ml	39	40

**Tab. 4-2:** Wiederfindungsraten verschiedener Pilotversuche mit flüssig-flüssig Extraktion von Plasmaproben mit 500 ng/ml Celecoxib (und 50 ng/ml IS). IS: interner Standard, PP: 0,1 M Phosphatpuffer; AmAc: 0,1 M Ammoniumacetatpuffer

In Tab. 4-2 sind die Einzelheiten der Pilotversuche zu flüssig-flüssig Extraktionen (Lösungsmittel, Art der Pufferlösung und pH, Anzahl der Extraktionen) und die Wiederfindungsraten für die verschiedenen Experimente zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert des eingesetzten Puffers keinen nennenswerten Einfluss auf die Wiederfindung hatte. Zweimaliges Extrahieren führte zu erheblichen Verbesserungen der Wiederfindung, wenn Heptan/Diethylether 50:50 v/v verwendet wurde.

### **Aufarbeitung durch Proteinfällung**

Die Plasmaproteine können mit Lösungsmitteln, die mit Wasser mischbar sind, gefällt werden. In einem Verhältnis von 1:3 Plasma/Acetonitril ist eine quantitative Ausfällung der Proteine möglich. 600 µl Acetonitril wurden zu 200 µl Plasma zugegeben, am Vortex 1 min geschüttelt und bei 12.000g 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte ohne weitere Aufarbeitung in die HPLC injiziert werden. Für Celecoxib ergab sich bei dieser Aufarbeitung eine Wiederfindung von weniger als 10%.

### **Extraktion mit Ultrafiltration**

200 µl Plasma wurden über einen Polyacetatfilter mit einem Cut-Off von 10 kDa über 30 min bei 12.000g zentrifugiert. Im klaren Filtrat von Plasmaproben mit bis zu 5000 ng/ml Celecoxib konnte keine nachweisbare Konzentration des Analyten ermittelt werden. Zum Vergleich wurde eine wässrige Lösung mit 1000 ng/ml Celecoxib filtriert. Im Filtrat dieser Lösung konnte ebenfalls kein Celecoxib nachgewiesen werden.

### **Festphasenextraktion**

Für die Festphasenextraktion wurden C<sub>18</sub> - und Propyl-Phenyl Sorbentien verwendet. Die Cartridges hatten ein Volumen von 1 ml und waren mit 100 mg Sorbens gefüllt. 200 µl Plasma mit 100 ng/ml Celecoxib wurden mit 200 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 4,0 versetzt<sup>3</sup>. In allen Fällen wurde mit 2 x 1 ml Acetonitril konditioniert und mit 2 x 1 ml Wasser gewaschen. Nachdem die Probe auf die Cartridge aufgegeben wurde, wurde in den einzelnen Versuchen mit verschiedenen Lösungen zweimal gewaschen. Eluiert wurde mit Acetonitril, Methanol, Dichlormethan oder Aceton. In Tab. 4-3 sind die Ergebnisse der Wiederfindungen zusammengefasst.

---

<sup>3</sup> In Pilotversuchen ergab sich bei pH 4,0 eine geringfügig bessere Wiederfindung als bei pH 3,0.

Die Verwendung des Propyl-Phenyl-Sorbens ergab nur schlechte, die Extraktion mit C<sub>18</sub> Sorbens allerdings eine akzeptable Wiederfindungen. Nur Heptan konnte den Analyten nicht vom C<sub>18</sub>-Sorbens lösen und lieferte so keine Wiederfindung. Allerdings ergab sich bei der Elution mit Ethylacetat und Aceton nach dem Verdampfen eine sichtbare Menge gelblichen Rückstands, der bei der Elution mit Methanol, Dichlormethan und Acetonitril nicht auftrat.

Die Elution mit Methanol, Dichlormethan und Acetonitril ergab eine vergleichbare Wiederfindung. Da Dichlormethan einen niedrigeren Siedepunkt hat (Kp.: 41°C) und damit schneller verdampft als Methanol (Kp.: 65°C) und Acetonitril (Kp.: 81,5°C), wurde Dichlormethan als Elutionsmittel gewählt.

SPE C <sub>18</sub>	Aceton	107%
	MeOH	110%
	Dichlormethan	102%
	Heptan	0%
	EtAc	102%
	ACN	101%
SPE PH	Aceton	20%
	MeOH	20%
	Dichlormethan	14%
	Heptan	0%
	EtAc	22%
	ACN	23%

**Tab. 4-3:** Wiederfindung von Celecoxib nach Festphasenextraktion mit C<sub>18</sub> Cartridges (SPE C<sub>18</sub>) und Propyl-Phenyl Cartridges (SPE PH)

#### 4.2.1.7. Matrixeffekte

Matrixeffekte von Plasmaproben wurden für die Festphasenextraktionsmethode und die Chromatographie nach der Methode CLX-2 ermittelt. Leerplasmen von sechs verschiedenen Spendern wurden extrahiert. Das Eluat der Festphasenextraktion wurde mit 200 µl einer Lösung mit 10 ng/ml Celecoxib und 50 ng/ml IS in Acetonitril versetzt. Der Rückstand wurde nach dem Eintrocknen des Lösungsmittels in 200 µl Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 85:15:0,1 v/v/v aufgenommen und vermessen. Die Peakflächen der Extrakte wurden mit den Peakflächen von entsprechenden Standards im Laufmittel verglichen (Tab. 4-4).

Die Matrixeffekte von Microdialysaten konnten nur mit ACSF abgetestet werden, da keine Leerdialysate aus Tierversuchen zur Verfügung standen. Sie wurden für die isokratische Chromatographie (Methode CLX-Microdialysat) bestimmt, indem zwölf Proben mit 10 ng/ml Celecoxib vermessen wurden. Die Peakflächen der Proben wurden mit den Peakflächen der

entsprechenden Lösungsmittelstandards verglichen. Daraus ergab sich eine Signalsuppression um den Faktor 15 ( $\pm 2$ ) gegenüber dem Lösungsmittelstandard.

	Celecoxib	IS	Peakfläche Celecoxib/ Peakfläche IS	Variationskoeffizient
Standard			0,94 $\pm$ 0,02	2%
Plasma 1	101%	93%	1,01 $\pm$ 0,01	1%
Plasma 2	98%	98%	1,03 $\pm$ 0,04	4%
Plasma 3	103%	99%	0,98 $\pm$ 0,03	3%
Plasma 4	96%	94%	0,92 $\pm$ 0,03	3%
Plasma 5	96%	91%	1,06 $\pm$ 0,11	10%
Plasma 6	95%	89%	0,94 $\pm$ 0,01	1%

**Tab. 4-4:** Signalsuppression durch Plasma Matrix von Celecoxib und IS nach Festphasen Extraktion. Quotienten aus den Peakflächen von Celecoxib und IS.

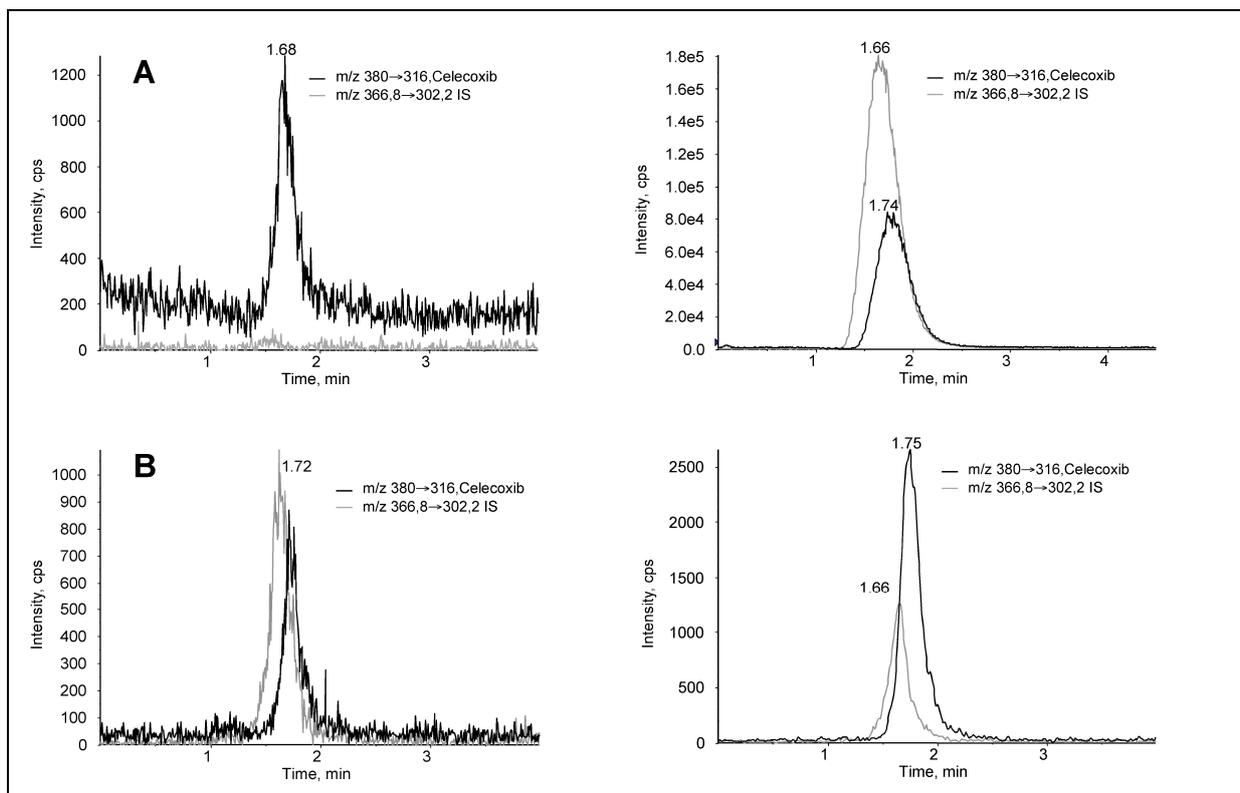
### 4.3. Validierung der Methoden zur Bestimmung von Celecoxib mittels LC/MS/MS

#### 4.3.1. Bestimmung aus Human- und Rattenplasma (Methode CLX-1)

Die Validierung ergab sich aus Daten, die in verschiedenen Messungen erhoben wurden. Matrixeffekte wurden für diese Methode nicht bestimmt, da deren Bedeutung zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung und Messungen noch nicht bekannt war.

##### 4.3.1.1. Spezifität der Chromatographie

Die Massenspur  $m/z$  380→316 von Celecoxib mit zeigen Signale für die entsprechende Retentionszeit von Celecoxib in Leerplasmaextrakten von Human- und Rattenplasma. Im Rattenplasma trat zusätzlich ein Signal in der Massenspur  $m/z$  380→316 des IS auf. Die Höhe dieses Störpeaks ist über mehrere Messungen hin konstant und kann daher von gemessenen Werten abgezogen werden. Bei höheren Konzentrationen ist die Fläche dieses Störpeaks nicht mehr relevant, da sie innerhalb der Fehlergrenzen liegt.



**Abb. 4-10:** A: Repräsentative Chromatogramme der Extrakte von Humanleerplasma und dem Extrakt einer mit 10 ng/ml Celecoxib und 50 ng/ml IS versetzten Humanplasmaprobe. B: Repräsentative Chromatogramme der Extrakte von Rattenleerplasma und dem Extrakt einer mit 10 ng/ml Celecoxib und 5 ng/ml IS versetzten Rattenplasmaprobe. Die Chromatogramme wurden im negativen Modus mit den Massenspuren  $m/z$  380→316 für Celecoxib  $m/z$  380→316 für IS aufgenommen.

#### 4.3.1.2. Präzision und Genauigkeit des Assays

Insgesamt wurden vier Eichgeraden mit Humanplasma und drei Eichgeraden mit Rattenplasma mit jeweils sieben Konzentrationen gemessen.

Die Peakflächenverhältnisse von Celecoxib und IS wurden ohne Gewichtung der Eichgerade gegen die Konzentrationen aufgetragen. Aus den Messungen ergab sich ein linearer Bereich von 25 – 1000 ng/ml für Humanplasma und von 10-500 ng/ml für Rattenplasma.

Nominelle Konzentration (ng/ml)	Mittlere gemessene Konzentration (ng/ml) $\pm$ größte Abweichung (n=4)	Fehler (%)	Genauigkeit (%)
10	12 $\pm$ 9	73	99,8
25	24 $\pm$ 1	3	95,1
50	49 $\pm$ 5	10	97,1
100	105 $\pm$ 3	2	104,0
250	259 $\pm$ 16	6	103,0
500	513 $\pm$ 27	5	101,5
1000	974 $\pm$ 75	8	97,9

**Tab. 4-5:** Assay Präzision und Genauigkeit für die Bestimmung von Celecoxib in Humanplasma mit der Methode CLX-1.

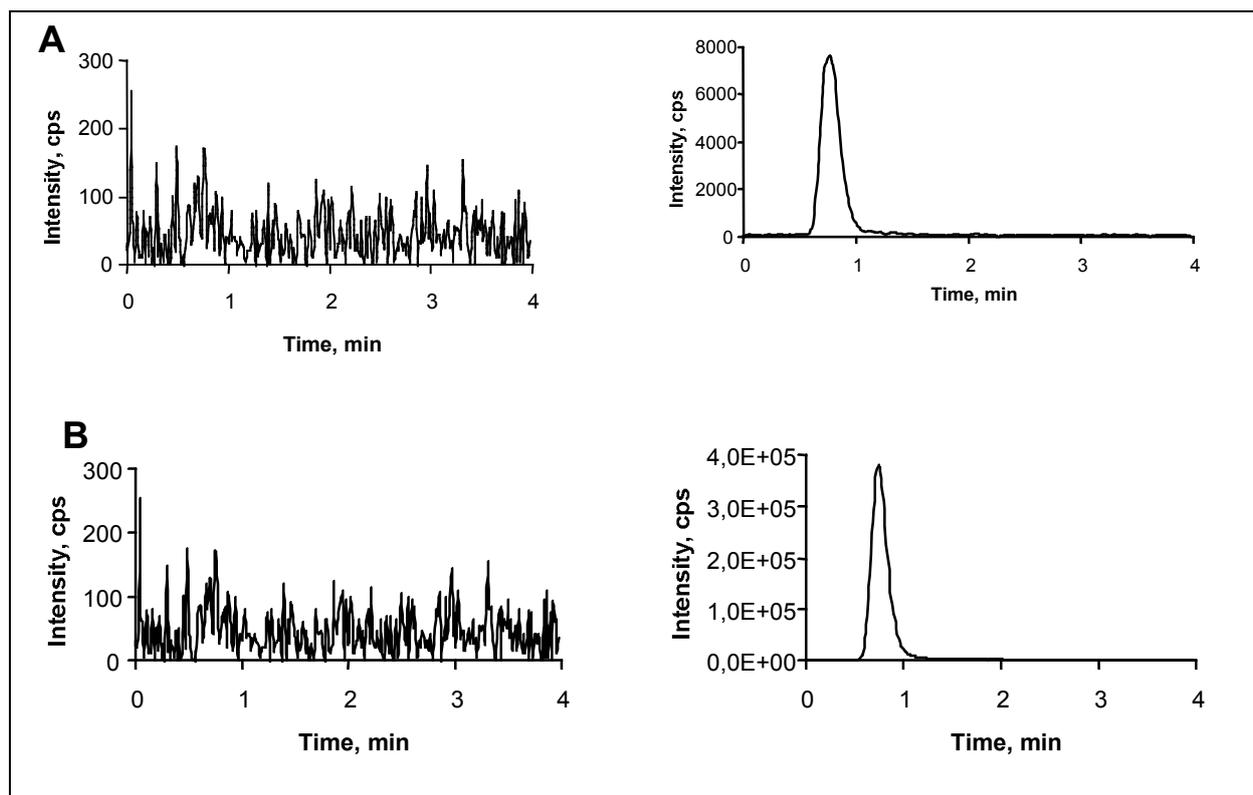
Nominelle Konzentration (ng/ml)	Mittlere gemessene Konzentration (ng/ml) $\pm$ größte Abweichung (n=3)	Fehler (%)	Genauigkeit (%)
10	11,0 $\pm$ 1	9	109,7
25	24,2 $\pm$ 3	14	97,2
50	41,9 $\pm$ 0,2	0,5	83,7
100	90,4 $\pm$ 3	4	90,4
250	277,0 $\pm$ 2	1	110,7
500	507,0 $\pm$ 20	4	101,1
1000	593 $\pm$ 497	98	47,6

**Tab. 4-6:** Assay Präzision und Genauigkeit für die Bestimmung von Celecoxib in Rattenplasma mit der Methode CLX-1.

### 4.3.2. Bestimmung aus Humanplasma (Methode CLX-2)

#### 4.3.2.1. Spezifität der Chromatographie

Leerplasmaproben zeigen keinen Einfluss von endogenen Substanzen. Eine gegenseitige Beeinflussung der Massenspuren von Celecoxib und IS konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4-10).



**Abb. 4-11:** Repräsentative Chromatogramme der Extrakte von Leerplasma und einer mit 2 ng/ml Celecoxib und 50 ng/ml IS versetzten Humanplasmaprobe. Die Chromatogramme wurden im negativen Modus mit den Massenspuren  $m/z$  380→316 für Celecoxib (A) und  $m/z$  380→316 für IS (B) aufgenommen.

#### 4.3.2.2. Matrixeffekte

Sechs Leerplasmaproben von jeweils sechs verschiedenen Individuen wurden extrahiert. Das Eluat der SPE wurde mit 200  $\mu$ l Acetonitril mit 10 ng/ml Celecoxib und 50 ng/ml IS versetzt, zur Trockene eingengt und in 200  $\mu$ l Eluent wieder aufgenommen. Die Peakflächen der Extrakte wurden mit denen der Lösungsmittelstandards verglichen.

Für Celecoxib und IS konnten keine signifikanten Matrixeffekte beobachtet werden.

#### 4.3.2.3. Extraktionswiederfindung

Die Wiederfindung von Celecoxib aus Plasma nach Festphasenextraktion wurde für drei Konzentrationen ermittelt, die die Eichgerade repräsentieren (1, 20, 100 ng/ml). Für den internen Standard wurde die Wiederfindung für 50 ng/ml bestimmt. Die Vergleichstandards wurden wie die Proben verdampft und im Eluenten wieder aufgenommen, um eventuelle Aufarbeitungsverluste zu kompensieren. Die Wiederfindungsrate betrug für Celecoxib 90% und für IS 85%.

#### 4.3.2.4. Präzision und Genauigkeit des Assays

Um die Validität zu bestimmen wurden insgesamt sechs Eichgeraden mit Plasma von sechs verschiedenen Spendern mit jeweils 10 Konzentrationen hergestellt. Die Eichgeraden wurden mit einem Faktor von  $1/x$  gewichtet. Das Peakflächenverhältnis von Celecoxib und IS wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Es ergab sich ein linearer Bereich von 0,25 – 250,0 ng/ml.

Die Bestimmungsgrenze wurde definiert als die niedrigste Konzentration mit einer relativen Standardabweichung zwischen 85 –115%. Als Bestimmungsgrenze ergaben sich 0,25 ng/ml.

Die *Intra-day* Variabilität wurde anhand drei repräsentativer Konzentrationen (1, 25, 100 ng/ml) mit jeweils sechs Proben bestimmt. Es ergab sich eine *Intra-day* Variabilität von 10, 3 und 4 % für die jeweiligen Konzentrationen.

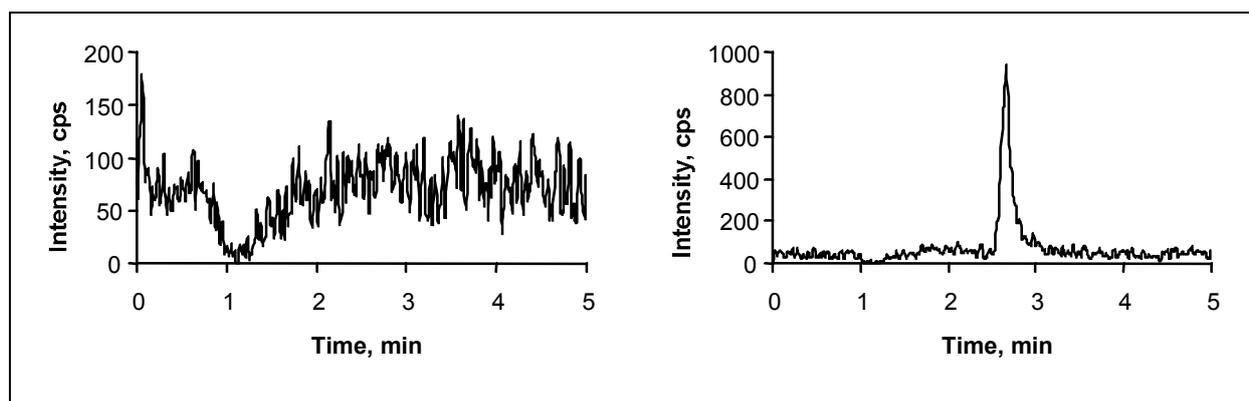
nominelle Konzentration (ng/ml)	Mittlere gemessene Konzentration (ng/ml) $\pm$ SD (n=6)	Variationskoeffizient (%)	Genauigkeit (%)
0.25	0.3 $\pm$ 0,02	6.1%	110.
0.5	0.5 $\pm$ 0.03	2.8%	101.2
1	0.9 $\pm$ 0.1	1.1%	93.4
2.5	2.4 $\pm$ 0.1	2.2%	94.7
5	4.9 $\pm$ 0.1	2.3%	97.1
10	10.1 $\pm$ 0.3	3.4%	101.1
25	24.9 $\pm$ 0.8	3.1%	99.7
50	49.3 $\pm$ 4.5	9.1%	98.6
100	102.0 $\pm$ 1.6	1.9%	102.0
250	248.8 $\pm$ 4.0	1.6%	99.4

**Tab. 4-7:** Assay Präzision und Genauigkeit für die Bestimmung von Celecoxib in Humanplasma mit der Methode CLX-2.

### 4.3.3. Bestimmung aus Microdialysaten (CLX-Microdialysat)

#### 4.3.3.1. Spezifität der Chromatographie

In den Chromatogrammen von Leerdialysaten konnte kein Einfluss endogener Substanzen auf die Massenspur von Celecoxib festgestellt werden. Der Salzanteil der Dialysate bewirkte eine Signalsuppression der Basislinie, die allerdings den Substratpeak nicht störte.



**Abb. 4-12:** Repräsentative Chromatogramme von reinem ACSF und mit 1 ng/ml Celecoxib versetzten ACSF für den Massenübergang  $m/z$  380→316 für Celecoxib.

#### 4.3.3.2. Matrixeffekte

Sechs Proben mit ACSF wurden mit je 10 ng/ml Celecoxib versetzt. Die Peakflächen der Proben wurden mit denen entsprechender Standards im Eluent verglichen. Aufgrund des Salzanteils wurde eine Signalsuppression von Faktor 15 festgestellt.

#### 4.3.3.3. Präzision und Genauigkeit des Assays

Insgesamt wurden sechs Eichgeraden mit ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) mit je 9 Konzentrationen hergestellt, um die Validität zu bestimmen (Tab. 4-8). Die Eichgeraden wurden mit einem Faktor von  $1/x$  gewichtet. Die Peakfläche von Celecoxib wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Es resultierte ein linearer Bereich von 0,5 – 20,0 ng/ml. Die Bestimmungsgrenze wurde definiert als die niedrigste Konzentration mit einer relativen Standardabweichung zwischen 85 –115%. Als Bestimmungsgrenze ergab sich für Dialysate eine Konzentration von 0,5 ng/ml. Die Bestimmung der *Intra-day* Variabilität wurde anhand von sechs Proben mit 5 ng/ml Celecoxib in ACSF durchgeführt und auf 10% bestimmt.

Nominelle Konzentration (ng/ml)	Mittlere gemessene Konzentration (ng/ml) $\pm$ SD (n=6)	Variationskoeffizient (%)	Genauigkeit (%)
0.5	0.5 $\pm$ 0.04	6.5%	106.3
0.8	0.8 $\pm$ 0.001	0.4%	98.6
1.0	0.9 $\pm$ 0.09	10.0%	94.9
2.0	1.6 $\pm$ 0.5	1.5%	96.0
5.0	4.6 $\pm$ 1.4	8.7%	101.4
8.0	7.9 $\pm$ 0.4	5.2%	98.4
10.0	9.9 $\pm$ 0.7	6.7%	98.7
15.0	14.9 $\pm$ 0.8	5.0%	99.1
20.0	20.3 $\pm$ 0.9	4.4%	101.2

**Tab. 4-8:** Assay Präzision und Genauigkeit Für die Bestimmung von Celecoxib in ACSF (Rückenmarksdialysate der Ratte)

## 4.4. Diskussion zur Entwicklung und Validierung der analytischen Methoden für die Bestimmung von Celecoxib

### 4.4.1. Massenspektrometrie

Im negativen Ionenmodus ist die detektierte Masse von Celecoxib um eine Masseneinheit kleiner als die Molekülmasse ( $M_r$  381,37), was bedeutet, dass ein Proton abstrahiert wurde. Das entstehende Anion kann dabei über den Stickstoff der Sulfonamidgruppe stabilisiert werden. Analog kann auch ein Kation, das durch die Addition eines Protons entsteht, stabilisiert werden. Daher sind beide Polaritäten für die Ionisierung von Celecoxib geeignet.

Wie zu erwarten, unterscheiden sich die Kollisionsenergien von Celecoxib und IS für die entsprechenden Fragmente fast nicht (Tab. 4-9), was bedeutet, dass die Fragmentierungen in beiden Molekülen gleich verlaufen. Das wiederum bedeutet, dass die Methylgruppe an der *para*-Position zum Pyrrazolring an der analytisch genutzten Fragmentierung nicht beteiligt ist, da der interne Standard keine solche Methylgruppe besitzt.

Beide Substanzen bilden das Fragment  $CF_3^+$  mit der Masse  $m/z$  69. Die Fragmente  $m/z$  316, 302 entstehen durch die Freisetzung von  $SO_2$ . Die Fragmente  $m/z$  276, 262 entstehen durch den Verlust einer Masse  $m/z$  104, die der Summenformel  $C_2H_2NSO_2$  entspricht. Das resultierende Fragment könnte die in Abb. 4-13 dargestellte Struktur besitzen. Somit würde die Gruppe  $C_2-SO_2-NH_2$  aus dem Sulfonylphenylring des Precursor Ions abgespalten werden. Eine Folgefragmentierung wie die Abspaltung von  $C_2H_2N$  aus dem Fragment Ion  $m/z$  316 ist bei der verwendeten Form der linearen Stoßzelle unwahrscheinlich.

Ungewöhnlich an dieser Reaktion ist, dass bei der vergleichbar niedrigen Kollisionsenergie der Phenylring aufgebrochen wird. Entweder ist die Abgangsgruppe energetisch sehr günstig, und/oder das entstehende Anion ist stabil. Gleiches gilt für die Abspaltung von  $SO_2$ .

Vermutlich ergeben sich bei einer positiven Ionisierung von Celecoxib keine Fragmentierungen, da entsprechend günstige energetische Verhältnisse nicht erreicht werden.

Massenübergang $m/z$	Kollisionsenergie $eV$
380,0→316,0	-30
365,8→302,2	-32
380,0→276,0	-38
365,8→261,8	-38

**Tab. 4-9:** Kollisionsenergien der Massenübergänge von Celecoxib ( $m/z$  380,0) und IS ( $m/z$  365,8)

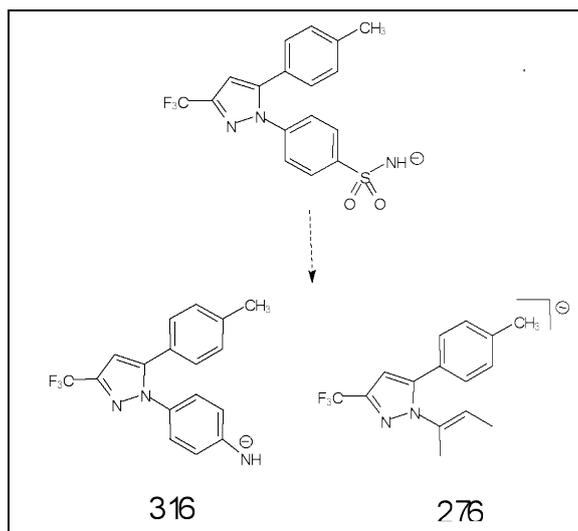


Abb.4-13: Mögliche Strukturen der Fragmente von Celecoxib.

#### 4.4.2. Chromatographie

Der Unterschied der Empfindlichkeiten zwischen Methode *CLX-1* und Methode *CLX-2* beruht hauptsächlich auf den veränderten chromatographischen Verhältnissen. Methanol als organischer Bestandteil des Laufmittels bewirkte einen breiteren Peak als Acetonitril. Mit Acetonitril verkürzte sich die Retentionszeit für Celecoxib, der Peak wurde schärfer und damit das Signal/Rausch-Verhältnis besser (Abb. 4-14). Die Peakbreite auf halber Peakhöhe  $w_{1/2}$  verringerte sich von 0,32 min auf 0,15 min.

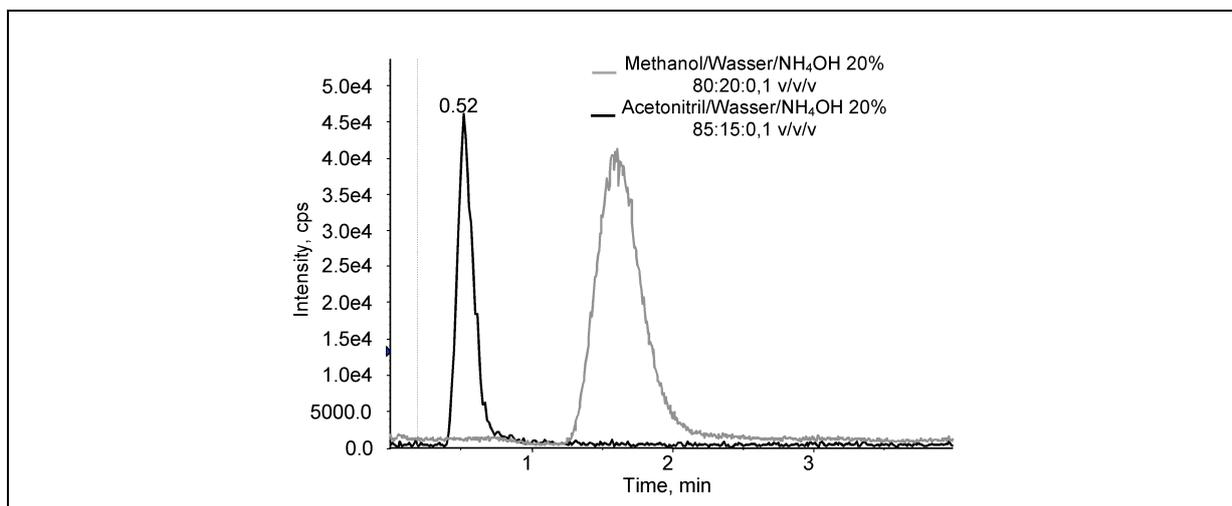
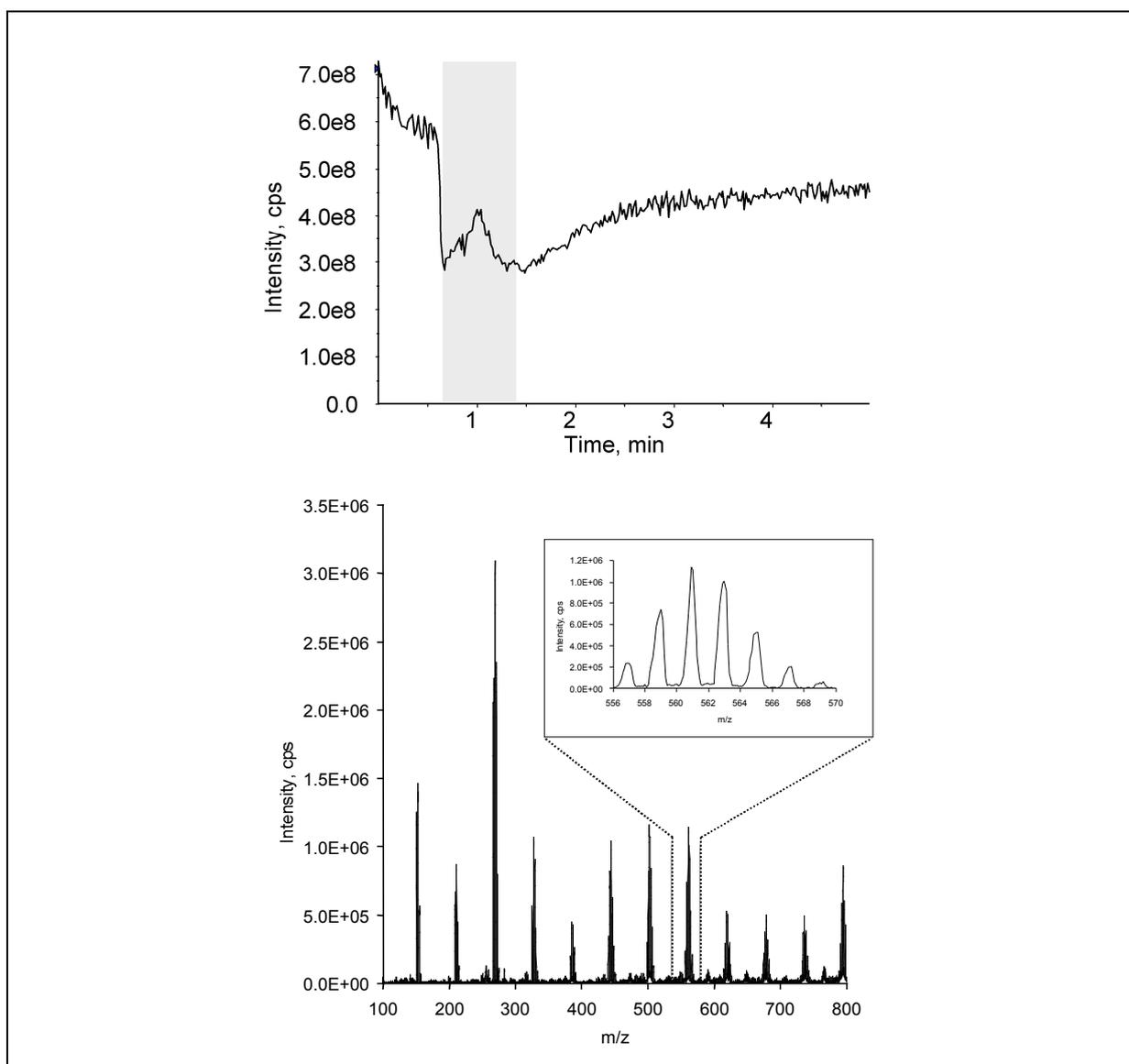


Abb. 4-14: Vergleich der Chromatographie von Methode *CLX-1* und Methode *CLX-2*. Methode *CLX-1*: Methanol/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 80:20:0,1 v/v/v; Methode *CLX-2*: Acetonitril/Wasser/NH<sub>4</sub>OH 20% 85:15:0,1 v/v/v. Flussrate in beiden Methoden :0,2 ml/min.



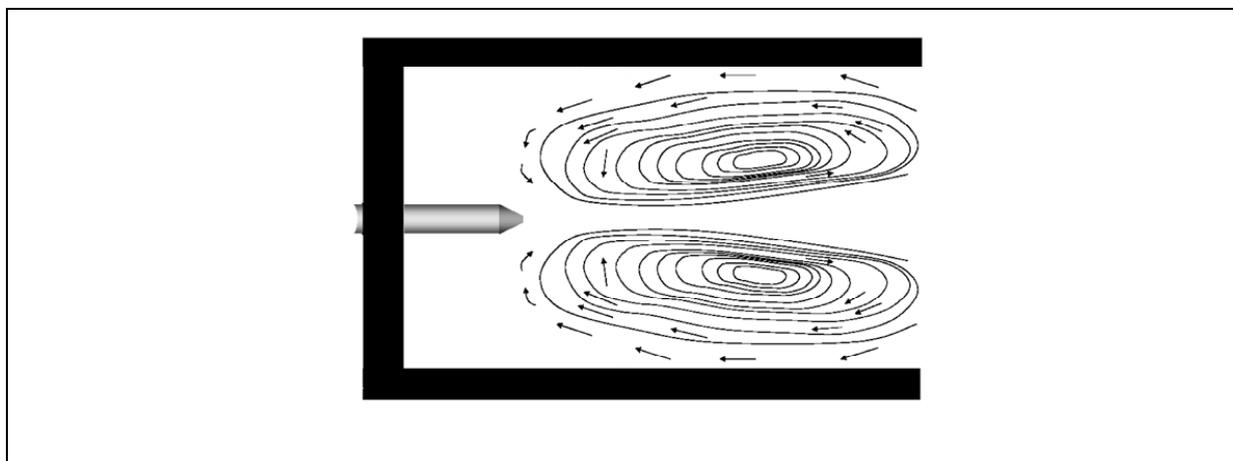
**Abb. 4-15:** Total Ionenstrom für den Massenbereich  $m/z$  100-800 für eine Dialysatprobe mit ACSF. Full Scan Spektrum des grau markierten Bereiches.

Die Perfusionslösung für Microdialysate besteht aus zu Körperflüssigkeiten isotonischen Salzlösungen. In den Versuchen mit Ratten wurde künstlicher Liquor (ACSF) mit einer Salzkonzentration von 128,6 mM verwendet.

Die präformierten Ionen der Salze werden im Elektrospray in Form von Clustern bevorzugt in die Gasphase überführt [84, 85]. Diese Cluster können entweder nur aus Salzen bestehen oder auch ein Analytmolekül enthalten. Das Analytmolekül verbleibt dabei im Cluster und kann nicht mehr nachgewiesen werden. Jedenfalls besteht für das Analytmolekül kaum noch eine Wahrscheinlichkeit, als Ion in die Gasphase überzutreten und kann daher nicht mehr massenspektrometrisch erfasst werden.

Nimmt man die Ionenspur vom Celecoxib auf, so sinkt die Basislinie fast vollständig auf null ab und erholt sich dann langsam wieder. Würde der Analyt in diesen Bereich koeluiieren, könnte er nicht mehr nachgewiesen werden. Im „total ion current“ (Full Scan  $m/z$  100-800) wird für diesen Bereich ebenfalls ein Abfall des Ionenstroms gemessen. Im Fullscan-Spektrum sind die gebildeten NaCl-Cluster zu erkennen.

Es dauert einige Zeit, bis die Basislinie die Ausgangsintensität wieder erreicht hat, obwohl der Salzanteil schon von der Säule eluiert ist. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels entsteht ein feiner Nebel aus Salzkristallen, die in der Quelle durch die lokalen Strömungsverhältnisse verteilt werden und wieder in das Spray eintreten können, sich dann in den Tröpfchen lösen, das Ionensignal beeinflussen und so zu einer „Peak“-Verbreiterung des Salzpeaks beitragen (Abb. 4-16).



**Abb. 4-16:** Vereinfachte Darstellung der Verwirbelungen in der Elektrosprayquelle, die zum chemischen Hintergrundrauschen beitragen.

### 4.4.2.1. Stabilität der Säulen

Zu dem Laufmittel wurde  $\text{NH}_4\text{OH}$  zugegeben, um die negative Ionisierung des Analyten zu unterstützen, wodurch pH-Wert über 9 stieg. Bei diesem pH-Wert kann das Säulenmaterial hydrolysiert werden, was zum Bluten der Säule führt und die Stabilität des Messsystems massiv verringern kann. Die Hydrolyse wirkt sich außerdem auf die Chromatographie aus, indem die Peaks breiter und die Trennleistung schlechter wird. Der Analytpeak lässt sich dann nicht mehr sauber vom Salzanteil trennen

Die Säulenstabilität wurde getestet indem eine Probe von 10 ng/ml Celecoxib in Laufmittel 240mal in das System injiziert wurde. Da bei der Methode für Dialysate ein Verlust an Säulenstabilität wegen der ausführlichen Chromatographie am ehesten auffallen würde, wurde eine neue Säule mit 70 x 2mm und Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$  20% 65:35:0,1 v/v/v als

Laufmittel verwendet. Aus den Chromatogrammen wurde die Kapazität  $k'$  und die Anzahl der theoretischen Böden der Säule  $N$  bestimmt. Die Werte wurden gegen die Anzahl der Injektionen aufgetragen (Abb. 4-17).

Die Parameter  $k'$  und  $N$  änderten sich während der Messung nicht, was bedeutet, dass die Säule trotz des hohen pH-Werts des Laufmittels nicht so stark angegriffen wird, dass die Chromatographie darunter leidet.

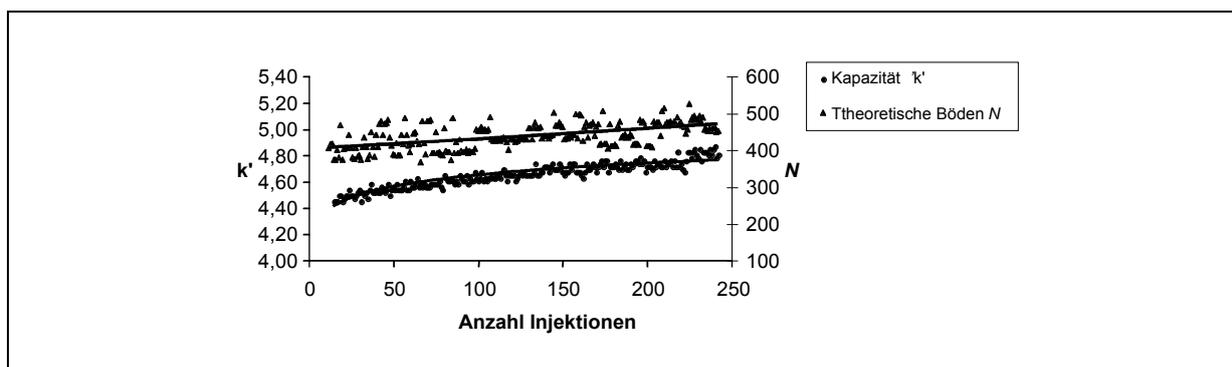


Abb. 4-17: Säulenstabilitätstest.

### 4.4.3. Extraktionsverfahren

#### Ultrafiltration und Proteinfällung

Die Ultrafiltration ergab für Plasmaproben und wässrige Standards keine Wiederfindung. Zwar hat Celecoxib eine sehr hohe Proteinbindung von 97%, doch spielt das in wässrigen Standards keine Rolle. Daher ist anzunehmen, dass Celecoxib vermutlich sehr gut an das Material des Ultrafilters adsorbiert.

Die Wiederfindungen für die Proteinfällung war auffällig niedrig. Dafür können ebenfalls die Adsorptionseigenschaften von Celecoxib verantwortlich sein. Die ausgefällten und denaturierten Proteine stellen vermutlich so gutes Adsorbens für Celecoxib dar, das nur ein geringer Teil der Substanz im Überstand verbleibt.

Durch die flüssig-flüssig Extraktion lässt sich nur ein Teil der Substanz in die organische Phase überführen. Eine mehrfache Extraktion kann die Wiederfindung zwar deutlich verbessern, stellt aber einen deutlich höheren Arbeitsaufwand dar.

#### Festphasenextraktionen

Celecoxib kann mittels Festphasenextraktion von den Plasmaproteinen getrennt werden. Die Adsorption von Celecoxib an das  $C_{18}$  Material scheint energetisch gegenüber der Adsorption an die Proteine bevorzugt zu sein. Allerdings ist eine zweifache Elution notwendig, um

Celecoxib quantitativ wieder vom Sorbens zu waschen. Im Vergleich der verschiedenen Methoden stellte die Festphasenextraktion die beste Variante dar.

Solange kein verlässlicher interner Standard vorhanden war, wurde für die ersten Untersuchungen auf die Verwendung der Festphasenextraktion verzichtet, da diese erheblichen Schwankungen unterliegen kann, je nachdem von welcher Qualität das verwendete Sorbens ist und wie gut die Cartridges gepackt worden waren [110]. Da die Cartridges häufig unterschiedlich gepackt sind, können die Durchlaufgeschwindigkeiten der Lösungen und damit das Extraktionsverhalten erheblich variieren. Mit der Verwendung eines geeigneten internen Standards können solche Schwankungen jedoch ausgeglichen werden. Mit den *Chromabond* Cartridges wurde ein Material gefunden, das eine relativ konstante Qualität der verschiedenen Produktchargen aufwies.

### **Probenvolumen**

Bei pharmakokinetischen und -dynamischen Untersuchung können Humanplasmaproben im Millilitermaßstab gewonnen werden. Aus Ratten lassen sich jedoch nur geringe Probenvolumina entnehmen. Um für die Aufarbeitung und Messung genügend Plasma zu erhalten, kann für jeden Zeitpunkt Blut von einem anderen Tier genommen werden, womit man zwar die Möglichkeit hätte, ausreichend Probenmaterial zu gewinnen, aber verschiedene Tiere für eine Kinetik verwenden müsste. Oder es gelingt die komplette Pharmakokinetik aus einem Tier zu bestimmen, indem eine analytische Methode entwickelt wird, für die 100 µl Plasma ausreichend sind.

Die Wiederfindungen aus Plasma verschiedener Spezies unterscheiden sich meistens nur gering. Daher wurde auf die Entwicklung einer Extraktionsmethode Wert gelegt, die für Proben verschiedener Spezies genutzt werden kann. Die Methoden wurden daher auf ein Plasmavolumen von 100 µl ausgelegt. Bei einem benötigten Einspritzvolumen von 20-30 µl ist diese Probenmenge auch für Nachmessungen ausreichend.

### **4.4.4. Matrixeffekte**

Erstaunlicherweise erweist sich die Ionisierung von Celecoxib und dem internen Standard unabhängig von Humanplasma-Matrix, trotz der nahezu nicht vorhandenen chromatographischen Trennung. Vielleicht haben die Plasmabestandteile kaum Einfluss auf die Ionisierung von Celecoxib, oder durch die Extraktion wird soviel Matrix abgetrennt, das in der Probe verbleibende Matrixbestandteile nicht mehr stören [111].

Für Microdialysate stellt sich die Situation anders dar. Trotz einer ausreichenden chromatographischen Trennung ist noch eine massive Signalsuppression durch die im ACSF enthaltenen Salze festzustellen. Der Grund hierfür liegt in der oben beschriebenen Verwirbelung der Salzkristallite in der Ionenquelle. Das bedeutet allerdings, dass sich das Ausmaß der Signalsuppression im Verlauf einer Messreihe ändert. Zu Beginn der Messung wird die Signalsuppression für die ersten Proben noch nicht so massiv sein, da nicht soviel Salz vorhanden ist, das in der Quelle verwirbelt werden kann. Über die *exhaust pump* wird die Quelle ständig von Aerosolen entlastet, so dass sich nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht zwischen frisch eingebrachtem und entferntem Aerosol einstellt und auf diese Weise das Ausmaß der Signalsuppression stabilisiert wird. Tatsächlich lässt sich dieser Effekt in der Praxis auch beobachten.

Wird eine sehr große Probenzahl gemessen, sinkt im Laufe der Messung die Intensität der Signale merklich ab. Ein Teil des Aerosols schlägt sich an den Innenseiten der Quelle nieder. Wenn die Oberfläche sauber ist, bleibt der Niederschlag einigermaßen haften. Nach längerer Zeit wird die Niederschlagsschicht tiefer und es können Aerosolpartikel durch die in der Quelle bestehenden Luftströmungen wieder gelöst werden. Dadurch trägt der Niederschlag nach einiger Zeit additiv zur Signalsuppression bei. Den gleichen Effekt kann man in geringerem Ausmaß auch für Plasmaproben bemerken. Daher ist es für die LC/MS/MS Messung immanent wichtig, eine ausreichende Anzahl an Qualitätskontrollen zwischen den Proben zu verteilen.

#### **4.4.5. Validierung**

##### **4.4.5.1. Methode CLX-1**

Mit der Methode CLX-1 werden die Massenspuren von Störpeaks beeinflusst, mit der Methode CLX-2 werden aber keine derartigen Störpeaks beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den Störpeaks um Verschleppungen vom Analyten im System handelt. Der Eluent der Methode CLX-1, der als Spülmittel für die HPLC verwendet wird, scheint Reste vorheriger Proben nicht ausreichend aus dem System spülen zu können, im Gegensatz zum Eluenten der Methode CLX-2. Daher handelt es sich vermutlich in der Massenspur  $m/z$  380→316 für IS im Rattenplasma um ein Artefakt.

Die Methode CLX-1 ist auffällig unsensitiver als Methode CLX-2. Bei Humanplasmaproben schwankt der Wert für die 10 ng/ml so erheblich, so dass diese Konzentration für Humanplasmaproben in dieser Zusammenstellung nicht als valide gelten kann. Für

Rattenplasmaproben wurde kein valider Wert für 1000 ng/ml erreicht. Um dieses Ergebnis diskutieren zu können, hätten die Matrixeffekte ermittelt werden müssen.

#### **4.4.5.2. Methode CLX-2**

Die Massenspektren von Celecoxib und dem internen Standard sind voneinander unabhängig und werden nicht durch endogene Substanzen gestört. Die Signalsuppression durch Plasmamatrixbestandteile ist nicht signifikant. Die Schwankungen des Signals der verschiedenen Proben sind <10%. Die Festphasenextraktion mit C<sub>18</sub>-Cartridges ist reproduzierbar und ergibt eine gute Wiederfindung. Die Methode ist für den Konzentrationsbereich 0,2 – 250 ng/ml valide. Die Schwankungen der verschiedenen Parameter liegen innerhalb der Grenzen, wie sie die FDA für bioanalytische Methoden vorgibt [108].

#### **4.4.5.3. Methode CLX-Microdialysat**

Der Peak vom Celecoxib wird nicht durch Substanzen im Microdialysat gestört. Die Signalsuppression ist trotz chromatographischer Trennung erheblich. Dennoch ist ein relativ sensitiver Nachweis möglich, da auch das Rauschen mit unterdrückt wird und das Signal/Rausch-Verhältnis dem der Plasmaproben vergleichbar bleibt. Diese Methode ist für den Konzentrationsbereich 0,5 – 20 ng/ml valide. Die Schwankungen der verschiedenen Parameter liegen auch hier innerhalb der Grenzen, wie sie die FDA für bioanalytische Methoden vorgibt. [108].

Die Proben für die Validierung wurden aus reinem ACSF hergestellt. Die Herstellung von Leerdialysaten für die Validierung ist sehr aufwendig. Eine höhere Anzahl von Versuchstieren müsste alleine für die Validierung einer Methode verwendet werden. Tatsächlich sind in Gewebedialysaten endogene Substanzen enthalten die kleiner sind als der für die Membran angegebene *cut-off* für das Membranmaterial von 10 kDa. Weil aber anzunehmen ist, dass die Konzentrationen solcher Bestandteile im Verhältnis zur Salzkonzentration gering sind, kann die Verwendung des ACSF als Probenmatrix für die Validierung als geeignet betrachtet werden. Vergleiche mit Leerdialysaten, die im Laufe verschiedener Experimente angefallen sind haben diese Annahme bestätigt.

## 5. Sensitive Bestimmung von SC-560 mittels LC/MS/MS

### 5.1. Methodenentwicklung

Der selektive COX-1 Hemmer SC-560 (5-[4-chlorphenyl]-1-[4-methoxyphenyl]-3-trifluoromethylpyrazol) hat die Molekülmasse  $M_r$  352.74 und gleicht bis auf zwei funktionelle Gruppen dem Celecoxib. SC-560 besitzt anstatt einer Sulfonamid-Gruppe eine Methyletherfunktion. Der andere Phenylring besitzt in der *para* Stellung statt der Methylgruppe ein Chloratom. Die Methode wurde für den Nachweis von SC-560 in Microdialysaten entwickelt.

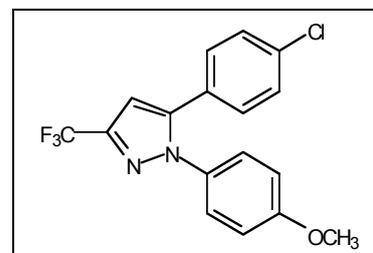


Abb. 5-1: Struktur von SC-560

#### 5.1.1. Tuning des Massenspektrometers

##### 5.1.1.1. Detektion des Moleküliions

Im positiven Ionenmodus wurde das protonierte Moleküliion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  353,0 detektiert. Aufgrund des Chloratoms zeigt das Moleküliion ein Isotopenmuster, das durch die Chlorisotope (relative Häufigkeit:  $^{35}\text{Cl}$  75,55%;  $^{37}\text{Cl}$  24,23%) bestimmt wird ( $m/z$  354: 1  $\times$   $^{13}\text{C}$ ;  $m/z$  355: 2  $\times$   $^{13}\text{C}$  oder 1  $\times$   $^{37}\text{Cl}$ ;  $m/z$  356: 1  $\times$   $^{13}\text{C}$ , 1  $\times$   $^{37}\text{Cl}$ ;  $m/z$  357: 2  $\times$   $^{13}\text{C}$ , 1  $\times$   $^{37}\text{Cl}$  oder 2  $\times$   $^{37}\text{Cl}$ ), mit den der Auftrittswahrscheinlichkeit entsprechenden Intensitäten (1:0,01:0,32:4 $\cdot$ 10 $^{-5}$ :0,08).

Analytisch nutzbare Fragmente waren  $m/z$  258,2, 137,1, 132,2, 104,2 und 77,0.

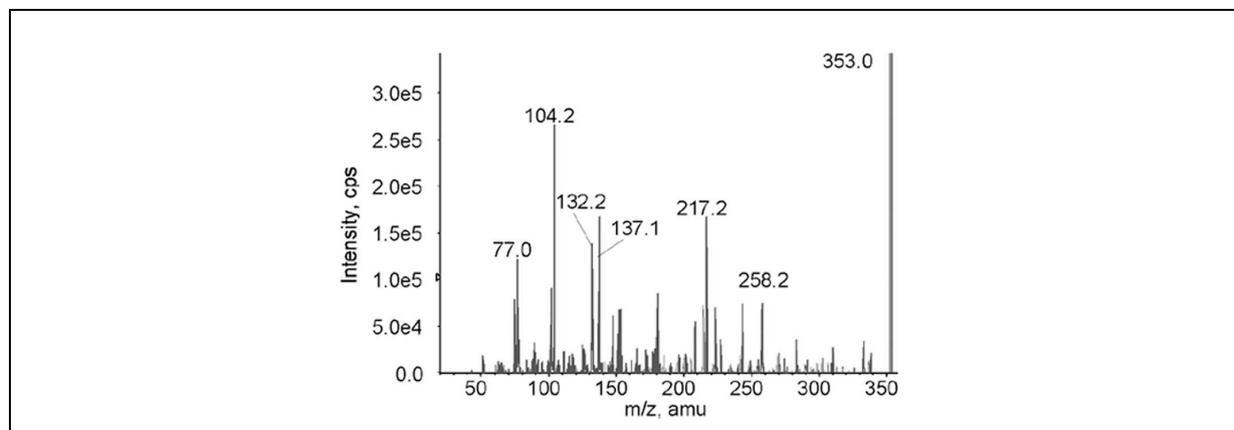


Abb. 5-2: Fragmentspektrum von SC-560 im positiven Ionen Modus.

### 5.1.1.2. Die MRM Methode

Um die Einstellungen der jeweiligen Substanzen zu optimieren wurde das automatische Tuning der Analyst Software genutzt, DP und FP wurden manuell nachoptimiert.

In Tab. 5-1 sind die als Quantifier und Qualifier genutzten Fragmente und die entsprechenden Kollisionsenergien zusammengestellt. Die Intensitäten der Übergänge sind vergleichbar groß.

Fragment $m/z$	Kollisionsenergie $eV$
104,2 (Quantifier)	77
258,0 (Qualifier)	33
132,2 (Qualifier)	57
137,1 (Qualifier)	30

**Tab. 5-1:** Für die MRM Methode genutzte Fragmente von SC-560

### 5.1.1.3. Optimierung des Laufmittels auf Empfindlichkeit

Die positive Ionisierung des Substrates kann durch Protonen liefernde Modifier unterstützt werden, und so zu einer besseren Sensitivität der Methode beitragen. Mittels FIA wurden die Laufmittel mit folgenden Zusammensetzungen miteinander verglichen: Acetonitril/Wasser 80:20 v/v, Acetonitril/2mM Ammoniumacetat/Ameisensäure 80:20:0,1 v/v/v und Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 80:20 v/v. Das Laufmittel mit Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 80:20 v/v zeigte ein um den Faktor 6 intensiveres Signal für den Übergang  $m/z$  353, 0  $\square$  104,2 als die anderen beiden Laufmittel.

### 5.1.1.4. Chromatographie von SC-560 Microdialysaten

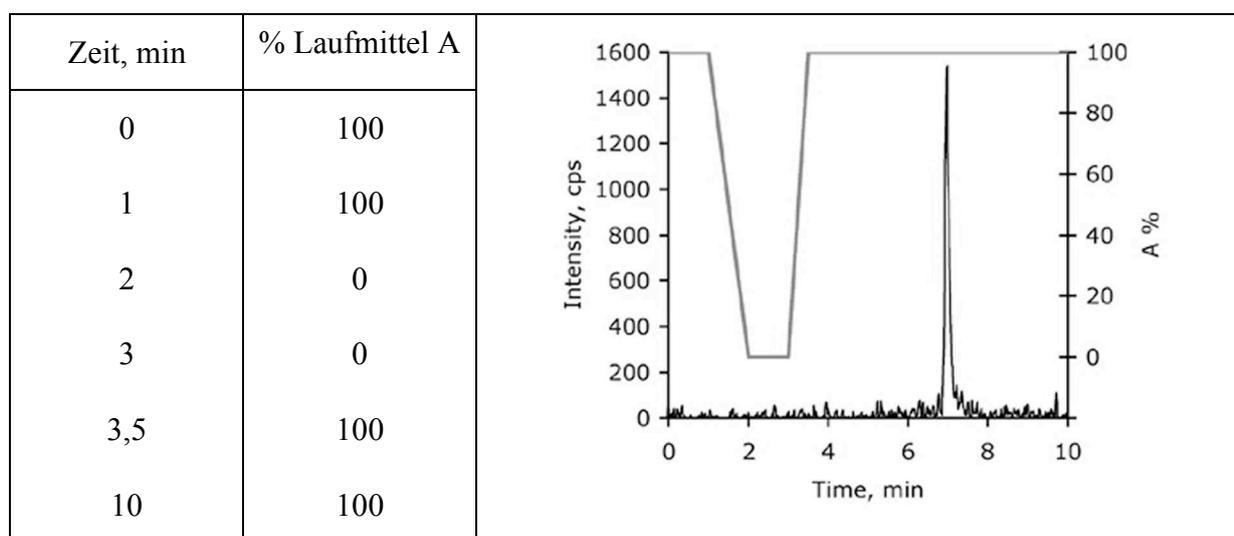
Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde eine *narrow-bore* Säule mit 60 mm Länge und 1 mm Durchmesser verwendet, die mit Reprosil-Pur ODS-3 Material ( $C_{18}$ ) gepackt war. SC-560 retinierte auf  $C_{18}$ -Material so gut, dass trotz des kleinen Durchmessers der Säule mit einem Fluss von 0,2 ml/min gearbeitet werden konnte. Da es sich beim Reprosil-Pur um relativ festes Material handelt, blieb der Rückdruck moderat.

Um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen, musste der Substanzpeak ausreichend vom Salzpeak getrennt werden. Wenn ein Laufmittel mit hohem organischen Anteil (Acetonitril 80 Vol.%) verwendet wurde, konnte mit isokratischer Elution der Substanzpeak nicht ausreichend vom Salzpeak getrennt werden, da der Salzpeak sehr weit tailte. Wurde der

organische Anteil auf 50 Vol.% reduziert, eluierte SC-560 erst nach 16 min in einem sehr breiten Peak ( $w_{1/2} > 1 \text{ min}$ ).

Mit Gradientenelution konnte eine ausreichende Trennung zwischen Salz- und Substanzpeak erreicht werden ( $R_s = 2$ ). Der Substanzpeak konnte schneller eluiert werden (7 min,  $k' = 16,5$ ) und war relativ schmal ( $w_{1/2} = 0,15 \text{ min}$ ). Damit wurde eine ausreichende Sensitivität erreicht.

Laufmittel A setzte sich aus Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 30:70 v/v und Laufmittel B aus Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 85:15 v/v zusammen. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Das Gradienten-Programm ist in Abb. 5-3 zusammen mit dem resultierenden Chromatogramm dargestellt.



**Abb. 5-3:** Gradientenprogramm und resultierendes Chromatogramm für den Nachweis von SC-560 in Microdialysaten

#### 5.1.1.5. Probenvorbereitung

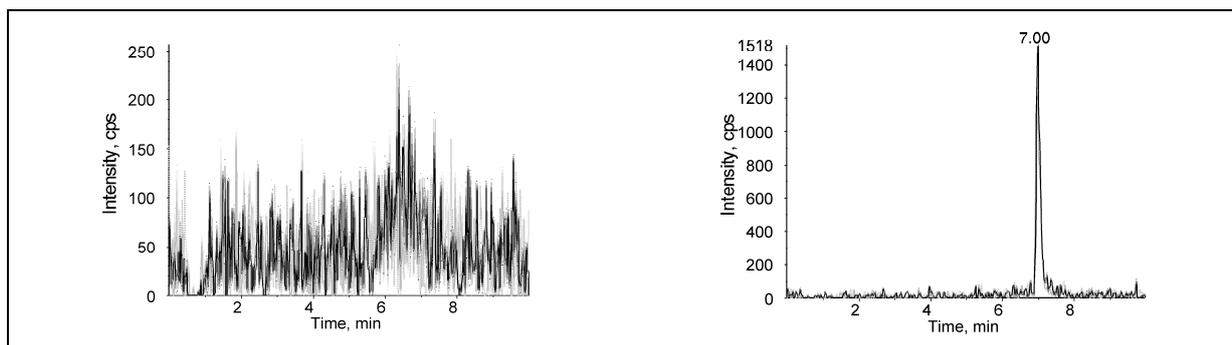
Der Nachweis von SC-560 in Microdialysaten erforderte keine Extraktion der Dialysate und konnte direkt aus den Proben erfolgen. In Vorversuchen wurde entdeckt, dass SC-560 auch bei sehr niedrigen Konzentrationen (<50 ng/ml) aus wässrigen Lösungen ausfiel und sich auf der Glasoberfläche der Probengläschen niederschlug. Wurde die Lösung mit Acetonitril 1:1 verdünnt, ging SC-560 wieder in Lösung.

Mit einer Pipette wurde das im Vial enthaltene Volumen an Dialysat möglichst genau abgeschätzt und die entsprechende Menge Acetonitril zugegeben.

## 5.1.2. Validierung der Methode zur Bestimmung von SC-560 in Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode SC-560 Microdialysat)

### 5.1.2.1. Spezifität

Leerdialysate zeigen keinen Einfluss von endogenen Substanzen auf die Massenspuren von SC-560. Einzig der Salzanteil der Dialysate bewirkt eine Signalsuppression. Aufgrund der Elution mit einem Gradienten ist bei der Retentionszeit von SC-560 ein leichter Anstieg der Basislinie zu erkennen.



**Abb. 5-4:** Repräsentative Chromatogramme von Leerdialysat und einer Probe mit 2 ng/ml SC-560.

### 5.1.2.2. Matrixeffekte

Sechs Proben mit ACSF wurden mit 50 ng/ml SC-560 versetzt. Die AUCs der Proben wurden mit denen von entsprechenden Standards in Eluent verglichen. Aufgrund des Salzanteils im Dialysat wurde eine Signalsuppression mit Faktor 11 festgestellt.

### 5.1.2.3. Präzision und Genauigkeit des Assays

Insgesamt wurden sechs Eichgeraden mit Acetonitril/ACSF 50:50 v/v mit neun Konzentrationen hergestellt, um die Validität zu bestimmen (Tab.5-2).

Die Bestimmungsgrenze wurde definiert als die niedrigste Konzentration mit einer relativen Standardabweichung zwischen 85 –115%. Als Bestimmungsgrenze ergaben sich für Dialysate 0,5 ng/ml.

Nominelle Konzentration (ng/ml)	Mittlere gemessene Konzentration (ng/ml) $\pm$ SD (n=6)	Variationskoeffizient (%)	Genauigkeit (%)
0.5	0.5 $\pm$ 0.04	6.5%	106.3
0.8	0.8 $\pm$ 0.001	0.4%	98.6
1.0	0.9 $\pm$ 0.09	10.0%	94.9
2.0	1.6 $\pm$ 0.5	1.5%	96.0
5.0	4.6 $\pm$ 1.4	8.7%	101.4
8.0	7.9 $\pm$ 0.4	5.2%	98.4
10.0	9.9 $\pm$ 0.7	6.7%	98.7
15.0	14.9 $\pm$ 0.8	5.0%	99.1
20.0	20.3 $\pm$ 0.9	4.4%	101.2

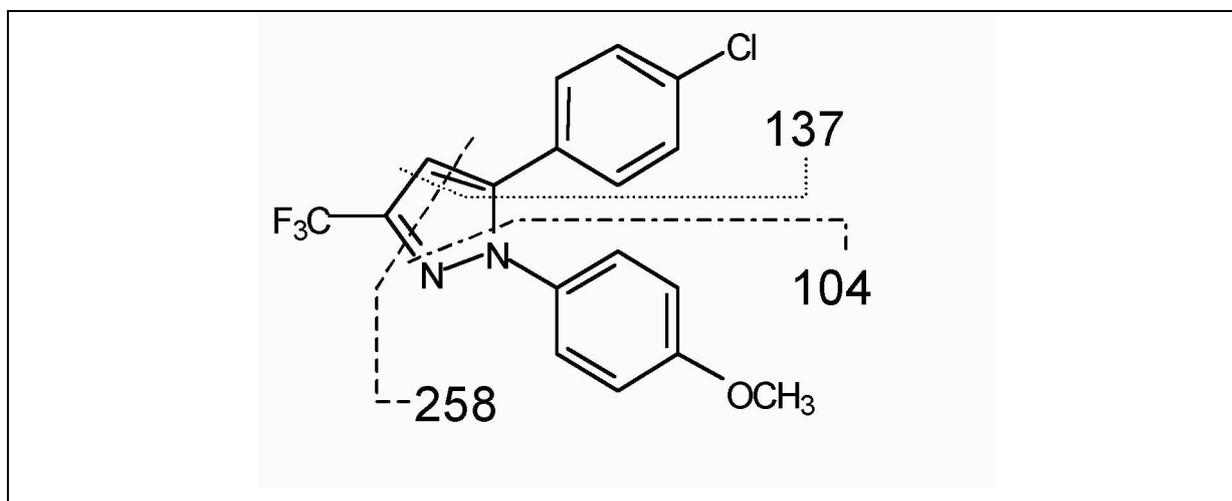
**Tab. 5-2:** Assay Präzision und Genauigkeit Für die Bestimmung von SC-560 in ACSF/Acetonitril 50:50 v/v.

## 5.2. Diskussion zur Entwicklung und Validierung der analytischen Methode für die Bestimmung von SC-560 in Microdialysaten

### 5.2.1. Massenspektrometrie

SC-560 bildet im positiven Ionenmodus einige Fragmente, die analytisch nutzbar sind, aber alle eine relativ geringe Signalintensität besitzen. SC-560 fehlt eine prominente Abgangsgruppe, wie die Sulfonamidgruppe des Celecoxib, die nach der Fragmentierung stabile Moleküle bilden kann.

Das Fragment  $m/z$  77 besteht aus  $C_6H_5^+$ , das von Phenylderivaten gebildet wird. Die Phenylringe werden bei positiver Ionisierung eher nicht gespalten. Daher finden die meisten Fragmentierungen am Pyrrazolring statt. Einige mögliche Fragmentierungen sind in Abb.5-5 dargestellt. Um die tatsächlichen Fragmentierungsreaktionen aufklären zu können, müssten Experimente mit Isotopen markierten Derivaten von SC-560 durchgeführt werden. Für die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung ist dieser Aufwand allerdings nicht notwendig.



**Abb. 5-5:** Einige mögliche Fragmentierungen von SC-560. Die Ziffern bezeichnen das jeweilige  $m/z$ -Verhältnis.

### 5.2.2. Chromatographie

SC-560 besitzt mit der Etherfunktion eine im Vergleich zur Sulfonamidgruppe des Celecoxib, unpolare Gruppe. Daher retiniert SC-560 deutlich länger auf  $C_{18}$ -Material als Celecoxib. Allerdings verbreitert sich der Peak erheblich. Durch einen steilen Gradienten wurde die Peakbreite deutlich reduziert und das Signal/Rausch-Verhältnis und folglich die Sensitivität deutlich verbessert. Mit der Verwendung der *narrow-bore* Säule mit 1 mm Innendurchmesser

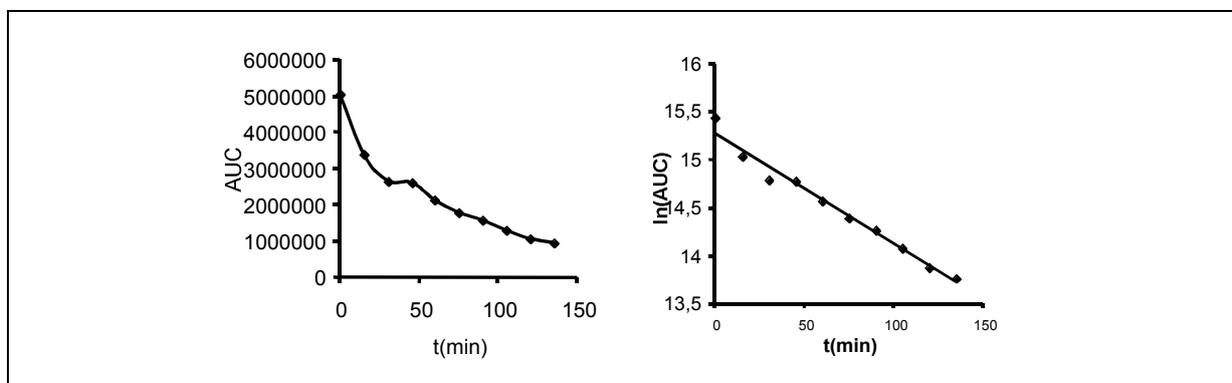
konnte die Empfindlichkeit zusätzlich gesteigert werden. Durch das Retentionsverhalten von SC-560 war die Verwendung einer so schmalen Säule mit einem Fluss von 0,2 ml/min unproblematisch.

Aufgrund der Innendimensionen der Säule wurde eine akzeptable Laufzeit von 10 min erreicht, da sich die Säule schnell wieder auf die Ausgangsbedingungen rekalisieren konnte.

### 5.2.3. Probenvorbereitung

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Konzentration von SC-560 in ACSF nach einer Kinetik 1. Ordnung (Abb. 5-6) abnahm. Daher wurde zunächst eine im ACSF ablaufende Reaktion angenommen. Die Suche nach möglichen Reaktionsprodukten mittels HPLC-UV und LC/MS/MS konnte diese Hypothese auch nicht bestätigen. SC-560 besitzt keine auffälligen, reaktiven Zentren, die eine Reaktion bei Raumtemperatur im wässrigen Medium möglich erscheinen lassen.

Lösungen mit hohen Konzentrationen an SC-560 in ACSF ( $>10 \mu\text{g/ml}$ ), trübten sich nach einiger Zeit. Dies war ein Hinweis darauf, dass die Lösung nicht stabil ist und SC-560 ausfällt. Mit der äquivalenten Menge Acetonitril löste sich die entstandene Trübung sofort wieder auf und SC-560 konnte in den Proben nachgewiesen werden.



**Abb. 5-6:** Konzentrationsabnahme von SC-560 in ACSF in linearer und logarithmischer Darstellung.

Mit der Verdünnung der Microdialysate 1:1 v/v mit Acetonitril konnte SC-560 problemlos nachgewiesen werden. Heikel ist die Bestimmung des Volumens der Microdialysate. Mit der Pipette kann eine so kleine Menge eigentlich nur mit einem Messfehler bestimmt werden, da die Glaswände benetzt sind und auch in der Pipettenspitze Flüssigkeit zurückbleibt. Wiederholte Tests der Methode haben aber ergeben, dass dieses Vorgehen reproduzierbar ist.

#### **5.2.4. Validierung**

Der steile Anstieg des organischen Anteils des Eluenten verursachte eine Zunahme des Grundrauschens, da durch die beschleunigte Verdunstung die Ionisierungseffizienz zunimmt. Dieser „Peak“ ist aber so klein, dass er bei der Auswertung nicht ins Gewicht fällt.

Für diese Analytik wurde ein Matrixeffekt mit einer Signalsuppression mit Faktor 11 festgestellt.

Die Präzision und Genauigkeit des Assays ist innerhalb des zulässigen Rahmens. Damit kann die Methode als valide angesehen werden.

## **6. Pharmakologische Effekte von Celecoxib**

Ein großer Teil dieser Studien basiert auf molekularbiologischen Experimenten, die nicht Inhalt dieser Dissertation sind. Für deren Beschreibung und Durchführung sei auf die entsprechenden Literaturstellen verwiesen. Soweit es für den Zusammenhang notwendig war, sind die Experimente im Text beschrieben.

SC-560 wurde in diesen Studien eingesetzt, um die Rolle der COX-1 bei der nozizeptiven Transmission zu untersuchen oder um zu zeigen, dass die Hemmung der Cyclooxygenase Aktivität nicht mit den beobachteten Effekten zusammenhängt, diese Effekte also auf einer COX-unabhängigen Wirkung beruhen.

### **6.1. Effekte selektiver COX-1 und COX-2 Hemmer auf das Formalin induzierte Schmerzverhalten und die PGE<sub>2</sub> Freisetzung im Rückenmark**

Die Bildung von PGE<sub>2</sub> im Rückenmark trägt erheblich zur Sensibilisierung von Nozizeptoren und Neuronen im Dorsalhorn bei [117, 118]. In diesem Projekt sollte zum einen untersucht werden, welche COX-Isoform für die frühe, durch nozizeptive Stimulation induzierte PGE<sub>2</sub> Produktion im Rückenmark verantwortlich ist. Zum anderen sollte die Frage beantwortet werden, ob die selektive Hemmung einer der zwei COX-Isoformen ausreicht, die induzierte PGE<sub>2</sub>-Produktion zu unterdrücken.

SC-560 als selektiver COX-1- und Celecoxib als selektiver COX-2-Hemmer wurden in den Tierexperimenten eingesetzt, um zwischen den Beiträgen der COX-Isoformen zur nozizeptiven Transmission zu unterscheiden. Der akute Schmerzreiz wurde durch die Injektion von Formalin in die Hinterpfote einer Ratte gesetzt und das nozizeptive Verhalten über 60 min beobachtet. Dieser Formalin-Test ist ein Standardmodell für Akut-Schmerz und wurde schon häufig genutzt, um die Wirkung unselektiv wirkender NSAIDs zu untersuchen [119-121]. Die Bildung von PGE<sub>2</sub> und die Konzentrationen der Wirkstoffe im Rückenmark wurden mit Hilfe der Mikrodialyse bestimmt [113-115].

## 6.1.1. Experimente zur selektiven COX-1 und COX-2 Hemmung auf die nozizeptive Transmission im Rückenmark

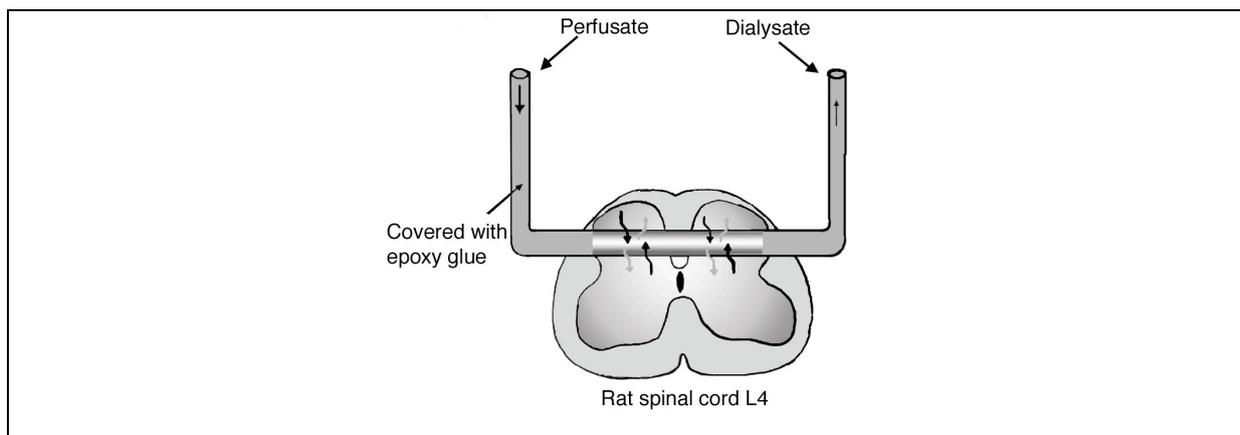
### 6.1.1.1. Microdialyse-Experimente

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanzen in wässrigen Medien wurden SC-560 in 500  $\mu$ l einer Mischung aus 1% Sojabohnen-Lecithin und 1% Tylose in Wasser und Celecoxib in 500  $\mu$ l Wasser (*aqua ad injectabile*) suspendiert und den Ratten 30 min vor Formalininjektion oral verabreicht.

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen wurde den Ratten Blut *retro-bulbär* entnommen. Microdialyse-Experimente wurden an wachen Tieren ausgeführt, die im Allgemeinen neurologisch unauffällig waren. Die Ratten konnten sich innerhalb eines Plexiglas-Kastens (30 x 40 cm) ungehindert bewegen.

Um die Konzentrationen von PGE<sub>2</sub>, SC-560 und Celecoxib im Rückenmark bestimmen zu können, wurde ein Microdialysekatheter mit einem Massen *cut-off* von 40 kDa und einem Innendurchmesser von 0,2 mm transvers in das Rückenmark implantiert, so dass er durch das Dorsalhorn des Lumbalmarks (L4) verlief (Abb. 6-1). Nach der Implantation des Katheters konnten sich die Tiere für 24 h erholen.

Der Microdialysekatheter wurde mit einem Fluss von 5  $\mu$ l/min mit ACSF perfundiert. Über einen Zeitraum von 1,5 h wurden im Abstand von 15 min Proben für die Basislinie gesammelt. Nach Gabe der oralen Dosis von 10 oder 20 mg/kg der jeweiligen Substanz (Celecoxib, SC-560), wurde für jeweils 15 min Dialysat gesammelt und bei  $-40^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



**Abb. 6-1:** Schematische Darstellung der Lage des implantierten Microdialyse-Katheters durch das Dorsalhorn des Rückenmarks.

### **6.1.1.2. Analytik von SC-560, Celecoxib und PGE<sub>2</sub>**

In den Microdialysaten wurde Celecoxib mit der Methode *CLX-Microdialysate*, SC-560 mit der Methode *SC-560 Microdialysate* nachgewiesen. Die Plasma Konzentrationen von Celecoxib wurden mit der Methode *CLX-1* bestimmt. Die Plasma Konzentrationen von SC-560 wurden mit einem HPLC-Assay mit Fluoreszenz Detektion gemessen. Die Methode ist in Kapitel 10.5. beschrieben. PGE<sub>2</sub> wurde mit einem kommerziell erhältlichen PGE<sub>2</sub> Enzym-Immuno-Assay (EIA) Kit bestimmt.

### **6.1.1.3. Untersuchung des nozizeptiven Verhalten (Formalin-Test)**

Das nozizeptive Verhalten der Ratten wurde nach der Formalininjektion in die Hinterpfote beobachtet. Dabei bewegt oder entlastet die Ratte die Pfote auf eine für den Formalin-Test typische Weise (*Flinchen*). Das *Flinchen* wurde in Intervallen von 1 min über 60 min vom selben Beobachter gezählt. Der Beobachter war nicht darüber informiert, welche Substanz die Tiere erhalten haben, um seine Zählung nicht zu beeinflussen.

### **6.1.1.4. Molekularbiologische Untersuchungen**

Die Bildung der COX-2 mRNA wurde aus Rückenmarksgewebe mittels RT-PCR und die Expression des Proteins der COX-2 wurde, ebenfalls aus Rückenmarksgewebe, mittels Western-Blot untersucht.

## **6.1.2. Ergebnisse der Experimentellen Untersuchungen**

### PGE<sub>2</sub>-Freisetzung im Dorsalhorn des Rückenmarks

Nach der Injektion von Formalin in die Hinterpfote (Positiv-Kontrolle) stieg die PGE<sub>2</sub>-Konzentration in den Microdialysaten innerhalb der ersten 30 Minuten schnell an. Nach 1-2 h sanken die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen wieder auf das Niveau der Basislinie ab. In Kontrolltieren, denen 0,9% NaCl injiziert wurde (Negativ-Kontrolle), blieben die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen während der Dauer der Microdialyse (6 h) auf dem Niveau der Basislinie (Abb. 6-2A). Es wurde auch dann keine Abweichung der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen von der Basislinie festgestellt, wenn den Tieren 30 min vor der NaCl-Injektion 20 mg/kg SC-560 oder 20 mg/kg Celecoxib gegeben wurden (Abb. 6-2B). Das Ereignis der Injektion und die Substanzen an sich hatten somit keinen Einfluss auf den Verlauf der nicht stimulierten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Microdialysaten.

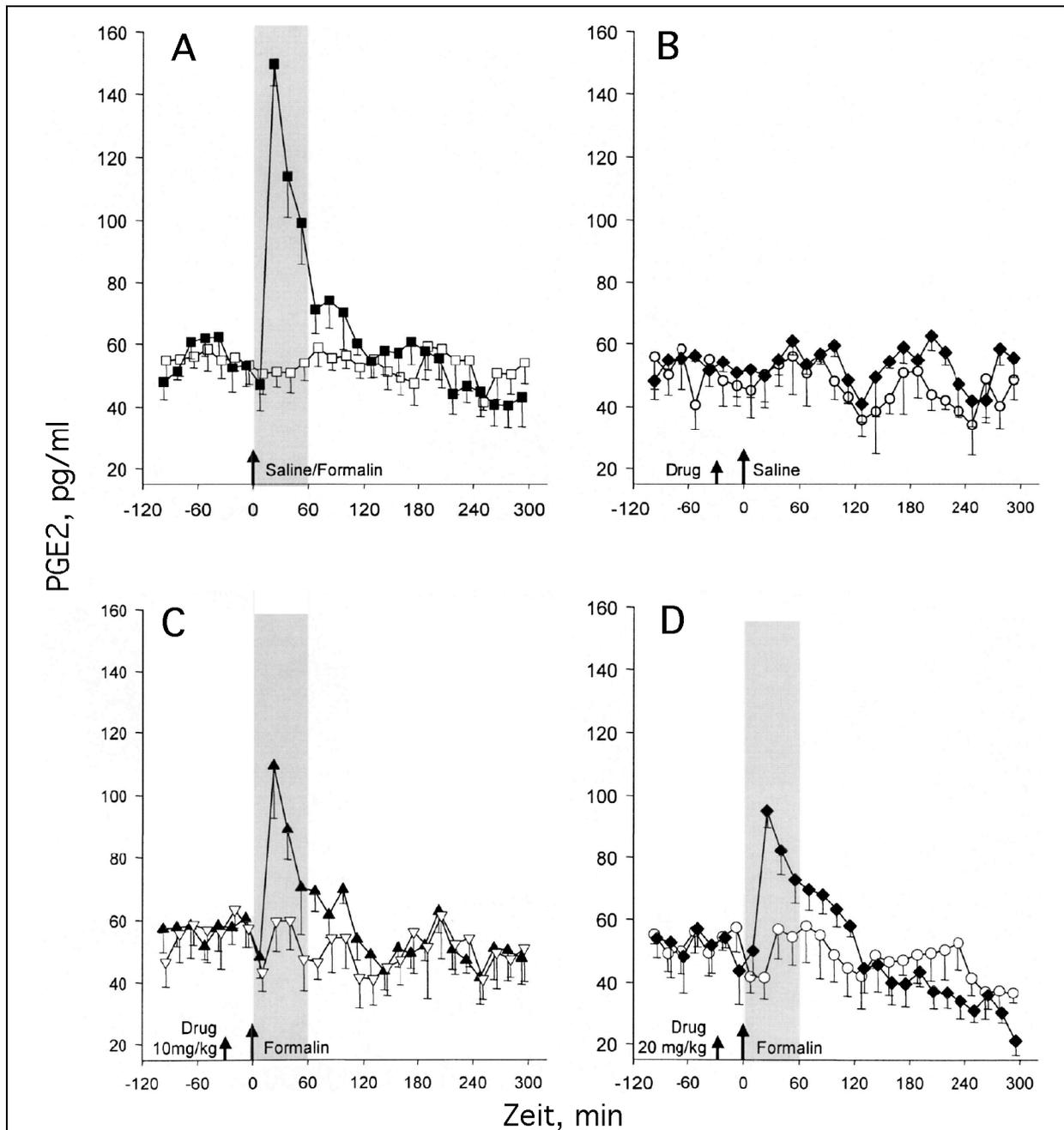
Wurden den Tieren 30 min vor der Formalin-Injektion 10 oder 20 mg/kg SC-560 gegeben, konnte kein Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Microdialysaten innerhalb der 6 h Messzeit beobachtet werden. Der Konzentrationsverlauf blieb auf dem Niveau der Basislinie und unterschied sich nicht vom Konzentrationsverlauf der Negativ-Kontrollen (Abb. 6-2 C, D). Wurden den Tieren 30 min vor der Formalin-Injektion 10 oder 20 mg/kg Celecoxib gegeben, konnte ein schneller Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen festgestellt werden, der jedoch gegenüber den Positiv-Kontrollen kleiner ausfiel (Abb. 6-2 C, D).

Die durch die Formalin-Injektion verursachte PGE<sub>2</sub>-Freisetzung konnte also durch SC-560 signifikant gehemmt werden. Trotz der Gabe von Celecoxib erfolgte nach der Formalin-Injektion ein gegenüber den Negativ-Kontrollen signifikanter Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen.

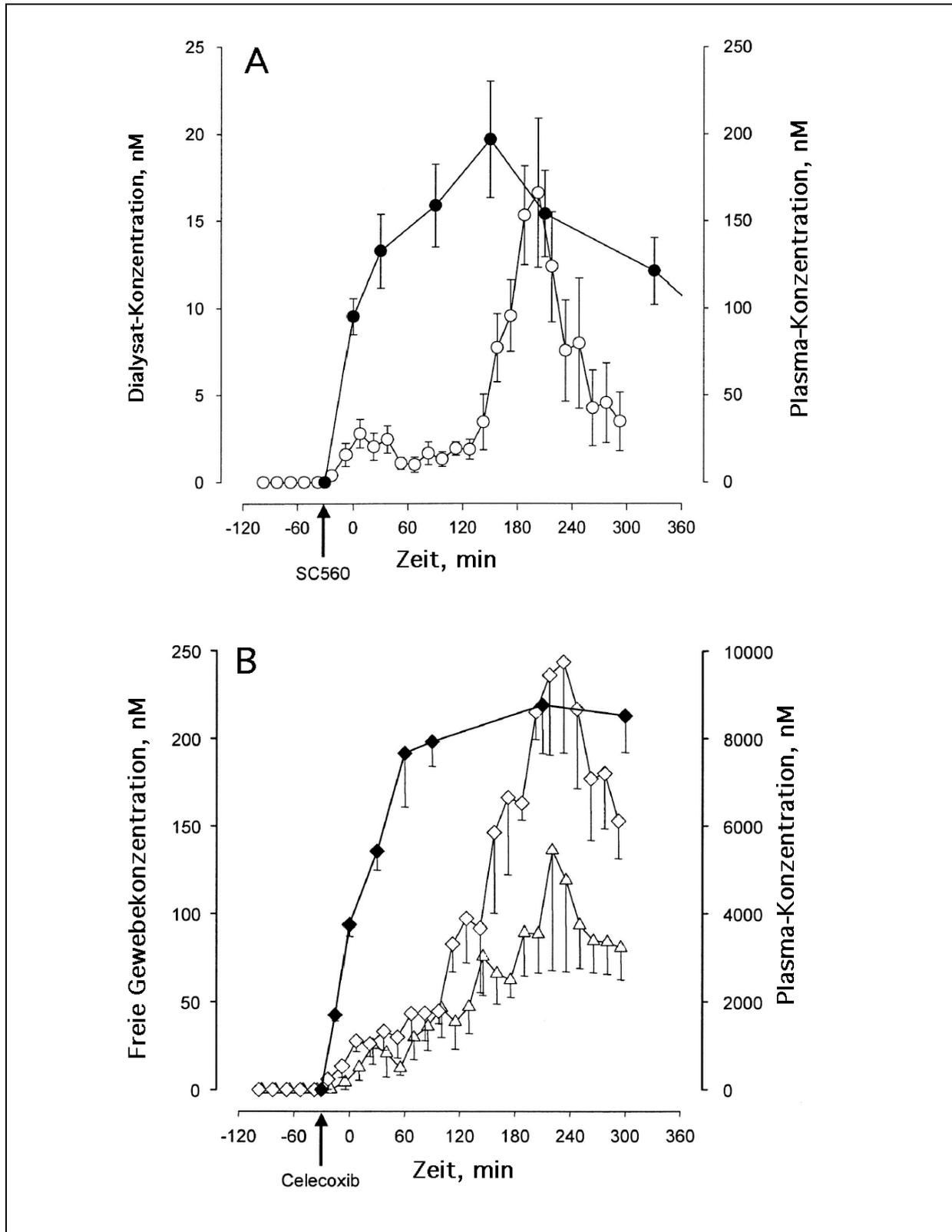
### Die Konzentrationen von SC-560 und Celecoxib in Plasma und Microdialysaten

Mittels der Microdialyse kann nur die freie Konzentration eines Wirkstoffes bestimmt werden. Da nur ein Teil der freien Fraktion des Wirkstoffes durch die Microdialysemembran in das Dialysat übertritt, wird mit Hilfe von Standardlösungen der Anteil bestimmt, der in das Dialysat übergeht (*in vitro*-Wiederfindung). Das Verfahren ist in Material und Methoden beschrieben (Kap. 11.2.3) Für Celecoxib betrug die freie Fraktion im Plasma 2,8% und die *in vitro*-Wiederfindung, die über den Konzentrationsbereich von 5-500 nM linear war, 9,17%. Anhand der *in vitro*-Wiederfindung wurden die im Dialysat ermittelten Konzentrationen in freie Gewebekonzentrationen umgerechnet. Für SC-560 konnte keine stabile wässrige Lösung hergestellt werden. Die Zugabe organischen Lösungsmittels hätte die Diffusion durch die Microdialysemembran beeinflusst, oder diese angelöst, was zu falschen Ergebnissen geführt hätte. Daher konnten keine *in vitro*-Wiederfindung und damit keine freie Gewebekonzentration für SC-560 bestimmt werden. In Abb.6-3 A sind daher für SC-560 die Konzentrations-Zeit Verläufe der Dialysate und des Plasmas dargestellt. In Abb.6-3 B sind für Celecoxib die Konzentrations-Zeit Verläufe der freien Gewebekonzentrationen im Rückenmark und des Plasmas dargestellt.

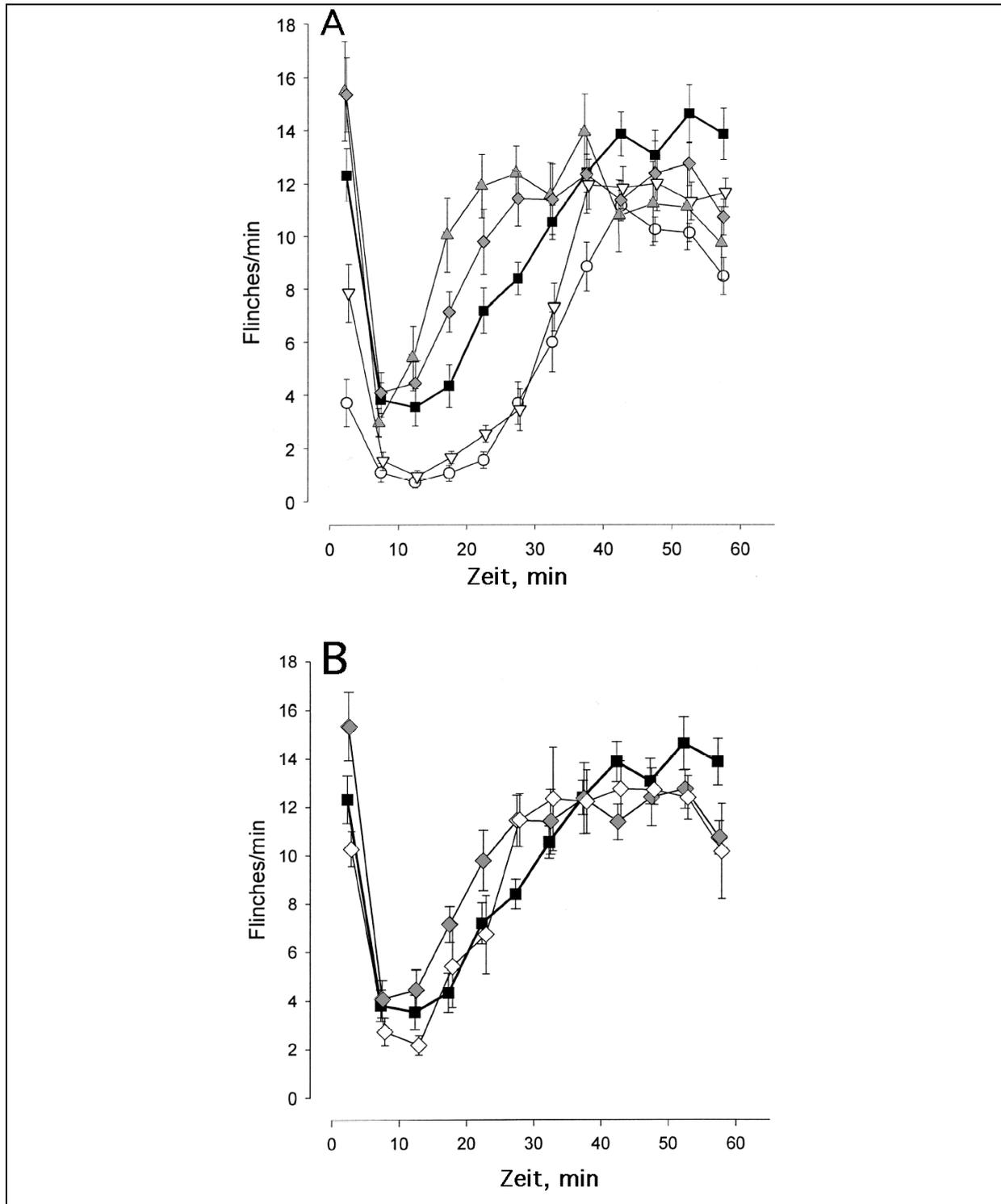
Die mittlere Dialysat-Konzentration von SC-560 nach 20mg/kg p.o. betrug für den Zeitraum des Formalintests (0-60 min nach Formalin-Injektion)  $1,9 \pm 0,6$  nM und lag damit in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Dialysat-Konzentrationen für Celecoxib (20mg/kg). Die mittlere freie Gewebekonzentration von Celecoxib betrug für diesen Zeitraum  $32,0 \pm 4,5$  nM.



**Abb. 6-2:** Konzentrations-Zeit Verläufe von PGE<sub>2</sub> in Microdialysaten des Dorsalorns. **A)** nach Injektion von 0,9% NaCl (□, Negativ-Kontrolle  $n=7$ ) oder 50 µl 5% Formalin (■, Positiv-Kontrolle,  $n=10$ ) in die rechte Hinterpfote. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der Injektionen (0 min) und die Schraffur den Zeitraum, in dem das *Flinchen* beobachtet wurde. **B)** PGE<sub>2</sub> Konzentrations-Zeit Verläufe in Microdialysaten von Ratten, denen 0,9% NaCl injiziert wurde. Den Tieren wurden 30 min vor der Injektion entweder 20 mg/kg SC-560 (○,  $n=3$ ) oder 20 mg/kg Celecoxib (◆,  $n=3$ ) gegeben. Der erste Pfeil (*Drug*) kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem die Substanz gegeben wurde, der zweite Pfeil (*Saline*) den Zeitpunkt der Injektion. **C)** PGE<sub>2</sub> Konzentrations-Zeit Verläufe in Microdialysaten von Tieren, denen 50 µl 5% Formalin in die Hinterpfote injiziert wurden. 30 min vor der Formalin-Injektion wurden den Tieren entweder 10 mg/kg Celecoxib (▲,  $n=7$ ) oder 10 mg/kg SC-560 (▽,  $n=7$ ) gegeben. **D)** PGE<sub>2</sub> Konzentrations-Zeit Verläufe in Microdialysaten von Tieren, denen 50 µl 5% Formalin in die Hinterpfote injiziert wurden. 30 min vor der Formalin-Injektion wurden den Tieren entweder 20 mg/kg SC-560 (○,  $n=7$ ) oder 20 mg/kg Celecoxib (◆,  $n=7$ ) appliziert.



**Abb. 6-3: A)** Konzentrations-Zeit Verläufe von SC-560 in Microdialysaten (○,  $n=5$ ) und Plasma (●,  $n=6$ ) nach Gabe von 20 mg/kg p.o. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem SC-560 gegeben wurde. **B)** Konzentrations-Zeit Verläufe der freien Gewebekonzentrationen im Rückenmark von Celecoxib im Rückenmarksgewebe nach 20 mg/kg p.o. (◇,  $n=5$ ), nach 10 mg/kg p.o. (△,  $n=5$ ) und im Plasma nach 20 mg/kg p.o. (◆,  $n=5$ ) Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem Celecoxib gegeben wurde.



**Abb. 6-4:** Zeitverläufe der Änderung des nozizeptiven Verhaltens (*Flinches*) von Ratten nach Injektion von 50  $\mu$ l 5% Formalin in die Hinterpfote. **A)** Die Tiere haben 10 mg/kg ( $\nabla$ ,  $n=12$ ) oder 20 mg/kg ( $\circ$ ,  $n=12$ ) SC-566, 10 mg/kg ( $\blacktriangle$ ,  $n=9$ ) oder 20 mg/kg ( $\blacklozenge$ ,  $n=10$ ) Celecoxib, oder Vehikel ( $\blacksquare$ ,  $n=20$ ) erhalten. 30 min vor der Formalin-Injektion wurden den Tieren die Substanzen p.o. gegeben.

**B)** Vergleich des nozizeptiven Verhaltens von Ratten, die 20 mg/kg Celecoxib p.o. 4 h vor der Formalin-Injektion erhalten haben ( $\diamond$ ,  $n=5$ ), und Ratten, die 20 mg/kg Celecoxib ( $\blacklozenge$ ,  $n=5$ ) oder Vehikel ( $\blacksquare$ ,  $n=20$ ) 30 min vor der Formalin-Injektion erhalten haben.

### Nozizeptives Verhalten nach Formalin-Injektion

SC-560 reduzierte das *Flinchen* im Vergleich zu den Kontrolltieren, die keinen Wirkstoff erhalten haben. Dieser Effekt war in der ersten Phase (0-10 min) und in der frühen zweiten Phase (11-40 min) des Formalin-Tests am deutlichsten. Bei einer Dosis von 20 mg/kg SC-560 wurde das *Flinchen* auch in der späten zweiten Phase des Formalin-Tests reduziert (40-60 min). Celecoxib reduzierte das *Flinchen* in keiner Phase des Formalin-Tests. In der ersten und frühen zweiten Phase wurde das *Flinchen* sogar tendenziell verstärkt (Abb. 6-4A). Das nozizeptive Verhalten änderte sich auch dann nicht, wenn Celecoxib 4 h vor der Formalin-Injektion gegeben wurde (Abb. 6-4B)

### COX-2 Expression im Rückenmark

Um auszuschließen, dass die Microdialyse an sich die Expression der COX-2 induziert, wurde die Expression der COX-2 mRNA und des COX-2 Proteins im Rückenmarksgewebe der Versuchstiere untersucht.

Dazu wurde gegen Kontrolltiere verglichen, die keine Behandlung erhalten haben. Im Rückenmarksgewebe von Tieren, die sich 7 h an der Microdialyse befanden, aber keine Injektionen erhalten haben, blieb die Expression der COX-2 mRNA gegenüber den Kontrolltieren unverändert. Nach Formalin-Injektion stieg die Expression der mRNA schnell an und erreichte nach 2 h ein Maximum. Die Expression des COX-2-Proteins dagegen blieb bis zu 4 h nach Formalin-Injektion unverändert.

### **6.1.3. Diskussion**

Die Wirksamkeit der NSAIDs beruht sowohl auf der Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Produktion am Ort des schmerzhaften Geschehens als auch im Rückenmark [123]. Allein durch die Hemmung der COX-1 konnte im Dorsalhorn des Rückenmarks die Formalin-induzierte PGE<sub>2</sub>-Produktion verhindert werden. Die Hemmung der COX-2 mit Celecoxib zeigte dagegen kaum eine Wirkung. Celecoxib zeigte auch keinen Effekt auf die nozizeptive Antwort im Formalin-Test, im Gegensatz zu SC-560, das die nozizeptive Antwort effektiv hemmen konnte. Die Effektivität von SC-560 zeigte sich besonders in der zweiten Phase des Formalin-Tests, welche vor allem durch die unselektiv wirkenden NSAIDs beeinflusst wird. In der Wirksamkeit war SC-560 damit in diesem Schmerzmodell den NSAIDs vergleichbar, und Celecoxib ihnen deutlich unterlegen.

Der Formalin-Test kann als ein Modell für akuten Schmerz angesehen werden. Die nicht-selektiven NSAIDs erreichen ihre Effekte bei akuten Schmerzen somit zunächst nur über die Hemmung der COX-1. Für Celecoxib bedeutet das folglich, dass es bei akuten Schmerzen eine geringere Wirkung zeigt, als die unselektiv wirkenden NSAIDs.

In anderen Schmerzmodellen konnte Celecoxib eine antinozizeptive Effektivität zeigen. Eine Erklärung für diesen Widerspruch zwischen verschiedenen Versuchsergebnissen kann in der Verteilung der COX-Isoformen im Rückenmark gefunden werden. Die beiden Isoformen sind in unterschiedlichen Zellen konstitutiv exprimiert. So ist die COX-1, aber nicht die COX-2 in den Glia Zellen des Dorsalhorns vorhanden. Die COX-2 hingegen findet sich in den Motoneuronen des Rückenmarks, kann aber durch einen Schmerzreiz im Dorsalhorn hochreguliert werden [19,27], wenn auch verzögert. Im Formalintest wurde die COX-2 mRNA zwar schon 30 min nach Formalin-Injektion hochreguliert, die Protein-Synthese blieb aber bis zu 4 h nach Injektion unverändert. In anderen Studien wurde das COX-2-Protein sogar erst nach mehr als 6 h nach Injektion gebildet [27].

## 6.2. Wirkung von Celecoxib in hohen Dosierungen

In einigen klinischen Studien zeigte die Dosiserhöhung von Celecoxib von 200 mg auf 400 oder 800 mg keine Verbesserung der analgetischen oder antiinflammatorischen Wirkung. Die Anzahl der Patienten, die positiv auf die höhere Dosierung von Celecoxib ansprachen, war sogar etwas geringer als in der vergleichbaren Gruppe, die nur 200 mg erhalten haben [124-126]. Aufgrund dieser klinischen Ergebnisse wurde angenommen, dass Celecoxib einen frühen *ceiling*-Effekt oder sogar eine Dosis-Wirkungsbeziehung in Form einer Glockenkurve aufweisen kann.

Diese Annahmen sollten im Tierversuch mit dem Zymosan-Entzündungsmodell [127] getestet werden. Dabei wurde den Versuchstieren Zymosan in die Hinterpfote injiziert, was zu einer Entzündung und zu einem Ödem führte, dessen Ausdehnung mit dem Ausmaß der Entzündung korreliert. Die entstehende Entzündung und die Wirksamkeit von Celecoxib auf diese Entzündung wurden anhand des Pfootenvolumens, das sich aufgrund des entstehenden Ödems änderte, gemessen. Mögliche Wirkungsmechanismen wurden in Zellkultur an renalen Mesangiumzellen (rMES) von Ratten untersucht.

### 6.2.1. Untersuchungen zur Wirkung hoher Dosierungen von Celecoxib

#### 6.2.1.1. Tierversuche mit dem Zymosan-Entzündungsmodell

Celecoxib wurde in 500 µl Wasser mit 1% Sojabohnenlecithin und 1% Tylose suspendiert und den Ratten 15 min vor der Zymosan-Injektion oral verabreicht. Kontrolltiere erhielten das Volumen der Trägersubstanz ohne Wirkstoff (Vehikel). Die Ratten wurden 24 h vor der Gabe des Wirkstoffes nüchtern gehalten, hatten aber freien Zugang zu Wasser. Danach wurden den Tieren 10, 50, 100 oder 200 mg/kg Celecoxib verabreicht, mit je sechs bis zehn Tiere pro Dosierung. Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen wurden 100 µl Blut *retro-bulbär* entnommen und mit der Methode *CLX-1* bestimmt.

Um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen wurden 15 min nach Gabe von Celecoxib oder einem Vehikel 1,25 mg Zymosan in 100 µl Phosphatpuffer subkutan in eine Hinterpfote injiziert. Das entstehende Ödem wurde mittels eines Plethysmometers gemessen.

### 6.2.1.2. Molekularbiologische Experimente

Aus Zelllysaten wurde PGE<sub>2</sub> mittels eines PGE<sub>2</sub> EIA Kit, NO als Nitrit und Nitrat nach der Gries Methode [128] bestimmt. TNF $\alpha$  wurde aus Zellkulturüberständen und aus Rückenmarksgewebe der Versuchstiere mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen EIA bestimmt. COX-2 Protein wurde aus Zelllysaten, Kernextrakten und Rückenmarkshomogenaten mittels Western-Blot, COX-2-mRNA und iNOS-mRNA mittels RT-PCR und Northern-Blot untersucht. NF- $\kappa$ B wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) untersucht, die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 und I $\kappa$ B mittels Western-Blot.

### 6.2.2. Ergebnisse der Experimentellen Untersuchungen

#### Plasma Konzentrationen von Celecoxib

Zunächst wurden für die Dosierungen 20, 50 und 200 mg/kg Plasmakonzentrationen in Ratten bestimmt, um einen Anhaltspunkt für die Konzentrationen in den Zellkulturexperimenten zu erhalten. Um die klinische Relevanz der Untersuchungen zu zeigen, wurden die Plasmakonzentrationen von drei Probanden bestimmt, die eine Einzeldosis von 800 mg erhalten hatten.

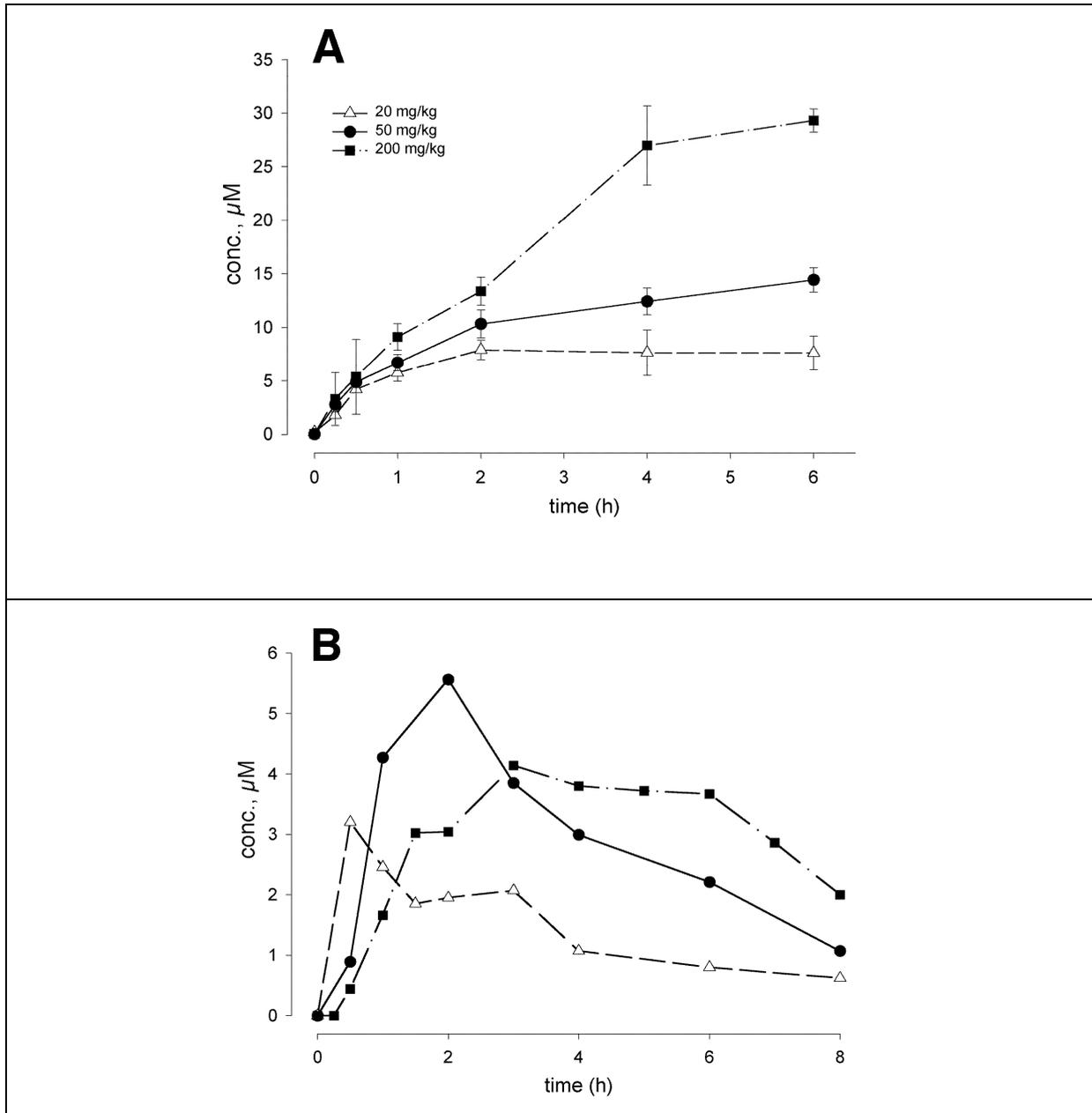
Die erreichten Maximalkonzentrationen in Rattenplasma waren  $7,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$  ( $2905 \pm 610 \text{ ng/ml}$ ) für verabreichte 20 mg/kg,  $14,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$  ( $5500 \pm 420 \text{ ng/ml}$ ) für 50 mg/kg und  $29,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$  ( $11200 \pm 420 \text{ ng/ml}$ ) für 200 mg/kg. Die Plasmakonzentrationen stiegen nicht linear mit der Dosis, was auf eine limitierte gastrointestinale Absorption hinweisen kann.

Die maximalen Plasmakonzentrationen der Probanden betragen  $3,2 \mu\text{M}$  ( $1220 \text{ ng/ml}$ ),  $5,6 \mu\text{M}$  ( $2140 \text{ ng/ml}$ ) und  $4,1 \mu\text{M}$  ( $1570 \text{ ng/ml}$ ). Der in Zellkultur eingesetzte Konzentrationsbereich (1, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) umfasste somit die *in vivo* erreichten Konzentrationen.

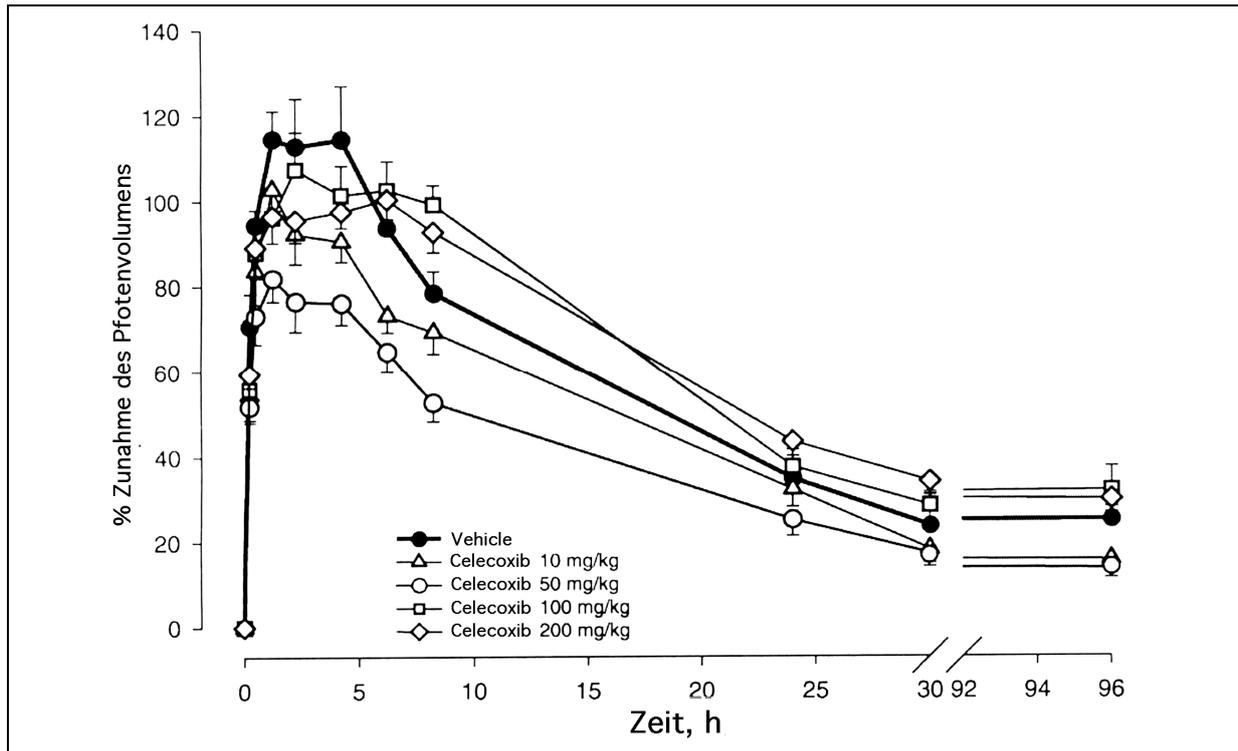
#### Effekte von Celecoxib auf die Zymosan-induzierte Entzündung

Aufgrund der Zymosan-Injektion nahm das Pfortenvolumen bei den Kontrolltieren, die nur das Vehikel erhalten haben, im Maximum um  $125,6 \pm 9,1\%$  zu. Hatten die Ratten 10 oder 50 mg/kg Celecoxib erhalten wurde die Zunahme des Pfortenvolumens signifikant reduziert. Für die Tiere, die höhere Dosierungen mit 100 und 200 mg/kg Celecoxib erhalten haben, gab es keine offensichtlichen Unterschiede zu den Tieren, die nur das Vehikel erhalten haben. Innerhalb der ersten 4 h Stunden nach der Zymosan-Injektion fiel für die hohen Dosierungen

die Volumenzunahme zwar tendenziell geringer aus als für die Kontrolltiere, doch innerhalb der folgenden 8-96 h waren die Ödeme vergleichsweise größer.



**Abb. 6-5: A)** Konzentrations-Zeit Verläufe von Celecoxib in Rattenplasma nach oraler Dosis von 20 mg/kg ( Δ ), 50 mg/kg ( ● ) und 200 mg/kg ( ■ ) (Mittelwerte mit Standardabweichung)  
**B)** Individuelle Konzentrations-Zeit Verläufe in Plasma von drei Probanden nach einer oralen Einzeldosis von 800 mg.



**Abb. 6-6:** Zeitverlauf der antiinflammatorischen Effekte von Celecoxib im Zymosan-Entzündungsmodell an Ratten. Die Tiere erhielten 15 min vor der Zymosan-Injektion eine orale Einzeldosis Celecoxib mit 10 ( $\Delta$ ), 50 ( $\circ$ ), 100 ( $\square$ ) und 200 ( $\diamond$ ) mg/kg ( $n=6-10$ ). Die Kontrolltiere erhielten ein Vehikel des gleichen Volumens ohne Wirkstoff ( $\bullet$ ).

### Resultate der Molekularbiologischen Experimente

Um festzustellen, ob der Wirkungsverlust der hohen Konzentrationen von Celecoxib über den Einfluss auf die Prostaglandinsynthese zu erklären ist, wurden rMES Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  mit Celecoxib in den Konzentrationen von 1, 10 und 50  $\mu$ M versetzt. Celecoxib inhibierte in allen drei Konzentrationen signifikant die IL-1 $\beta$  stimulierte Prostaglandin-Freisetzung.

Die durch IL-1 $\beta$  stimulierte COX-2 mRNA und Protein Expression wurde bei 1  $\mu$ M reduziert, zeigte keinen Effekt bei 10  $\mu$ M und stieg bei 50  $\mu$ M sogar an.

Die Transkription des COX-2-Gens wird über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert. NF- $\kappa$ B ist an das inhibitorische Protein I $\kappa$ B gebunden, das nach Stimulation durch I $\kappa$ B-Kinasen phosphoryliert, ubiquitiniert und schließlich durch Protease Komplexe abgebaut wird. Das auf diese Weise freigesetzte NF- $\kappa$ B wird in den Zellkern transloziert und aktiviert dort durch die Bindung an verschiedene Promoterregionen die Transkription proinflammatorischer Proteine wie COX-2, TNF- $\alpha$  und iNOS.

Die Frage, ob die COX-2 Überexpression durch eine gesteigerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt wurde, sollte mit den folgenden Experimenten beantwortet werden.

Zunächst wurden die Zellen mit 1, 10 oder 50  $\mu$ M Celecoxib vorinkubiert und dann mit IL-1 $\alpha$  stimuliert. Die stimulierte NF- $\kappa$ B-DNA Bindungsaktivität wurde durch 1  $\mu$ M Celecoxib reduziert, durch 50  $\mu$ M aber überstimuliert. Dabei hatten 1 und 10  $\mu$ M Celecoxib keinen Einfluss auf die Konzentration von NF- $\kappa$ B im bzw. die Translokation in den Zellkern. Der Abbau von I $\kappa$ B wurde durch 1 und 10  $\mu$ M jedoch etwas reduziert. 50  $\mu$ M Celecoxib bewirkten den völligen Abbau von I $\kappa$ B und eine Zunahme der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern.

Weiterhin wurde der Einfluss hoher Dosierungen von Celecoxib auf die Expression von TNF $\alpha$  und iNOS untersucht. 50  $\mu$ M Celecoxib bewirkten dabei eine Überexpression von iNOS mRNA, jedoch ohne Einfluss auf das iNOS Protein und die Nitrit/Nitrat-Freisetzung.

Die TNF $\alpha$  Konzentration lag mit 50  $\mu$ M Celecoxib sogar oberhalb der TNF $\alpha$  Konzentrationen der Kontrollen, denen kein Celecoxib zugesetzt wurde.

Hohe Konzentrationen von Celecoxib aktivierten NF- $\kappa$ B, was eine Überproduktion proinflammatorischer Cytokine zur Folge hatte.

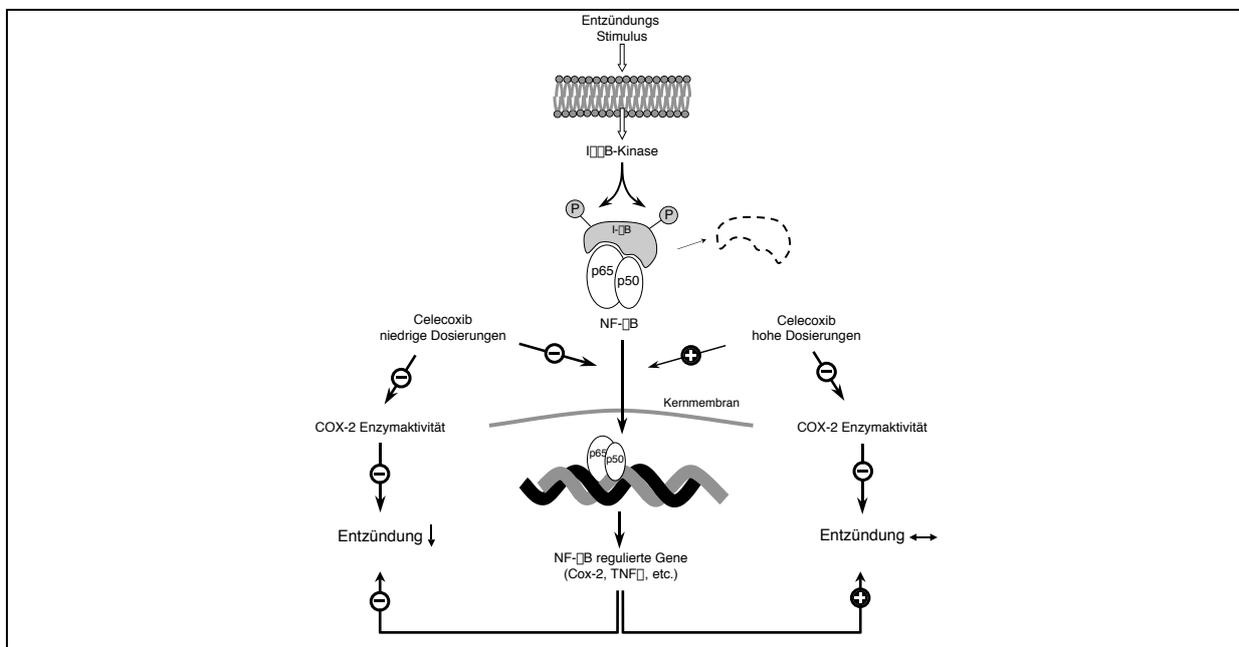
Untersuchungen des Rückenmarkgewebes der behandelten Tiere ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die COX-2 Protein Expression wurde durch eine Dosierung von 10 und 50 mg/kg gegenüber der Placebo Gruppe reduziert, mit 100 mg/kg blieb es unverändert. Mit 200 mg/kg fand sich mehr COX-2 Protein im Rückenmark als in der Vehikelgruppe, und iNOS wurde bei 200 mg/kg ebenfalls vermehrt exprimiert. TNF $\alpha$  stieg sogar signifikant an.

### 6.2.3. Diskussion

Im Tierversuch zeigte Celecoxib in Dosierungen von 100 und 200 mg/kg keine antiinflammatorische Wirkung mehr. Die Plasmakonzentrationen von noch effektiven 50 mg/kg (15  $\mu$ M) und 200 mg/kg (30  $\mu$ M) unterscheiden sich nur um den Faktor zwei. In Zellkultur Experimenten bewirkte eine Konzentration von 50  $\mu$ M eine erhöhte NF- $\kappa$ B-DNA Bindung, eine verstärkte Translokation von NF- $\kappa$ B und eine Erhöhung der NF- $\kappa$ B abhängigen Transskriptionen. Die Erhöhung der Transskriptionen konnte auch *in vivo* bestätigt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als zumindest teilweise verantwortlich für den Verlust der antiinflammatorischen Wirkung von Celecoxib angesehen werden.

Die durch eine Einzeldosis von 800 mg im Menschen erreichten Konzentrationen von 3-5  $\mu\text{M}$  bewirken *in vitro* eine Abnahme der NF- $\kappa\text{B}$  Aktivität und der damit verbundenen Transskription. Daher ist ein völliger Verlust der antiinflammatorischen Wirkung bei einer Dosis von 800 mg unwahrscheinlich. Die klinischen Studien zeigen für 2 x 100 mg/d eine bessere Effektivität als für 200 mg oder 400 mg. Aufgrund des *in vitro* gefundenen engen Konzentrationsbereiches mag für einige individuelle Patienten angenommen werden, dass bei einer Tagesdosis von 800 mg eine NF- $\kappa\text{B}$  Aktivierung stattfinden kann. Dieser Effekt wird dann wahrscheinlich teilweise durch die Prostaglandinsynthesehemmung kompensiert, was letztendlich zu keinem Verlust, aber einem Nachlassen der antiinflammatorischen Wirkung führt. Da durch NF- $\kappa\text{B}$  noch andere proinflammatorische Gene aktiviert werden, könnte der Entzündungsprozess bei hohen Dosierungen eventuell noch verstärkt werden.



**Abb. 6-7:** Schematische Darstellung des vermuteten Wirkmechanismus von Celecoxib auf NF- $\kappa\text{B}$  und NF- $\kappa\text{B}$ -abhängige Gen-Transkriptionen. Aktivierung (+), Hemmung (-), Abnahme  $\downarrow$ , Zunahme  $\uparrow$ .

### **6.3. Unterbrechung des Zellzyklus und Einleitung der Apoptose in Colon-Carzinom Zellen durch Celecoxib.**

Antiproliferative Effekte von NSAIDs sind schon länger bekannt und wurden bisher der COX-hemmenden Wirkung zugeschrieben [132, 133]. Celecoxib reduzierte in klinischen Studien die Anzahl adenomatöser colorectaler Polypen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis, und wurde für diese Indikation in den USA zugelassen. Der exakte Wirkmechanismus von Celecoxib und unselektiven Cyclooxygenasehemmern, der dem antiproliferativen Effekt zugrunde liegt, ist bisher noch nicht geklärt. Ist dieser Effekt an die COX-2 Hemmung und damit die Prostaglandinsynthese gebunden, müsste die antiproliferative Wirkung vor allem in COX-2 überexprimierenden Tumoren Wirkung zeigen, aber nicht in Tumoren mit COX-2 Mangel. Eine Studie mit einem Derivat der Acetylsalicylsäure, das keine COX-hemmende Wirkung mehr besitzt und antiproliferativ wirkte, stellte diese Hypothese bereits schon in Frage [134].

Um Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf das Zellwachstum zu studieren, wurden *in vitro* und *in-vivo* Untersuchungen mit COX-2 überexprimierenden (HT-29, Caco-2) und COX-2 defizienten (HCT-15) Kolontumorzelllinien durchgeführt.

#### **6.3.1. Untersuchungen zum Wirkmechanismus der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib**

##### **6.3.1.1. Molekularbiologische Experimente**

Um die Sensitivität der Zelllinien gegenüber den selektiven COX-Hemmern zu testen, wurde das *colony-forming assay* angewandt. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen über 16 h bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, bevor sie mit Celecoxib oder SC-560 in Konzentrationen von 0-50 µM für weitere 10 Tage inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100% Methanol fixiert und mit 0,5% Kristallviolett und 5% Giemsa Lösung gefärbt. Einzel-Zell Klone wurden mit Hilfe der *Quantity One* Software gezählt (BIO-RAD, München).

Apoptose wurde über die Detektion von Mono- und Oligonucleosomen, die während der Apoptose gebildet werden, mittels eines *Cell Death Detection* ELISA bestimmt (Roche Diagnostics, Mannheim). Dazu wurden die Zellen 16 h bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und dann mit 10, 50 und 100 µM Celecoxib oder SC-560 für 6 h inkubiert.

Zellzyklus Verteilung und Apoptose wurden mittels *flow cytometry* bestimmt. Die Zellen wurden dafür über 48 h ohne FCS im Medium in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert, um die Zellzyklen zu synchronisieren und dann 24 h mit 0,1% DMSO zur Kontrolle und mit 25, 50, 75 und 100 µM Celecoxib oder SC-560 inkubiert. Die mit Propidiumiodid angefärbten Zellen wurden mittels *flow cytometry* (Beckton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Die Western Blot Analyse wurde durchgeführt, um die Expression der COX-1 und COX-2 Proteine in den verschiedenen Zelllinien zu überprüfen und um die Expression anderer im Zellzyklus regulativ wirkender Proteine zu verfolgen.

### **6.3.1.2. Untersuchungen der antiproliferativen Wirkungen auf Tumore in Nacktmäusen**

7 Wochen alte NMRI nu/nu Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) wurden HCT-15 oder HT-27 Zellen subkutan an der rechten und linken dorsalen Flanke injiziert. Den Mäusen wurden über drei Wochen entweder 10, 25 oder 100 mg/kg/d Celecoxib oder 10 oder 100 mg/kg/d SC-560 oral verabreicht. Die erste Dosis wurde direkt nach der Tumorzellen-Injektion verabreicht. Jede Gruppe bestand aus fünf bis sechs Tieren. Das Volumen der Tumore wurde alle 2-3 Tage bestimmt. Nach Verabreichen der letzten Dosis wurden die Mäuse innerhalb von 2-4 h getötet, und deren Blut zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Celecoxib bzw. SC-560 entnommen.

### **6.3.1.3. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Celecoxib und SC-560**

Celecoxib wurde aus dem Mäuseplasma und Zellkulturüberständen mit der Methode *CLX-2* bestimmt. Die Proben wurden ebenso wie Humanplasmaproben aufgearbeitet<sup>4</sup>.

Plasmaproben (und Zellkulturüberstände) mit SC-560 wurden mit Festphasenextraktion extrahiert und mittels HPLC mit Fluoreszenz Detektion bestimmt. Die Methode ist in Material und Methoden beschrieben (Kap. 10.5.).

---

<sup>4</sup> Da nur sehr wenig Plasma aus Mäuseblut vorhanden war, wurde die Methode nicht speziell für Mäuseplasma validiert. Auch für die Zellkulturüberstände wurde die Methode nicht validiert. Die Messungen dienten nur zur Kontrolle der eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen.

### 6.3.2. Ergebnisse

#### **Der Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf das Zellüberleben**

Die Western Blot Analyse ergab, dass in allen Zelllinien COX-1 konstitutiv exprimiert wird. COX-2 wird nur in HT-29 und Caco-2 Zellen exprimiert, nicht in HCT-15 Zellen.

Die Ergebnisse des *colony forming assays* zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem Überleben der Zellen nach Inkubation mit Celecoxib oder SC-560 und der COX-2 Expression. Der IC<sub>50</sub>-Wert für Celecoxib betrug für HT-29 11,4 µM (± 19%), für HCT-15 22,2 µM (± 8%) und für Caco-2 Zellen 26,6 (± 28%). Die IC<sub>50</sub>-Werte für SC-560 betragen für HT-29 18,6 (± 8,6%) und für HCT-15 25,7 µM (± 8,6%).

#### **Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf die Induktion der Apoptose**

Um den Wirkmechanismus aufklären zu können, wurde untersucht, ob Apoptose durch Celecoxib oder SC-560 induziert wird. Dafür wurde die Spaltung von DNA und PARP (poly-ADP-ribose Polymerase) untersucht. PARP ist ein 112 kDa Kernprotein, das spezifisch durch aktivierte Caspase-3 und Caspase-6 in ein 85 kDa und ein 25 kDa Fragment gespalten wird. PARP ist neben der DNA Fragmentierung ein zweiter Marker für Apoptose.

DNA Fragmentierung wurde mit dem *Cell Death Detection* ELISA untersucht. Celecoxib induzierte in Konzentrationen von 50-100 µM in allen Zelllinien Apoptose. SC-560 hingegen zeigte keinen Effekt auf die Zelllinien.

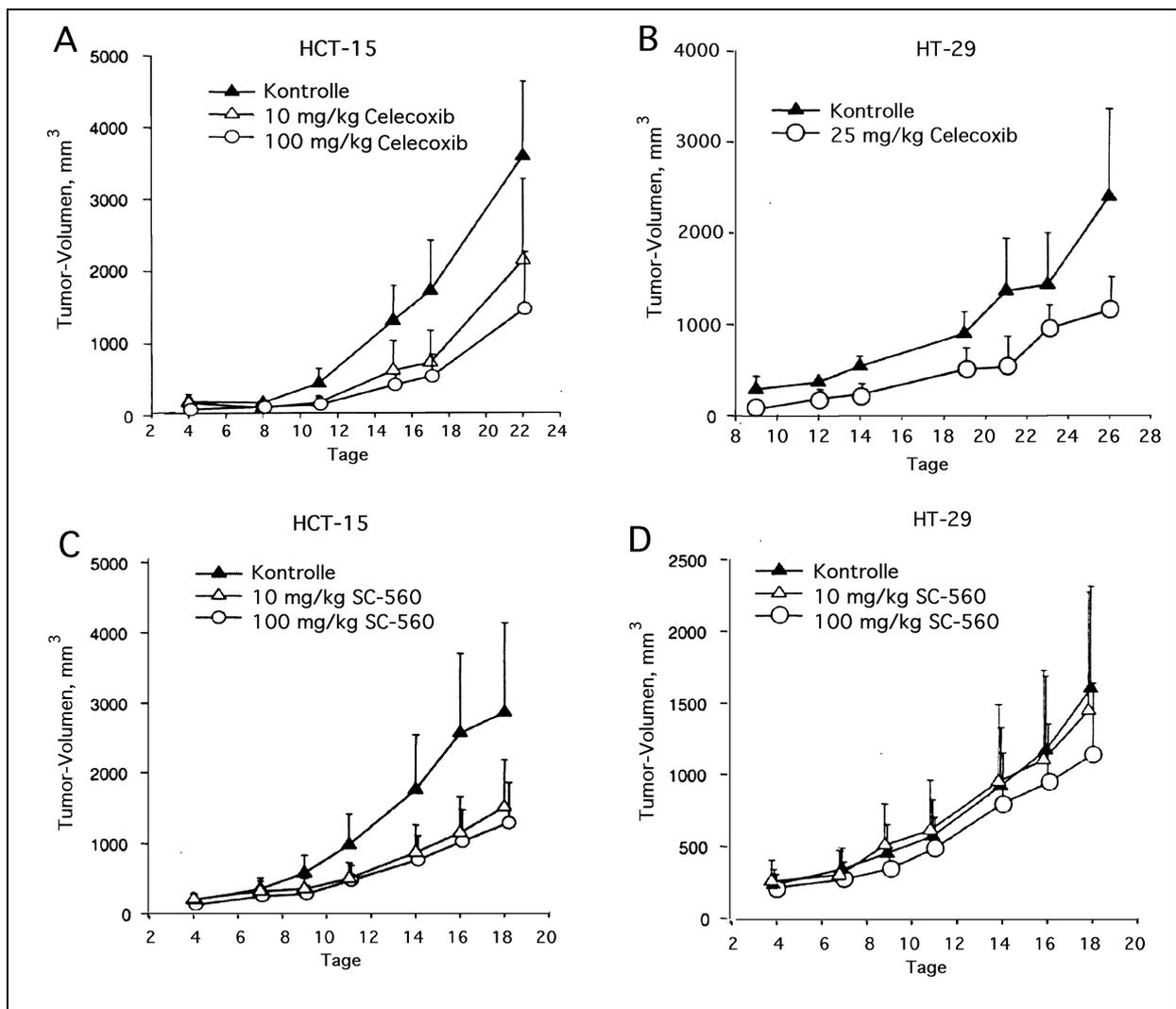
Die Spaltung von PARP wurde mittels Western Blot untersucht und bestätigte das oben beschriebene Ergebnis für Celecoxib mit 100 µM in allen Zelllinien. SC-560 zeigte auch hier keinen Effekt.

Mittels *flow cytometry* wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der subG<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus bestimmt. Diese Zellen stellen die apoptotische Fraktion dar. 100 µM Celecoxib erhöhten die subG<sub>1</sub>-Fraktion in HCT-15 und Caco-2 Zellen deutlich und in geringerem Ausmaß in HT-25 Zellen. 100 µM SC-560 bewirkten in allen Zelllinien einen nur leichten Anstieg der subG<sub>1</sub>-Fraktion. Celecoxib induzierte in den verwendeten Kolontumorzellen unabhängig von deren COX-2 Expression Apoptose.

#### **Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf den Zellzyklus**

Celecoxib und auch in geringen Maße SC-560 hemmten in allen Zelllinien im Zellzyklus den Übergang von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- zur S Phase, wodurch in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase Zellen akkumulierten,

was sich in der *flow cytometry* zeigen ließ. Um den möglichen Wirkmechanismus zu untersuchen, wurde die Expression der Proteine, die den Zellzyklus regulieren, mittels Western Blot untersucht. In allen drei Zelllinien bewirkten 100  $\mu\text{M}$  Celecoxib zeitabhängig eine Abnahmen der Expressionen von Cyclin A und B1 und in geringerem Ausmaß von Cdk-1 Protein. Diese Proteine regulieren den G<sub>2</sub>/M-Phasen Übergang im Zellzyklus. Die Expression der den Zellzyklus inhibierenden Proteine p21<sup>Waf1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, die den Zellzyklus an den Phasenübergängen G<sub>1</sub>/S und G<sub>2</sub>/M blockieren, stieg zeitabhängig an, mit einem Maximum bei 24 h. SC-560 hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser regulatorischen Proteine.



**Abb. 6-8:** Zeitverlauf des Wachstums von HCT-15 (A, C) und HT-29 (B, D) Tumoren in Nacktmäusen. Die Tiere haben Celecoxib (A, B) und SC-560 (C, D) täglich in den angegebenen Dosierungen direkt nach der subkutanen Injektion der Tumorzellen erhalten.

### **Einfluss von Celecoxib und SC-560 auf das Tumorwachstum in Nacktmäusen**

Im Tierversuch wurde die Proliferation der HCT-15 Tumore durch 10 und 100 mg/kg/d Celecoxib signifikant reduziert. Auch SC-560 konnte das Wachstum der HCT-15 Tumore reduzieren. Das Wachstum der HT-25 Tumore wurde durch keine der beiden Substanzen gehemmt (Abb. 6-8). Die Plasmakonzentrationen betragen 2-4 h nach der Gabe der letzten Dosis für Celecoxib  $0,77 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (10 mg/kg/d),  $1,4 \pm 0,25 \mu\text{M}$  (25 mg/kg/d) und  $3,8 \pm 0,72 \mu\text{M}$  (100 mg/kg/d), für SC-560  $0,8 \pm 0,12 \mu\text{M}$  (10 mg/kg/d) und  $1,6 \pm 0,52 \mu\text{M}$  (100 mg/kg/d).

### **6.3.3. Diskussion**

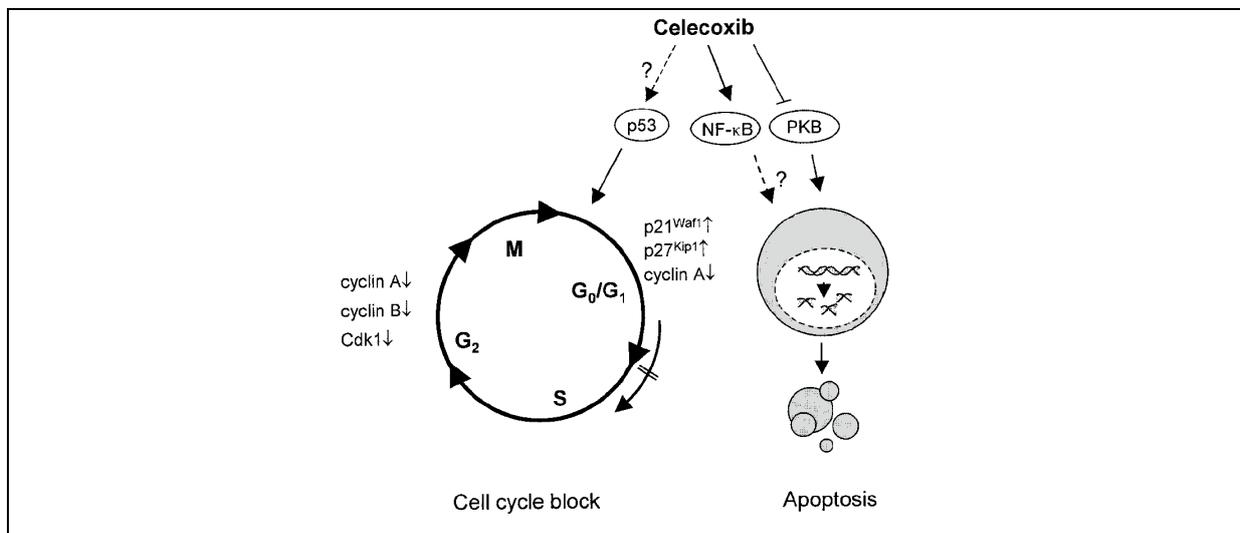
Unabhängig vom COX-2-Status der verschiedenen Zellen induzierte Celecoxib Apoptose. Das bedeutet, dass die antiproliferative Wirkung von Celecoxib unabhängig von der COX-2 hemmenden Wirkung ist. Diese Aussage wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die zur antiproliferativen Wirkung notwendigen Konzentrationen im Bereich von 50-100  $\mu\text{M}$  weit oberhalb der für die Hemmung der Cyclooxygenasen notwendigen Konzentrationen liegen ( $\text{IC}_{50}$ : COX-1:  $6,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ , COX-2:  $0,87 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ). Für SC-560 waren die für die Hemmung des Zellzyklus notwendigen Konzentrationen um den Faktor vier höher als die für die Hemmung der COX-1 notwendigen Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ : COX-1:  $0,01 \mu\text{M}$ ). Die *in vitro* Ergebnisse wurden durch die Tierversuche bestätigt. Im Tierversuch reichten weitaus geringere Konzentrationen an Celecoxib als *in vitro* um einen Effekt zu sehen. Die effektiven Plasmakonzentrationen von Celecoxib in den Tierversuchen (3-4  $\mu\text{M}$  bei 100 mg/kg/d) lagen in der gleichen Größenordnung wie die Plasmakonzentrationen von Probanden, die eine orale Einzeldosis von 800 mg/kg erhalten haben (3-5  $\mu\text{M}$ ). Celecoxib hat in Studien bei einer Dosierung von 800 mg/d, das Polypenwachstum bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis reduzieren können. Die für die antiinflammatorische Wirkung empfohlene Dosis von 100-200 mg/d hat keine Wirkung auf das Polypenwachstum gezeigt [129].

In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Celecoxib und in geringem Ausmaß auch SC-560 in Kolontumorzellen konzentrationsabhängig den Phasenübergang von der  $G_0/G_1$  zur S Phase des Zellzyklus hemmen können. Celecoxib bewirkte dabei eine Abnahme der Expression der den Phasenübergang regulierenden Proteine und steigerte die Expression inhibierender Proteine.

Die direkten zellulären Angriffspunkte für Celecoxib sind noch unbekannt. Die Hemmung des Zellzyklus kann eine Folge der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren sein. Die Expression der den Zellzyklus regulierenden Proteine wie p21<sup>Waf1</sup>, Cyclin A und B wird über die Transkriptionsfaktoren p53, AP-1 und NF- $\kappa$ B geregelt (Abb.6-6). In Kapitel 6.2 wurde beschrieben, dass hohe Konzentrationen von Celecoxib NF- $\kappa$ B aktivieren können [113].

Celecoxib inhibiert zudem die Aktivierung der Protein Kinase B (PKB)/Akt in Prostatakarzinom Zellen. Dieser Effekt ist mit der Induktion von Apoptose assoziiert. Die Hemmung der PKB/Akt trägt vermutlich zur antiproliferativen Wirkung von Celecoxib in bestimmten Tumoren bei [130].

SC-560 bewirkte zwar einen schwachen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Block, hatte aber keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten regulatorischen Proteine und bewirkte keine Apoptose. Die *in vivo* Effekte von SC-560 ähnelten jedoch zum Teil denen von Celecoxib. Die antiproliferativen Effekte von SC-560 beruhen vermutlich auf anderen Wirkungen als bei Celecoxib. Da SC-560 ein potenter COX-1 Hemmer ist, könnte die antiproliferative Wirkung *in vivo* über die Hemmung der COX-1 in Endothelzellen verlaufen, wodurch die Angiogenese und damit das Tumorwachstum beeinflusst werden [131].



**Abb. 6-9:** Schematische Darstellung der vermuteten Wirkmechanismen, aufgrund derer Celecoxib antiproliferativ in Kolontumorzellen wirken kann. (◻:Aktivierung, ◻:Hemmung)

## 7. Resümee

Seitdem Acetylsalicylsäure vor etwa 100 Jahren für die Behandlung von Schmerzen eingeführt wurde, sind gastrointestinale Unverträglichkeiten die häufigsten unerwünschten Ereignisse der NSAR, die zudem in den meisten Fällen der Grund für einen Therapieabbruch sind. Seit der Entdeckung, dass es zwei COX-Isoformen gibt, wurde in das Konzept der selektiven COX-2 Hemmung die Hoffnung gelegt, eine Schmerztherapie, die auf der Hemmung der Prostaglandinsynthese beruht, ohne gastrointestinale Komplikationen zu erhalten. Der erste für die Therapie zugelassene Vertreter der COX-2 selektiven Inhibitoren war das Celecoxib, das in klinischen Studien eine den NSAIDs vergleichbare Effektivität bewies, diesen dabei aber in Bezug auf gastrointestinale Komplikationen überlegen war.

Neben vielen offenen Fragen ist eine, ob die selektive Hemmung der COX-2 tatsächlich für eine effektive Analgesie ausreicht. So werden Prostaglandine nach einem Schmerzreiz nicht nur lokal, sondern auch im Rückenmark freigesetzt. Und dieser spinalen Prostaglandin-Produktion wird für die Schmerzentstehung inzwischen eine ebenso große Bedeutung beigemessen, wie der peripheren Prostaglandin-Produktion. Die Frage war, welche der COX-Isoform für die frühe Prostaglandin-Freisetzung verantwortlich ist, oder ob beide Isoformen dazu beitragen. Die COX-1 liegt im Dorsalhorn des Rückenmarks, wo die Schmerzverarbeitung stattfindet, konstitutiv exprimiert vor. Die COX-2 ist normalerweise im Dorsalhorn nicht zu finden, wird nach einem Schmerzreiz jedoch schnell hochreguliert und trägt dann ebenfalls zur Prostaglandin-Produktion bei.

In der ersten Studie dieser Arbeit zu den pharmakologischen Effekten von Celecoxib und SC-560 sollte die Frage beantwortet werden, welche COX-Isoform für die frühe Prostaglandin-Produktion verantwortlich ist. Mit den selektiven Cyclooxygenasehemmern Celecoxib und SC-560 war es möglich, im Tierversuch jeweils eine Isoform gezielt zu hemmen. Indem die Prostaglandin-Freisetzung nach Formalin-Injektion in die Hinterpfote im Rückenmark der Versuchstiere mittels Microdialyse untersucht wurde, konnten so die Beiträge der COX-Isoformen zur nozizeptiven Transmission bestimmt werden. Im Formalin-Test wurde der Effekt der selektiven Hemmung auf das nozizeptive Verhalten der Versuchstiere nach Formalin-Injektion beobachtet. Eine Hemmung der frühen Prostaglandinproduktion und der damit verbundenen Reduzierung nozizeptiven Verhaltens gelang nur über die Hemmung der COX-1. Der selektive COX-1 Hemmer SC-560 war dabei vergleichbar effektiv wie die unselektiv wirkenden NSAIDs. Die COX-2 ist kurz nach dem Schmerzreiz im Dorsalhorn

noch nicht exprimiert. Und es dauert einige Zeit, bis sie hochreguliert wird. Ist dies geschehen, kann eine antinozizeptive Wirkung auch mit Celecoxib beobachtet werden, wie in zahlreichen klinischen Studien gezeigt wurde, die eine vergleichbare Wirksamkeit von selektiven und nichtselektiven Cyclooxygenasehemmern feststellten.

Allerdings wurde in klinischen Studien auch beobachtet, dass die Wirkung von Celecoxib in Dosierungen, die höher waren als die zugelassenen Dosen, nachließ. In der zweiten Studie wurde versucht, für diesen Effekt einen Erklärungsansatz zu finden. Im Tierversuch konnten mit Hilfe des Zymosan-Entzündungsmodells die klinischen Beobachtungen bestätigt werden, dass bei hohen Dosen die antiinflammatorische Wirkung schwächer wird. In Zellkultur und im Rückenmarksgewebe der Versuchstiere konnten Effekte gefunden werden, die die antiinflammatorische Wirkung der Prostaglandinsynthesehemmung zum Teil wieder aufheben können. So wurde bei hohen Dosen die Expression proinflammatorischer Proteine wie TNF $\alpha$  erhöht. Der Grund für diese Überproduktion lag in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Aktivierung proinflammatorischer Gene regelt. Höhere Dosierungen von Celecoxib könnten sich somit negativ auf das Entzündungsgeschehen auswirken.

Während sich die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch hohe Dosierungen von Celecoxib für die Behandlung von Entzündungen als Nachteil erweisen könnte, kann dieser Effekt für die Behandlung von Tumoren ein Vorteil sein. In der dritten Studie sollte der molekulare Wirkmechanismus untersucht werden, der der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib zugrunde liegt. Es konnte gezeigt werden, dass Celecoxib in hohen Dosierungen in Kolontumorzellen Apoptose induzierte. Die Apoptose wird dabei durch eine Blockierung des Zellzyklus induziert. Die Expression regulativ wirkender Proteine, die den Zellzyklus inhibieren, wurde vermutlich durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflusst. In der zweiten Studie konnte schon gezeigt werden, dass Celecoxib in hohen Dosierungen NF- $\kappa$ B aktiviert.

Schon vorher war bekannt, dass die regelmäßige Einnahme von NSAIDs die Inzidenz von Kolonkarzinomen reduzieren kann. Doch wurde dieser Effekt bisher der Hemmung der COX-2 zugesprochen, weswegen für diese Indikation große Erwartungen in die selektiven COX-2-Hemmer gelegt wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der antiproliferative Effekt aber tatsächlich COX-unabhängig ist.

Viele Aussagen in den Studien konnten nur getroffen werden, weil die Konzentrationen der Wirkstoffe quantitativ bestimmt werden und die Ergebnisse so in Relation zu anderen Resultaten gesetzt werden konnten.

Für Plasmaproben wurden Assays für den Nachweis von Celecoxib mittels LC/MS/MS entwickelt, die eine wesentlich niedrigere Nachweisgrenze und kürzere Laufzeiten als schon publizierte Assays haben. Zudem gelang die valide Quantifizierung von Celecoxib und SC-560 in Microdialysaten in einem Konzentrationsbereich, der mit klassischen Detektoren nicht erreicht werden kann. In dieser Arbeit wurden die Substanzen in Microdialysaten noch bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml valide nachgewiesen. Für Celecoxib gelang die Analytik mit einer relativ schnellen isokratischen Elution. SC-560 konnte mit der entsprechenden Empfindlichkeit erst dann nachgewiesen werden, als eine etwas zeitaufwendigere Gradientenelution benutzt wurde.

In der Methodenentwicklung und auch der Validierung mussten Matrixeffekte auf die Ionisierung der Analyte berücksichtigt werden, die in der HPLC-UV keine Rolle spielen. Insbesondere bei Microdialysaten wirkte sich die Probenmatrix erheblich auf die Analytik aus, da in den isotonischen Lösungen Salze im millimolaren Bereich gelöst waren. Für den Nachweis von Substanzen aus Microdialysaten war daher eine chromatographische Abtrennung von Salzbestandteilen und Analyten unausweichlich, wodurch sich die Laufzeiten jedoch verlängerten.

Der Nachweis in den Microdialysaten gelang durch die Kombination einer chromatographischen Methode mit einer Tandem-Massenspektrometrischen Detektion. Die Analytik von Celecoxib in Plasmaproben folgte einer anderen Philosophie, die LC/MS/MS nicht als Kopplung von HPLC mit massenspektrometrischer Detektion ansieht, sondern als Massenspektrometer mit einer vorgeschalteten, flüssigchromatographischen Probenzuführung und chromatographischen „Filterung“ der Probe. Die eigentliche Trennung des Analyten von anderen Bestandteilen kann das Tandem-Massenspektrometer leisten. In den entwickelten Assays wurde nahezu völlig auf eine chromatographische Retention der Analyten verzichtet. Dadurch waren sehr kurze Laufzeiten möglich, die eine Messung von mehreren Hundert Proben innerhalb von 12 h ermöglichte.

Die Entwicklung der Methoden hat aber auch die Kehrseite eines derartigen Vorgehens gezeigt. So können Matrixeffekte eine erhebliche Rolle spielen. Für unterschiedliche Matrices können so große Schwankungen in der Ionisierung des Analyten auftreten, dass Humanplasmaproben vielleicht valide nachgewiesen werden können, Rattenplasmaproben oder Zellkulturüberstände aber nicht mehr.

In der Literatur wird das Thema Matrixeffekte mit einer gewissen Stiefmütterlichkeit behandelt. Ende der neunziger Jahre des letzten Jahrtausends war die Euphorie zur Einführung neuer, leistungsstarker und stabil laufender Tandem-Massenspektrometer vor

allem des *Sciex API 3000* und des *Waters Quattro Ultima* so groß, dass tatsächlich in vielen Laboratorien komplett auf die Chromatographie verzichtet wurde, wie z.B. für das Neonatal-Screening. Oder es wurden nur noch sehr kurze Säulen mit 15 mm Länge verwendet. Vor allem in der Industrie wird aufgrund der geforderten Umsatzraten in der Analytik ein relativ drastisches Konzept angewandt: Eine Säule von maximal 30 mm Länge mit einem Fluss zwischen 0,3 und 1 ml/min und einem steilen Gradienten von 0% organischen Anteil auf 100% innerhalb von 4-5 min. Mit einer solchen Methode lassen sich sehr viele Analyte nahezu ohne Methodenentwicklung sofort quantifizieren. Allerdings sind die Anforderungen an Sensitivität in der Industrie eher gering. Eine Nachweisgrenze von 10 ng/ml gilt als völlig ausreichend für die üblichen pharmakokinetischen Untersuchungen.

In letzter Zeit ändert sich jedoch das Verhalten. Matrix-Effekte werden zunehmend als kritischer Parameter angesehen. Die Chromatographie gewinnt wieder an Bedeutung. Interessanterweise sind bis jetzt noch keine Vorschriften von Seiten der Gesundheitsbehörden (FDA, EMEA) erlassen worden, die den massenspektrometrischen Nachweis von Substanzen regeln.

Matrixeffekte lassen sich beherrschen, wenn ein geeigneter interner Standard verwendet wird. Dies kann ein mit stabilen Isotopen markiertes Derivat des Analyten sein, ein Strukturisomer, wie für die Analytik von Celecoxib verwendet oder irgendeine andere Substanz, die aufgrund ihres Extraktions-, Retentions- und Ionisierungsverhaltens sich nicht sehr vom Analyten unterscheidet [136]. Der letzte Fall bedeutet für die Methodenentwicklung einen erheblichen Mehraufwand, der eventuell noch nicht einmal zum gewünschten Erfolg führen kann. In einem solchen Fall muss eine ausführliche Chromatographie durchgeführt werden.

Die Assays der vorliegenden Arbeit wurden auf eine möglichst niedrige Nachweisgrenze hin ausgerichtet, da gezeigt werden sollte, was mit LC/MS/MS möglich ist. Für die routinemäßige Analytik von Pharmakokinetiken sollten allerdings die Nachweisgrenzen den Erfordernissen angepasst werden, da mit den hier validierten Nachweisgrenzen meistens eine Verdünnung der Proben notwendig ist.

Für ein weiteres Vorgehen hat die Arbeit einige richtungweisende Ergebnisse geliefert. So sollte für eine möglichst stabile Analytik ein Kompromiss gefunden werden zwischen Analysezeiten und Matrixeffekten. Für eine möglichst niedrige Nachweisgrenze kann eine chromatographische Trennung von Matrix Bestandteilen und Analyten dann sinnvoll sein, wenn Matrixeffekte zu einer Suppression des Analyten-Signals führen. Eine Überprüfung der Chromatographie, am besten mit einem Full-Scan über einen breiten Massenbereich, kann

Aufklärung über Substanzen geben, die sich bei gegebenen Bedingungen ebenfalls ionisieren lassen und somit die Ionisierung des Analyten stören können.

# Material und Methoden

## 8. Allgemeine Arbeitsvorschriften

### 8.1. Tunen des API 3000 mit Turbo Ion Spray Quelle

#### 8.1.1. Darstellung des Molekülpeaks

Der Molekülpeak wird entweder in positiver oder negativer Polarität dargestellt. Dafür wird eine Lösung der entsprechenden Substanz in Acetonitril/Wasser 80:20 mit Konzentrationen von 1000, 100 und 10 ng/ml hergestellt. Mit einer Harvardpumpe wird zunächst substanzfreies Laufmittel infundiert, um eventuelle Störsignale des Lösungsmittels festzustellen. Die Lösung mit 1000 ng/ml wird bei den entsprechenden Standardeinstellungen des Turbo Ion Sprays und des Massenspektrometers mit einem Fluss von 10 µl/min infundiert. Die Standardeinstellungen sind in Tab. 8-1 zusammengefasst.

Parameter	Positiver Ionenmodus	Negativer Ionenmodus
nebulizer gas	7	7
curtain gas	5	5
Kapillarspannung	5200 V,	-4000 V
Temperatur	RT	RT
declustering potential (DP)	45	-60
focusing potential (FP)	300	-300

**Tab. 8-1:** Standardeinstellungen der Ionenquelle und des Massenspektrometers für das Tuning neuer Substanzen

Zunächst wird im Q1 Scan ein Massenbereich von  $m/z \pm 50$  um den zu erwartenden Wert des Molekülpeaks im positiven und negativen Ionenmodus aufgenommen. Sollte ein Störsignal die gleiche Masse anzeigen wie das zu untersuchende Molekül, muss das Lösungsmittel gewechselt werden, um bei der Fragmentierung ein sauberes dem Molekül einwandfrei zuzuordnendes Fragmentspektrum zu erhalten. Wenn dies keinen Erfolg hat, muss vom reinen Laufmittel und vom der Analytlösung ein Fragmentspektrum aufgenommen werden und Lösungsmittelspektrum vom anderen Spektrum subtrahiert werden, um das entsprechende Fragmentspektrum des Analyten zu erhalten.

Ist das Molekülion identifiziert, wird das Signal für zwei Minuten in einem Massenbereich von  $m/z \pm 6$  aufgenommen um ein eventuell interessantes Isotopenmuster erkennen zu können.

Anhand des TIC wird die Stabilität des Ionenstroms überprüft. Wenn das Signal ausreichend stabil ist, können die weiteren Schritte mit Hilfe des automatischen Tuning-Tools der Analyst Software durchgeführt werden.

### 8.1.2. Automatisches Tuning

Für das automatische Tuning muss das gewünschte  $m/z$ -Verhältnis, die vermutete Ionenladung und die Anzahl der zu optimierenden Fragmente festgelegt werden. Die folgenden Schritte werden von der Software automatisch durchgeführt:

Zunächst werden 10 Scans mit  $m/z \pm 3$  um die angegebene Molekülmasse im Q1-Modus aufgenommen und aufaddiert. Der intensivste Peak wird für das weitere Tuning ausgewählt. Hierbei ist darauf zu achten, dass keine Störpeaks in der Nähe vorhanden sind, die ein höheres Signal ergeben. In diesem Fall muss der zu scannende Massenbereich zuvor in engen Grenzen festgelegt werden.

Um das *declustering potential* (DP) und *focusing potential* (FP) zu optimieren wird die zuvor ermittelte Massenspur des Molekülions im *multiple ion* Modus (MI) aufgenommen. Um das Signalmaximum zu bestimmen, werden die Spannungen zuerst vom DP dann vom FP variiert. Da sich beide Einstellungen gegeneinander beeinflussen wird die Optimierung ein zweites Mal durchgeführt. Sind DP und FP auf Sensitivität optimiert wird nochmals das Molekülion im Q1 Modus mit zehn Scans aufgenommen.

Anschließend wird das Fragmentspektrum aufgenommen indem im *product ion scan* die *collision energy* (CE) verändert wird. Die intensivsten Fragmente werden automatisch ausgewählt. Für jedes dieser Fragmente wird im MRM Modus die jeweiligen CEs ermittelt. Ebenfalls im MRM wird das *collision cell exit potential* (CXP) optimiert. Die ausgewählten Fragmentpeaks werden im *product ion scan* mit 10 Scans dargestellt.

### 8.1.3. Flow Injection Analysis

Das Laufmittel wird mit einer Flussrate von 0,2 ml/min ohne analytische Säule in die Ionenquelle gefördert. Mit dem Probengeber werden permanent 10 µl einer Probe injiziert, die den Analyten im entsprechenden Laufmittel gelöst enthält. Im MRM Modus werden die gewählten Massenspuren kontinuierlich verfolgt. Die entsprechenden Einstellungen werden mit manuellem Tuning vorgenommen.

Sollen die Einstellungen der Ionenquelle optimiert werden (*nebulizer gas* (NEB), *curtain gas* (CUR), Kapillarspannung (IS)), wird vor jeder neuen Injektion ein Parameter geändert. Da

System bedingte Schwankungen auftreten können, sollten mindestens drei Injektionen abgewartet werden, um die Auswirkung der einzelnen Änderungen beurteilen zu können.

Soll das Laufmittel auf Sensitivität getestet werden, werden Proben mit den verschiedenen Laufmitteln hergestellt und mit dem jeweiligen Laufmittel injiziert. Mindestens sechs Injektionen pro Laufmittel sollten durchgeführt werden, um zuverlässige Aussagen treffen zu können.

## **8.2. Bestimmung der Extraktionswiederfindung mit LC/MS/MS**

Wird der Analyt von Matrixbestandteilen chromatographisch sauber getrennt (UV-Kontrolle) kann die Wiederfindung auf die klassische Weise bestimmt werden. Dazu werden drei verschiedenen Konzentrationen des Analyten, die den Konzentrationsbereich der Eichgeraden repräsentieren sollten, und der Interne Standard in der entsprechenden Konzentration in jeweils sechs Leerplasmaproben angesetzt und nach entsprechender Vorschrift vorbereitet und extrahiert. Die Peakflächen der Extrakte werden mit den Peakflächen von Lösungsmittelstandards des Analyten und internen Standards verglichen.

Ist keine ausreichende chromatographische Trennung gewährleistet, werden zusätzlich Leerplasmaproben extrahiert. Dazu sollte das gleiche Plasma verwendet werden, das für die Extrakte verwendet wurde. Vor dem Verblasen des organischen Lösungsmittels werden die entsprechenden Konzentrationen des Analyten und des internen Standards in Lösungsmittel zugesetzt. Die Peakflächen der extrahierten Proben werden mit den Peakflächen der nachträglich mit Standards versetzten Proben verglichen. Wird eine Proteinfällung oder eine Ultrafiltration durchgeführt, dann werden die Referenzstandards nachträglich zum Überstand oder Filtrat von Leerplasma zugegeben. Die extrahierten Proben müssen dann mit dem gleichen Volumen an dem entsprechenden Lösungsmitteln, in dem die Standards gelöst sind, versetzt werden, um sie gegenüber den Referenzstandards anzugleichen.

Auf diese Weise werden Matrixeffekte, die die Wiederfindung beeinflussen können kompensiert.

## **8.3. Bestimmung von Matrixeffekten**

Leerplasmaproben werden nach der jeweiligen Vorschrift extrahiert. Die Extrakte werden vor dem Verblasen des organischen Lösungsmittels mit Standards der jeweiligen Analyte versetzt und weiter nach Vorschrift aufgearbeitet. Zusammen mit Lösungsmittelstandards gleicher

Konzentration werden die Extrakte vermessen. Das Verhältnis der Peakflächen von Extrakten zu Lösungsmittelstandards ergibt das Ausmaß des Matrixeffektes.

## 8.4. Berechnung von Säulenparametern

Berechnung der Kapazität einer Säule

$$(Gl. 8-1) \quad k' = \frac{t_A - t_0}{t_0}$$

$t_A$ : Retentionszeit des Analyten,

$t_0$ : Totvolumenlaufzeit

Berechnung der theoretischen Böden einer Säule

$$(Gl. 8-2) \quad N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_A}{w_{1/2}} \right)^2$$

$t_A$ : Retentionszeit des Analyten,

$w_{1/2}$ : Peakbreite auf halber Peakhöhe

## 9. Materialien

### 9.1. Chemikalien

Acetonitril *gradient grade* wurde von Merck KgaA (Darmstadt) bezogen. Wasser für die HPLC wurde mit einer Millipore MilliQ Anlage aufbereitet. Für die LC/MS/MS wurde Wasser mit HPLC Qualität von Mallinckrodt Baker (Griesheim) verwendet. Sämtliche anderen Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Celecoxib wurde nach der Vorschrift von Penning et al. [148] von WISTA (Wissenschaftliche Laboratorien Adlershof, Berlin, Deutschland) synthetisiert. Der interne Standard (4-[5-phenyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide) wurde von Georg Heinkele vom Institut für klinische Pharmakologie (Dr. Margarethe Fischer-Bosch-Institut, Stuttgart, Arbeitskreis Prof. U. Klotz) analog der Vorschrift von Penning et al. synthetisiert [116]. Die Referenzsubstanzen hatten eine Reinheit von jeweils > 99%. Humanplasma (Citratplasma)

wurde bereitgestellt vom Blutspendedienst Hessen (Deutsches Rotes Kreuz, Frankfurt am Main) und am Institut durch freiwillige Spenden gewonnen (Heparin- und EDTA-Plasma)

Zusammensetzung des künstlichen Liquors (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)

115,7 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 0,9 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 2,1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O and 3,5 mM D(+)Glucose. Die Lösung wird bis zum Erreichen von pH 7,4 mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) begast.

## 9.2. Geräte

Festphasenextraktor mit 12 Steckplätzen	Supelco, Aschaffenburg
Festphasenextraktor mit 16 Steckplätzen	Machery Nagel, Düren
Verdampfer für 6 Gefäße	Supelco, Aschaffenburg
Rotationsverdampfer	GyroVap, Philip Harris (Leicestershire, UK)

## 9.3. Analysegeräte

### HPLC

Der Hersteller der HPLC-Anlagen ist, wenn nicht explizit genannt, Jasco GmbH, Gross-Umstadt

### HPLC Fluoreszenz, UV/Vis

#### **Anlage III**

Degasser	Gastorr 153 degasser
Gradienten Mischer	Jasco LG-980-02S ternary gradient unit
Pumpe	Jasco PU-1580 pump
Autosampler	Jasco AS 951 autosampler
Detektor	Jasco FP-920 fluorescence detector; Jasco UV-1575 Ultraviolet detector

### **HPLC Photo Dioden Array**

#### **Anlage IV**

---

Pumpe	Waters 510 HPLC Pump (Waters GmbH, Eschborn)
Autosampler	Waters 717plus Autosampler (Waters GmbH, Eschborn)
Detektor	Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters GmbH, Eschborn)

### **LC/MS/MS**

#### **Anlage V**

---

Degasser	Jasco DG 1580-53 Degasser
Gradienten Mischer	Jasco LG-1580-02 ternäre Gradienten Einheit
Pumpe	Jasco PU-1585 Pumpe
Autosampler	Jasco AS 1550 Autosampler
Ionenquelle	Turboionspray (Applied Biosystems Langen)
Detektor/Massen- spektrometer	PE Sciex API 3000 triple quadrupol mass spectrometer (Applied Biosystems, Langen)
Stickstoffgenerator	Whatman Stickstoffgenerator (Parker Hannifin GmbH, Kaarst, )
Kompressor	Jun Air (Kobenhaven, Danmark)

## **9.4. Bearbeitung der Messdaten**

Die Daten der Anlage III wurden mit Jasco-Borwin version 1.50. ausgewertet. Die Daten der Anlage IV mit Waters Millennium<sup>32</sup> (Waters GmbH, Eschborn) und die LC/MS/MS Daten mit Analyst 1.1 (Applied Biosystems Langen).

## 10. Applikationen

Für alle Messungen mit dem LC/MS/MS wurde ausschließlich der von Stickstoffgenerator produzierte Stickstoff verwendet. Der Stickstoff hatte eine Reinheit von > 97%.

### 10.1. Bestimmung von Celecoxib aus Human- und Rattenplasma mittels LC/MS/MS (Methode CLX-1).

Die Bestimmung wurde mit folgender Gerätekonfiguration durchgeführt:

#### Anlage V

Säule	30/2 Nucleosil 100-5 C <sub>18</sub> (Macherey-Nagel, Düren)
mobile Phase	Methanol/Wasser/NH <sub>4</sub> OH-Lösung 25% (80:20:0.1 v/v/v)
Flussrate, ml/min	0,2
Nebulizer Gas, l/min	1,23 (Setting 13)
Curtain Gas, l/min	1,08 (Setting 10)
CAD Gas, l/min	$3.7 \times 10^{-5}$ HPa (Setting 8)
Polarität	negativ
Kapillarspannung, V	-3700
Auxiliary Gas, ml/min	4500
Temperatur, °C	400

	Celecoxib		Interner Standard	
Precursor Ion, m/z	380.0		366.0	
Declustering Potential, V	-91		-86	
Focusing Potential, V	-270		-310	
Product Ion, m/z	316.1	276.2	302.1	262.0
Dwell Time	400	200	200	200
Collision Energy, eV	-32	-38	-30	-38
Collision Cell Exit Potential, V	-19	-3	-23	-1

Die Bestimmung von Celecoxib erfolgte auf der Anlage V. Als analytische Säule wurde eine Nucleosil C<sub>18</sub> Säule verwendet (30 × 2.0 mm, 5 µm Teilchengröße und 100 Å Porengröße). Die mobile Phase bestand aus Methanol/Wasser/NH<sub>4</sub>OH-Lösung 25% (80:20:0.1 v/v/v). Die

Flussrate betrug 0.2 ml/min. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und die Laufzeit war auf 4 min festgelegt. Celecoxib wurde nach 1,7 min und IS nach 1,6 min eluiert (Celecoxib  $k'=2.97$ , IS  $k'=2,80$ ).

Die TurboIon Spray Quelle arbeitete im negativen Ionenmodus bei  $-3700V$ . Der *auxiliary gas* Fluss war auf  $400^{\circ}C$  erhitzt und betrug 4500 ml/min. Das *nebulizer gas* hatte einen Fluss von 1.23 l/min, das *curtain gas* von 1.08 l/min und das *collision gas* hatte einen Druck  $3.7 \times 10^{-5}$  HPa.

### 10.1.1. Quantifizierung

Für die Quantifizierung arbeitete das Massenspektrometer im MRM Mode. Für die Quantifizierung wurden die Massenübergänge  $m/z$  380.0  $\square$  316.1 und  $m/z$  366.0  $\square$  302.1 genutzt. Die Quadrupole Q1 und Q3 waren auf *unit resolution* eingestellt.

Das Verhältnis der Peakflächen von Celecoxib und internem Standard, aufgetragen gegen die Konzentration von Celecoxib, ergab die Eichgerade.

### 10.1.2. Herstellung der Stocklösungen und der Standards

Jeweils 10 mg der Reinsubstanzen von Celecoxib und IS wurden in einem 10 ml Messkolben in Acetonitril gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösungen wurden bei  $4^{\circ}C$  gelagert und waren mindestens 6 Monate stabil. Zunächst wurde Die Stocklösung für Celecoxib zweimal mit 1:10 in Acetonitril/Wasser 50:50 v/v (100 µl:1000 µl) auf 10 µg/ml verdünnt. Daraus wurden durch Pipettierreihen in reinem Plasma die jeweiligen Standards hergestellt, mit Konzentrationen von 10 bis 1000 ng/ml (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml). Die Standardlösung vom internen Standard wurde in der Konzentration von 45 ng/ml in Acetonitril/Wasser 50:50 v/v durch eine Verdünnungsreihe hergestellt.

### 10.1.3. Extraktionsverfahren

Plasma Proben wurden mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Dazu wurden 200 µl einer Plasma Proben mit 200 µl 0,1 M Natrium Phosphatpuffer (pH 4,0) und 25 µl internem Standard versetzt, am Vortex kurz geschüttelt und 3 min bei 12.000 g zentrifugiert. Zur Extraktion wurden Chromabond C<sub>18</sub> (100 mg, 1 ml) Kartuschen verwendet (Macherey-Nagel, Düren, Germany), mit 2  $\times$  1 ml Acetonitril konditioniert und mit 2  $\times$  1 ml Wasser kalibriert. Die Probe wurde vorsichtig aufgebracht und mit 2  $\times$  1 ml Wasser gewaschen. An reduziertem Vakuum ( $-70$  kPa) wurden die Kartuschen mindestens 5 min getrocknet. Mit 2  $\times$  1 ml Dichlormethan wurde eluiert. Das Eluat wurde in Glaszentrifugenröhrchen aufgefangen und

bei  $\leq 40^\circ\text{C}$  unter leichtem Stickstoffstrom verblasen. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (85:15:0.1 v/v/v) aufgenommen und in 1ml Glasvials mit Insert pipettiert. Die aufgearbeiteten Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 10.2. Bestimmung von Celecoxib aus Humanplasma mittels LC/MS/MS (Methode CLX-2).

Die Bestimmung wurde mit folgender Gerätekonfiguration durchgeführt:

### Anlage V

Säule	30/2 Nucleosil 100-5 $\text{C}_{18}$ (Macherey-Nagel, Düren)
mobile Phase	Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (85:15:0,1 v/v/v)
Flussrate, ml/min	0,2
Nebulizer Gas, l/min	1,23 (Setting 13)
Curtain Gas, l/min	1,08 (Setting 10)
CAD Gas, l/min	$3,7 \times 10^{-5}$ HPa (Setting 8)
Polarität	negativ
Kapillarspannung, V	-3700
Auxiliary Gas, ml/min	4500
Temperatur, $^\circ\text{C}$	400

	Celecoxib		Interner Standard	
Precursor Ion, m/z	380,0		366,0	
Declustering Potential, V	-91		-86	
Focusing Potential, V	-270		-310	
Product Ion, m/z	316,1	276,2	302,1	262,0
Dwell Time	400	200	200	200
Collision Energy, eV	-32	-38	-30	-38
Collision Cell Exit Potential, V	-19	-3	-23	-1

Die Bestimmung von Celecoxib erfolgte auf der Anlage V. Als analytische Säule wurde eine Nucleosil  $\text{C}_{18}$  Säule verwendet ( $30 \times 2,0$  mm,  $5 \mu\text{m}$  Teilchengröße und  $100 \text{ \AA}$  Porengröße). Die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (85:15:0,1 v/v/v). Die Flussrate betrug  $0,2$  ml/min. Das Injektionsvolumen betrug  $10 \mu\text{l}$  und die Laufzeit war auf  $4$

min festgelegt. Celecoxib und IS wurden nach ca. 0.8 min eluiert ( $k' = 0,85$  für Celecoxib und internem Standard).

Die Turboionspray Quelle arbeitete im negativen Ionenmodus bei  $-3700\text{V}$ . Der *auxiliary gas* Fluss war auf  $400^\circ\text{C}$  erhitzt und betrug  $4500\text{ ml/min}$ . Das *nebulizer gas* hatte einen Fluss von  $1,23\text{ l/min}$ , das *curtain gas* von  $1,08\text{ l/min}$  und das *collision gas* hatte einen Druck  $3,7 \times 10^{-5}\text{ HPa}$ .

### 10.2.1. Quantifizierung

Für die Quantifizierung arbeitete das Massenspektrometer im MRM Mode. Für die Quantifizierung wurden die Massenübergänge  $m/z\ 380,0 \rightarrow 316,1$  und  $m/z\ 366,0 \rightarrow 302,1$  benutzt, die Massenübergänge  $m/z\ 380,0 \rightarrow 276,2$  und  $m/z\ 366,0 \rightarrow 262,0$  wurden zur Qualitätssicherung genutzt. Die Quadrupole Q1 und Q3 waren auf *unit resolution* eingestellt.

Das Verhältnis der Peakflächen von Celecoxib und IS, aufgetragen gegen die Konzentration von Celecoxib und mit dem Faktor  $1/x$  gewichtet, ergab die Eichgerade.

### 10.2.2. Herstellung der Stocklösungen und der Standards

Jeweils  $10\text{ mg}$  der Reinsubstanzen von Celecoxib und IS wurden in einem  $10\text{ ml}$  Messkolben in Acetonitril gelöst und auf  $10\text{ ml}$  aufgefüllt. Die Lösungen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und waren mindestens 6 Monate stabil. Zunächst wurde die Stocklösung für Celecoxib zweimal mit 1:10 in Acetonitril/Wasser 50:50 v/v ( $100\ \mu\text{l}:1000\ \mu\text{l}$ ) auf  $10\ \mu\text{g/ml}$  verdünnt. Daraus wurden durch Pipettierreihen in reinem Plasma die jeweiligen Standards hergestellt mit Konzentrationen von  $0,1$  bis  $500\text{ ng/ml}$  ( $0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0, 100,0, 250,0, 500,0\text{ ng/ml}$ ). Die Standardlösung des internen Standards wurde in der Konzentration von  $450\text{ ng/ml}$  in Acetonitril/Wasser 50:50 v/v durch eine Verdünnungsreihe hergestellt.

### 10.2.3. Plasma Extraktionsverfahren

Plasma Proben wurden mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Dazu wurden  $200\ \mu\text{l}$  einer Plasma Proben wurde mit  $200\ \mu\text{l}$   $0,1\text{ M}$  Natrium Phosphatpuffer (pH 4,0) und  $25\ \mu\text{l}$  mit internem Standard versetzt, am Vortex kurz geschüttelt und 3 min bei  $12.000\text{ g}$  zentrifugiert. Zur Extraktion wurden Chromabond  $\text{C}_{18}$  ( $100\text{ mg}, 1\text{ ml}$ ) Kartuschen verwendet (Macherey-Nagel, Düren). Mit  $2 \times 1\text{ ml}$  Acetonitril konditioniert und mit  $2 \times 1\text{ ml}$  Wasser kalibriert. Die Probe wurde vorsichtig aufgebracht und mit  $2 \times 1\text{ ml}$  Wasser gewaschen. An reduziertem Vakuum ( $-70\text{ kPa}$ ) wurden die Kartuschen mindestens  $5\text{ min}$  getrocknet. Mit  $2 \times 1\text{ ml}$

Dichlormethan wurde eluiert. Das Eluat wurde in Glaszentrifugenröhrchen aufgefangen und bei  $\leq 40^\circ\text{C}$  unter leichtem Stickstoffstrom verblasen. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (85:15:0.1 v/v/v) aufgenommen und in 1ml Glasvials mit Insert pipettiert. Die aufgearbeiteten Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 10.3. Bestimmung von Celecoxib aus Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode CLX-Microdialysat)

Die Bestimmung wurde mit folgender Gerätekonfiguration durchgeführt:

#### Anlage V

Säule	70/2 Nucleosil 100-5 $\text{C}_{18}$ (Macherey-Nagel, Düren)
mobile Phase	Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (65:25:0,1 v/v/v)
Flussrate, ml/min	0,2
Nebulizer Gas, l/min	1,23 (Setting 13)
Curtain Gas, l/min	1,08 (Setting 10)
CAD Gas, l/min	$3,7 \times 10^{-5}$ HPa (Setting 8)
Polarität	negativ
Kapillarspannung, V	-3700
Auxiliary Gas, ml/min	6000
Temperatur, $^\circ\text{C}$	500

	Celecoxib	
Precursor Ion, m/z	380,0	
Declustering Potential, V	-91	
Focusing Potential, V	-270	
Product Ion, m/z	316,1	276,2
Dwell Time	400	200
Collision Energy, eV	-32	-38
Collision Cell Exit Potential, V	-19	-3

Die Bestimmung von Celecoxib erfolgte auf der Anlage V. Als analytische Säule wurde eine Nucleosil  $\text{C}_{18}$  Säule verwendet (70 x 2,0 mm, 5  $\mu\text{m}$  Teilchengröße und 100 Å Porengröße). Die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser/ $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösung 25% (65:35:0,1 v/v/v). Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu\text{l}$  und die Laufzeit war auf 5 min festgelegt. Celecoxib wurde nach ca. 2,7 min eluiert ( $k' = 4,76$  für Celecoxib).

Die Turboionspray Quelle arbeitet im negativen Ionenmodus bei  $-3700\text{V}$ . Der *auxiliary gas* Fluss wird auf  $500^\circ\text{C}$  erhitzt und betrug  $6000\text{ ml/min}$ . Das *nebulizer gas* hat einen Fluss von  $1,23\text{ l/min}$ , das *curtain gas* von  $1,08\text{ l/min}$  und das *collision gas* hatte einen Druck  $3,7 \times 10^{-5}\text{ HPa}$ . Stickstoff (mind. 97%) wird für alle Gase benutzt.

### 10.3.1. Quantifizierung

Für die Quantifizierung arbeitete das Massenspektrometer im MRM Mode. Der Massenübergang  $m/z\ 380,0 \rightarrow 316,1$  wurde zur Quantifizierung, der Massenübergänge  $m/z\ 380,0 \rightarrow 276,2$  wurde zur Qualitätssicherung genutzt. Die Quadrupole Q1 und Q3 waren auf *unit resolution* eingestellt.

Die Peakflächen von Celecoxib, aufgetragen gegen die Konzentration von Celecoxib und gewichtet mit Faktor  $1/x$ , ergab die Eichgerade.

### 10.3.2. Herstellung der Stocklösung und der Standards

10 mg der Reinsubstanzen von Celecoxib wurde in einem 10 ml Messkolben in Acetonitril gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und war mindestens 6 Monate stabil. Zunächst wurde Die Stocklösung zweimal 1:10 in Acetonitril/Wasser 50:50 v/v ( $100\ \mu\text{l}:1000\ \mu\text{l}$ ) auf  $10\ \mu\text{g/ml}$  verdünnt. Daraus wurden durch Pipettierreihen in ACSF die jeweiligen Standards hergestellt mit Konzentrationen von 0,1 bis  $20\ \text{ng/ml}$  (0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1,0, 2,0, 5,0, 8,0, 10,0, 15,0,  $20,0\ \text{ng/ml}$ ).

### 10.3.3. Aufarbeitung der Microdialysate

Eine Aufarbeitung der Dialysate war nicht notwendig. Die Proben wurden direkt in das LC/MS/MS-System injiziert.

## 10.4. Bestimmung von SC-560 aus Microdialysaten mittels LC/MS/MS (Methode SC-560 Microdialysat)

Die Bestimmung wurde mit folgender Gerätekonfiguration durchgeführt:

### Anlage V

Säule	60/1 Reprosil-Pur ODS-3 (Dr. Maisch, Ammerndorf)	
mobile Phase	Gradient Laufmittel A: Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 30:70 v/v Laufmittel B: Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 85:15 v/v Programm:	
	Zeit, min	% Laufmittel A
	0	100
	1	100
	2	0
	3	0
	3,5	100
	10	100
Flussrate, ml/min	0,2	
Nebulizer Gas, l/min	1,23 (Setting 12)	
Curtain Gas, l/min	1,08 (Setting 10)	
CAD Gas, l/min	$3,7 \times 10^{-5}$ HPa (Setting 5)	
Polarität	Positiv	
Kapillarspannung, V	4800	
Auxiliary Gas, ml/min	5000	
Temperatur, °C	380	

	SC-560			
Precursor Ion, m/z	353.1			
Declustering Potential, V	66			
Focusing Potential, V	360			
Product Ion, m/z	104,2	258,0	132,2	137,1
Dwell Time	300	300	100	100
Collision Energy, eV	77	33	57	30
Collision Cell Exit Potential, V	8	16	10	15

Als analytische Säule wurde eine Reprosil-Pur ODS-3 verwendet (60 × 1,0 mm, 3 µm Teilchengröße und 100 Å Porengröße). Die Substanz wurde mit einem Gradienten eluiert. Dabei bestand das Laufmittel A aus Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 30:70 v/v und das Laufmittel B aus Acetonitril/2mM Ammoniumacetat 85:15 v/v. Mit 100% A wurde gestartet. Nach einer Minute wurde über eine Minute lang das Laufmittel auf 0% gefahren. Dann lief das Laufmittel B für 1 min bei 100%. Innerhalb einer halben Minute wurde wieder auf 100% Laufmittel A umgestellt. Mit 100% Laufmittel A wurde die Säule wieder für 6,5 min rekaliert.

Die Flussrate betrug 0,2 ml/min, das Injektionsvolumen 10 µl, und die Laufzeit war auf 10 min festgelegt. SC-560 wurde nach 7 min eluiert ( $k' = 3,8$ ).

Die Turboionspray Quelle arbeitete im positiven Ionenmodus bei 4800 V. Der *auxiliary gas* Fluss war auf 380°C erhitzt und betrug 5000 ml/min. Das *nebulizer gas* hatte einen Fluss von 1,23 l/min, das *curtain gas* von 1,08 l/min und das *collision gas* hatte einen Druck  $3,7 \times 10^{-5}$  HPa. Stickstoff wurde für alle Gase benutzt.

### 10.4.1. Quantifizierung

Für die Quantifizierung arbeitete das Massenspektrometer im MRM Mode. Für die Quantifizierung wurde der Massenübergang  $m/z$  353,1 → 104,2, für die Qualitätssicherung wurden die Massenübergänge  $m/z$  353,1 → 258,0, 132,2 und 137,1 genutzt. Die Quadrupole Q1 und Q3 waren auf *unit resolution* eingestellt.

Die Peakflächen von SC-560, aufgetragen gegen die Konzentration und gewichtet mit  $1/x$ , ergab die Eichgerade.

### 10.4.2. Herstellung der Stocklösungen und der Standards

10 mg der Reinsubstanz von SC-560 wurde in einem 10 ml Messkolben in Acetonitril gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C licht geschützt gelagert und war mindestens 6 Monate stabil. Zunächst wurde die Stocklösung zweimal 1:10 mit Acetonitril/Wasser 50:50 v/v (100 µl:1000 µl) auf 10 µg/ml verdünnt. Daraus wurden durch Pipettierreihen in Acetonitril/ACSF 50:50 v/v Standards von 0,5 bis 20 ng/ml hergestellt (0,5, 0,8, 1,0, 2,0, 5,0, 8,0, 10,0, 15,0 und 20,0 ng/ml).

### 10.4.3. Probenvorbereitung

Die Volumina der Microdialysate wurden mit Hilfe einer Eppendorf *Reference Pipette* 20  $\mu\text{l}$  bestimmt. Mit Acetonitril wurde 1:1 v/v aufgefüllt und kurz am Vortex geschüttelt.

## 10.5. Bestimmung von SC-560 aus Ratten- und Mäuseplasma

Die Bestimmung wird mit folgender Gerätekonfiguration durchgeführt:

### Anlage III

Säule	100/2 Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 3 $\mu$ (Phenomenex, Aschaffenburg)
mobile Phase	Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (48.5:51.5:0.1 v/v/v)
Flussrate, ml/min	0,3
Detektor:	Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Ex}}$ :228 nm, $\lambda_{\text{Em}}$ : 420 nm, Gain x10
Injektionsvolumen	50 $\mu\text{l}$

Die Bestimmung von SC-560 erfolgte auf der Anlage III. Als analytische Säule wurde eine Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl verwendet (100  $\times$  2,0 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$  Teilchengröße und 100 Å Porengröße). Die mobile Phase bestand aus Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (48.5:51.5:0.1 v/v/v). Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Das Injektionsvolumen betrug 50  $\mu\text{l}$  und die Laufzeit war auf 22 min festgelegt. SC-560 wurde nach 16 min eluiert.

Der Fluoreszenz-Detektor war mit einem *Gain x10* auf eine Anregungswellenlänge von 228 nm und eine Emissionswellenlänge von 420 nm eingestellt.

Die Proben wurden über einen Konzentrationsbereich von 10-5000 ng/ml gegen eine lineare Eichgerade ohne die Verwendung eines internen Standards quantifiziert. Die Eichgerade wurde ermittelt aus den Peakflächen, aufgetragen gegen die Konzentration.

### 10.5.1. Herstellung der Stocklösungen und der Standards

10 mg der Reinsubstanz von SC-560 wurden in einem 10 ml Messkolben in Acetonitril gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und waren mindestens 6 Monate stabil. Zunächst wurde die Stocklösung zweimal 1:10 mit Acetonitril (100  $\mu\text{l}$ :1000  $\mu\text{l}$ ) auf 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt. Daraus wurden durch Pipettierreihen in reinem Plasma die jeweiligen Standards hergestellt mit Konzentrationen von 10 bis 5000 ng/ml (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 ng/ml).

### **10.5.2. Plasma Extraktionsverfahren**

Plasma Proben wurden mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. Dazu wurden 150 µl einer Plasma Proben wurde mit 150 µl 0.1 M Natrium Phosphatpuffer (pH 3.0) am Vortex kurz geschüttelt und 3 min bei 12.000 g zentrifugiert.

Zur Extraktion wurden Chromabond C<sub>18</sub> (100 mg, 1 ml) Kartuschen verwendet (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Mit 2 × 1 ml Acetonitril konditioniert und mit 2 × 1 ml Wasser kalibriert. Die Probe wurde vorsichtig aufgebracht und mit 1 × 1 ml Wasser und 1 × 1 ml Wasser/Methanol 75:25 v/v gewaschen. An reduziertem Vakuum (- 70 kPa) wurden die Kartuschen mindestens 5 min getrocknet. Mit 2 × 1 ml Acetonitril wurde eluiert. Das Eluat wurde in Glaszentrifugenröhrchen aufgefangen und bei ≤ 40°C unter leichtem Stickstoffstrom verblasen. Der Rückstand wurde in 150 µl Laufmittel aufgenommen.

## 11. Microdialyse Experimente

### 11.1. Tiere

Für alle Versuche wurden Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzberg) eingesetzt, die ein Gewicht von 250-275 g hatten. Die Tiere hatten vor den Experimenten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Sie wurden in klimatisierten Räumen ( $24^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) mit kontrolliertem Tag/Nacht Rhythmus 12/12 h Zyklus) gehalten. Jedes Tier wurde nur zu einem Experiment verwendet. Die Versuche wurden von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

### 11.2. Microdialyse

#### 11.2.1. Geräte

Mikroinfusionspumpe	CMA 100, Axel Semrau GmbH, Sprockhövel
Heizmatte	CMA, Axel Semrau GmbH, Sprockhövel
Cuprophane Hohlfaser 0,5 mm I.D.	Hospal GmbH, Nürnberg

#### 11.2.2. Katheterimplantierung

Die Microdialyse Katheter bestanden aus einer Cuprophane Hohlfaser mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm und einem Massen *cut-off* von 40 kDa (Hospal, Nürnberg). Eine Seite der Faser wurde mit Epoxidharz an einer Polyethylenkapillare befestigt, die andere Seite mit Sekundenkleber an einer Führungsnadel. Die Ratten wurden mit Ketamin (100 mg/kg i.p., Pharmacia & Upjohn, Erlangen) und Xylazin (5 mg/kg i.p., Bayer AG, Leverkusen) zum Einleiten der Anästhesie und für die intraoperative Analgesie behandelt. Während der Implantation wurden die Ratten mit einem konstantem Fluss Isofluran (1-1,5 Vol%, Abbott, Wiesbaden) in Narkose gehalten. Mit einer kontrolliert beheizbaren Matte wurde die Körpertemperatur bei  $37^{\circ}\text{C}$  gehalten. Die Wirbelsäule wurde bei Th13±L1 freigelegt und in einem Stereotakt fixiert. In die lateralen Seiten der Wirbelkörpers L1 wurden Löcher gebohrt, durch die mit Hilfe der Führungsnadel der Katheter geführt wurde. Die Führungsnadel wurde abgeschnitten und das Ende des Katheters mit einer

Polyethylenkapillare mit Epoxidharz verbunden. Das Kathetermaterial, das sich nicht im Wirbel befand, wurde mit Epoxidharz vollständig beschichtet. Die Kapillaren wurden subkutan entlang der Wirbelsäule zum Nacken und nach außen geführt. Nach der Operation erhielten die Ratten gegen die postoperativen Schmerzen Ketamin (50 mg/kg i.p.). Die Microdialyse Experimente wurden 24 h später durchgeführt.

### **11.2.3. *In vitro* Wiederfindung von Celecoxib in Microdialysaten**

*In vitro* Microdialyse wurde durchgeführt zur Bestimmung der *in vitro*-Wiederfindung von Celecoxib im Dialysat. Ein Dialysekatheter der gleichen Länge wie im Rückenmark der Versuchstiere wurde mit einer Flussrate von 0,5 µl/min mit ACSF perfundiert während er in einer stetig gerührten Lösung mit Celecoxib lag. Die Lösung wurde hergestellt, indem Celecoxib zunächst in DMSO gelöst wurde und die Lösung dann mit ACSF verdünnt wurde (1-100 µM). Die ermittelten Konzentrationen wurden gegen die Lösungskonzentrationen aufgetragen. Die Steigung der resultierenden Geraden ergab die *in vitro* Wiederfindung. Die freie Konzentration im Gewebe wurde aus den gemessenen Dialysaten folgendermaßen durchgeführt:

$$\text{Wiederfindung}\% = 100 \cdot \frac{C_{\text{Dialysat}}}{C_{\text{Lösung}}}$$

---

# Anhang

## A. Literaturverzeichnis

1. Requirements for Initial Assay Validation and Publication in J. Chromatography B. *J Chromatogr B*, 1998, **707**, 1-2.
2. Kuhnert, N.; Hundert Jahre Aspirin® - Die Geschichte des wohl erfolgreichsten Medikaments des letzten Jahrhunderts. *Pharm Unserer Zeit*, 2000, **29**(1), 32-39.
3. Vane, J.R.; Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 1971, **231**(25), 232-235.
4. Wolfe, M.M.; Lichtenstein, D.R.; Singh, G.; Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*, 1999, **340**(24), 1888-99.
5. Singh, G.; Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med*, 1998, **105**(1B), 31S-38S.
6. Gabriel, S.E.; Jaakkimainen, L.; Bombardier, C.; Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 1991, **115**(10), 787-796.
7. Langman, M.J.S.; Weil, J.; Wainwright, P.; Lawson, D.H.; Rawlins, M.D.; Logan, R.F.; Murphy, M.; Vessey, M.P.; Colin-Jones, D.G.; Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet*, 1994, **343**(8905), 1075-1078.
8. Xie, W.L.; Chipman, J.G.; Robertson, D.L.; Erikson, R.L.; Simmons, D.L.; Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**(7), 2692-2696.
9. Masferrer, J.L. ; Zweifel ,B.S.; Manning P.T.; Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(8), 3228-3232.
10. Masferrer, J.L.; Seibert, K.; Zweifl, B.; Needleman, P.; Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(9), 3917-3921.
11. Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.L.; Isakson, P.; Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol*, 1997, **400A**, 167-170.
12. Needleman, P.; Isakson, P.C.; The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol*, 1997, **24 Suppl 49**, 6-8.

13. Fu, J.Y.; Masferrer, J.L.; Seibert, K.; Raz, A.; Needleman, P.; The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 1990, **265**(28), 16737-16740.
14. Vane, J.; Towards a better aspirin. *Nature*, 1994, **367**(6460), 215-216.
15. Vane, J.R.; Botting, R.M.; New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 1995, **44**(1), 1-10.
16. Williams, C.S.; DuBois, R.N.; Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol*, 1996, **270** (3 Pt 1), G393-G400.
17. Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L.; Isakson, P., Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(25), 12013-12017.
18. Peri, K.G.; Hardy, P.; Li, D.Y., Varma, D.R.; Chemtob, S.; Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem*, 1995, **270**(41), 24615-24620.
19. Beiche, F.; Scheuerer, S.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Goppelt-Struebe, M.; Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett*, 1996, **390**(2), 165-169.
20. Beiche, F.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Goppelt-Struebe, M.; Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res*, 1998, **47**(12), 482-487.
21. Komhoff, M.; Grone, H.J.; Klein, T.; Seyberth, H.W.; Nusing, R.M.; Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol*, 1997, **272**(4 Pt 2), F460-F468.
22. McAdam, B.F.; Catella-Lawson F.; Mardini I.A.; Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(1), 272-277.
23. Sorli, C.H.; Zhang H-J.; Armstrong M.B.; Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(4), 1788-1793.
24. Simon, L.S.; Biologic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol*, 1997, **9**(3), 178-182.
25. Hay, C.; de Belleruche, J.; Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport*, 1997, **8**(5), 1249-1251.

26. Ichitani, Y.; Shi, T.; Haeggstrom, J. Z.; Samuelsson, B.; Hokfelt, T.; Increased levels of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord after peripheral inflammation: an in situ hybridization study. *Neuroreport*, 1997, **8**(13), 2949-2952.
27. Maihofner, C.; Tegeder, I.; Euchenhofer, C.; deWitt, D.; Brune, K.; Bang, R.; Neuhuber, W.; Geisslinger, G.; Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience*, 2000, **101**(4), 1093-1108.
28. Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L.; The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol*, 1995, **114**(5), 1069-1075.
29. Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L.; Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci*, 1995, **15**(4), 2768-2776.
30. Muth-Selbach, U.S.; Tegeder, I.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology*, 1999, **91**(1), 231-239.
31. Geisslinger, G.; Muth-Selbach, U.; Coste, O.; Vetter, G.; Schrodter, A.; Schaible, H.G.; Brune, K.; Tegeder, I.; Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem*, 2000, **74**(5), 2094-2100.
32. Coleman, R.A.; Smith, W.L.; Narumiya, S.; International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 1994, **46**(2), 205-229.
33. Ushikubi, F.; Hirata, M.; Narumiya, S.; Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995, **12**(2-3), 343-359.
34. Spencer, A.G.; Woods, J.W.; Arakawa, T.; Singer, I.I.; Smith, W.L.; Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, 1998, **273**(16), 9886-9893.
35. Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J.; Ramesha, C.; Browner, M.F.; Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, 1996, **3**(11), 927-933.
36. DeWitt, D.L.; Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol*, 1999, **55**(4), 625-631.
37. Gierse, J.K.; McDonald, J.J.; Hauser, S.D.; Rangwala, S.H.; Isakson, P.C.; Seibert K.; A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem*, 1996, **271**(26), 15810-15814.

38. Guo, Q.; Wang, L.H.; Ruan, K.H.; Kulmacz, R.J.; Role of Val509 in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents. *J Biol Chem*, 1996, **271**(32), 19134-19139.
39. Silverstein, F.E.; Faich, G.; Goldstein, J.L.; Simon, L.S.; Pincus, T.; Whelton, A.; Makuch, R.; Eisen, G.; Agrawal, N.M.; Stenson, W.F.; Burr, A.M.; Zhao, W.W.; Kent, J.D.; Lefkowitz, J.B.; Verburg, K.M.; Geis, G.S.; Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama*, 2000, **284**(10), 1247-1255.
40. Bombardier, C.; Laine, L.; Reicin, A.; Shapiro, D.; Burgos-Vargas, R.; Davis, B.; Day, R.; Ferraz, M.B.; Hawkey, C.J.; Hochberg, M.C.; Kvien, T.K.; Schnitzer, T.J.; Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*, 2000, **343**(21), 1520-1528, 2 p following 1528.
41. Hunt, R.H.; Harper, S.; Callegari, P.; Yu, C.; Quan, H.; Evans, J.; James, C.; Bowen, B.; Rashid, F.; Complementary studies of the gastrointestinal safety of the cyclooxygenase-2-selective inhibitor etoricoxib. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, **17**(2), 201-210.
42. Bensen, W.; Weaver, A.; Espinoza, L.; Zhao, W.W.; Riley, W.; Paperiello, B.; Recker, D.P.; Efficacy and safety of valdecoxib in treating the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: a randomized, controlled comparison with placebo and naproxen. *Rheumatology*, 2002, **41**(9), 1008-1016.
43. Harris, S.I.; Kuss, M.; Hubbard, R.C.; Goldstein, J.L.; Upper gastrointestinal safety evaluation of parecoxib sodium, a new parenteral cyclooxygenase-2-specific inhibitor, compared with ketorolac, naproxen, and placebo. *Clin Ther*, 2001, **23**(9), 1422-1428.
44. Kalgutkar, A.S.; Kozak, K.R.; Crews, C.; Hochgesang Jr., G.P.; Marnett, J.; Covalent modification of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 2-acetoxyphenyl alkyl sulfides, a new class of selective COX-2 inactivators. *J Med Chem*, 1998, **41**(24), 4800-4818.
45. Dannhardt, G.; Laufer, S.; Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore? *Curr Med Chem*, 2000, **7**(11), 1101-1112.
46. Kurumbail, R.G.; Stevens, A.M.; Gierse, J.K.; McDonald, J.J.; Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 1996, **384**(6610), 644-648.
47. Lanzo, C.A.; Beecham, J.M.; Tally, J.; Marnett, L.J.; Investigation of the binding of isoform-selective inhibitors to prostaglandin endoperoxide synthases using fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 1998, **37**(1), 217-226.
48. Walker, M.C.; Kurumbail, R.G.; Kiefer, J.R.; Moreland, K.T.; Koboldt, C.M.; Isakson, P.C.; Seibert, K.; Gierse, J.K.; A three-step kinetic mechanism for selective

- inhibition of cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochem J*, 2001, **357**(Pt 3), 709-718.
49. Langenbach, R.; Morham, S.G.; Tiano, H.F.; Loftin, C.D.; Ghanayem, B.I.; Chulada, P.C.; Mahler, J.F.; Lee, C.A.; Goulding, E.H.; Kluckman, K.D.; et al.; Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, 1995, **83**(3), 483-492.
  50. Wallace J.L.; McKnight W.; Reuter B.K.; Vergnolle N.; NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology*, 2000, **119**(3), 706-714.
  51. *SCRIPTS*, 2002, **2767**(July 31th), 2.
  52. Juni, P.; Rutjes, A.W.; Dieppe, P.A.; Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? *Bmj*, 2002, **324**(7349), 1287-1288.
  53. Wallace, J.L.; Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? *Trends Pharmacol Sci*, 1999, **20**(1), 4-6.
  54. *SCRIPTS*, 2002, **2767**(July 26th), 2.
  55. *SCRIPTS*, 2002, **2767**(July 26th), 3.
  56. Schmidt, H.; Geisslinger, G.; Wirkungen und Nebenwirkungen der Coxibe. *Pharm. Unserer Zeit*, 2002, **31**(2), 180-187.
  57. Tegeder, I.; Pfeilschifter, J.; Geisslinger, G.; Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J*, 2001, **15**(12), 2057-2072.
  58. Grösch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.; COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J*, 2001, **15**(14), 2742-2744.
  59. Brueggemeier, R.W.; Quinn, A.L.; Parrett, M.L.; Joarder, F.S.; Harris, R.E.; Robertson, F.M.; Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett*, 1999, **140**(1-2), 27-35.
  60. Kawamori, T.; Rao, C.V.; Seibert, K.; Reddy, B.S.; Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 1998, **58**(3): 409-412.
  61. Ristimäki, A.; Honkanen, N.; Jankala, H.; Sipponen, P.; Harkonen, M.; Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res*, 1997, **57**(7), 1276-1280.
  62. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M.; *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 229.

63. Kleta, R.; Basoglu, C.; Kuwertz-Broking, E.; New treatment options for Bartter's syndrome. *N Engl J Med*, 2000, **343**(9), 661-662.
64. Gibb, W.; M. Sun, M.; Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. *J Endocrinol*, 1996, **150**(3), 497-503.
65. Yamashita, M.; Fenn, J.B.; Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem*, 1984, **88**(20), 4451-4459.
66. Yamashita, M.; Fenn, J.B.; Negative ion production with the electrospray ion source. *J Phys Chem*, 1984, **88**(20), 4671-4675.
67. Alexandrov, M.L.; Gall, L. N.; Krasnov, N. V.; Nikolaev, V. I.; Pavlenko, V. A.; Shkurov, V. A.;, *J Anal Chem USSR*, 1985, 1227-1236.
68. Fuerstenau, S.D.; Benner, W.H.; Thomas, J.J.; Brugidou, C.; Bothner, B.; Siuzdak, G.; Mass Spectrometry of an Intact Virus. *Angew Chem*, 2001, **113**(3), 560-562.
69. Goodrace, R.; Heald, J.K.; Kell, B.; Chracterisation of Intact Microorganisms Using Electrospray Ionisation Mass spectrometry. *FEMS Microbiol Letters*, 1999, **176**, 17-24.
70. Taylor, G.; Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc Roy Soc A*, 1964, **280**, 383-397.
71. Blades, A.T.; Ikonomou, M.G.; Kebarle, P.; Investigations of the Electrospray Interface for Liquid ChromatographyIMass Spectrometry. *Anal Chem*, 1990, **62**(9), 957.
72. Bell, M.; *Taylor Cones and Electrosprays: a potential technique for creating new monodisperse colloids*. in *The 1998 NSF REU summer program At the Ohio Sate University Dept. of Physics*. 1998.
73. Kebarle, P.; Peschke, M.; On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal Chim Acta*, 2000. **406**(1): 11-35.
74. Kebarle, P.; Ho, Y.; *On the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry*, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, R.B. Cole, Editor. 1997, Wiley-Interscience, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim. p. 3-64.
75. Dülcks, T.; Juraschek, R.; Electrospray as an Ionization Method for Mass Spectrometry. *J Aerosol Sci*, 1999, **30**(7), 927-943.
76. Blades, A.T.; Ikonomou, M.G.; Kebarle, P.; Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Anal Chem*, 1991, **63**(19), 2109-2114.

- 
77. Tang, L.; Kebarle, P.; Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 1991, **63**(23), 2709-2715.
  78. Van Berkel, V.J. ; *The Electrolytic Nature of Electrospray*, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, R.B. Cole, Editor. 1997, Wiley-Interscience, Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 65-106.
  79. Lord Rayleigh, J.W.S.; *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and- Journal*, 1882, **5. Ser.**, 184-186.
  80. Gomez, A.; Tang, K.; Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids*, 1994, **6**(1), 404-414.
  81. Hager, D.B.; Dovichi, N.J.; Klassen, J.; Kebarle, P.; Droplet Electrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 1994. **66**(22), 3944-3949.
  82. Kebarle, P.; Tang, L.; From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 1993, **65**(22), 972-986.
  83. Thomson, B.A.; Iribarne, J.V.; Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys*, 1979, **71**(11), 4451-4463.
  84. Wang, G.; Cole; R.B.; Solvation Energy and Gas-Phase Stability Influences on Alkali Metal Cluster Ion Formation in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 1998, **70**(5), 873-881.
  85. Wang, G.; Cole; R.B.; Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in ESI. *Anal Chim Acta*, 2000, **406**(1), 53-65.
  86. Wang, G.; Cole; R.B.; *Org Mass Spectrom*, 1994, **29**, 419-427.
  87. Le Blanc, J.C.Y.; Wang, J.; Guevremont, R.; Siu, K.W.M.; *Org Mass Spectrom*, 1994, **29**, 587-593.
  88. Kelly, M.A.; Vestling, M.M.; Fenselau, C.C.; Smith, P.B.; *Org Mass Spectrom*, 1992, **27**, 1143-1147.
  89. Mansoori, B.A.; Volmer D.A.; Boyd, R.K.; Wrong-way-round Electrospray Ionization of Amino Acids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, **11**(10), 1120-1130.
  90. Sannes-Lowery, K.A.; Mack, D.P.; Hu, P.; Mei, H.-Y.; Loo J.A.; Positive Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1997, **8**(1), 90-95.
  91. Smith, R.W. in *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, 901. 1995.
-

92. Niessen, W.M.A.; Advances in Instrumentation in Liquid Chromatography-Mass spectrometry and related Liquid-Introduction Techniques. *J Chromatogr A*, 1998, **794**, 407-435.
93. Bruins, A.P.; Covey, T.R.; Henion, J.D.; Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 1987, **59**(22), 2642-2646.
94. Smith, R.D.; Loo, J.A.; Edmonds, C.G.; Barinaga, C.J.; Udseth, H.R.; Collisional activation and collision-activated dissociation of large multiply charged polypeptides and proteins produced by electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1990, **1**, 53.
95. Bruins, A.P., Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. *J Chromatogr A*, 1998, **794**, 345-357.
96. Schmidt, A., Untersuchungen des Elektrosprayionisierungsprozesses zum massenspektrometrischen Nachweis nicht-kovalenter Komplexe., in Fachbereich Chemie. 2000, Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt am Main.
97. Lehmann, W.D. ; *Massenspektrometrie in der Biochemie*. 1996, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verlag,.
98. Yost, R.A.; Fetterolf, D.; Tandem Mass spectrometry (MS/MS) instrumentation. *Mass Spectro. Rev*, 1983, **2**, 1-45.
99. Johnson, D.W.; A rapid screening procedure for the diagnosis of peroxisomal disorders: quantification of very electrospray tandem mass spectrometry. *J Inherit Meta Dis*, 2000, **23**(5), 475-486.
100. Morris, M.; Thibault, P.; Boyd, R.K.; J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1994, **5**, 1042.
101. Douglas, D.J.; French, J.B.; J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1992, **3**, 398.
102. Thomson, B.; Jolliffe, C.; Javahery, R. in *Proc. 44th ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics*. 1996. Portland, USA.
103. Javahery , G.; Thomson, B.; *J Am Soc. Mass Spectrom*, 1997, **8**, 697.
104. Rose, M.J.; Woolf, E.J.; Matuszewski, B.K.; Determination of celecoxib in human plasma by normal-phase high-performance liquid chromatography with column switching and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B*, 2000, **738**(2), 377-85.
105. Abdel-Hamid, M.; Novotny, L.; Hamza, H.; Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of celecoxib in plasma using single-ion monitoring and its use in clinical pharmacokinetics. *J Chromatogr B*, 2001, **753**(2), 401-8.

106. Zhang, J.Y.; Wang, Y.; Dudkowski, C.; Yang, D.; Chang, M.; Yuan, J.; Paulson, S.K.; Breau, A.P.; Characterization of metabolites of Celecoxib in rabbits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2000, **35**(11), 1259-70.
107. Bender, J.; van den Elshout, J.; Selinger, K.; Broeders, G.; Dankers, J.; van der Heiden, C.; Determination of remifentanyl in human heparinized whole blood by tandem mass spectrometry with short-column separation. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, **21**, 559-567.
108. Administration, F.a.D., C.f.D.E.a.R. (CDER), and C.f.V.M. (CVM), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, 2001.
109. Bräutigam, L.; Vetter, G.; Tegeder, I.; Heinkele, G.; Geisslinger, G.; Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B*, 2001, **761**, 203–212.
110. Bogusz, M.J.; Maier, R.-D.; Schiwy-Bochat, K.H.; Kohls, U.; Applicability of various brands of mixed-phase extraction columns for opiate extraction from blood and serum. *J Chromatogr B*, 1996, **683**, 177-188.
111. Bonfiglio, R.; King, R.C.; Olah, T.V.; Merkle, K.; The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compound. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, **13**, 1175-1185.
112. Tegeder, I.; Niederberger, E.; Vetter, G.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.; Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E(2) release in the spinal cord. *J Neurochem*, 2001, **79**(4), 777-786.
113. Niederberger, E.; Tegeder, I.; Vetter, G.; Schmidtko, A.; Schmidt, H.; Euchenhofer, C.; Bräutigam, L.; Grösch, S.; Geisslinger, G.; Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *Faseb J*, 2001, **15**(9), 1622-1624.
114. Muth-Selbach, U.S.; Tegeder, I.; Brune, K.; Geisslinger, G.; Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology*, 1999, **91**(1), 231-239.
115. Geisslinger, G.; Muth-Selbach, U.; Coste, O.; Vetter, G.; Schrödter, A.; Schaible, H.-G.; Brune, K.; Tegeder, I.; Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem*, 2000, **74**(5), 2094-2100.
116. Penning, T.D.; Talley, J.J.; Bertenshaw, S.R.; Carter, J.S.; Collins, P.W.; Docter, S.; Graneto, M.J.; Lee, L.F.; Malecha, J.W.; Miyashiro, J.M.; Rogers, R.S.; Rogier, D.J.; Yu, S.S.; Anderson, G.D.; Burton, E.G.; Cogburn, J.N.; Gregory, S.A.; Koboldt, C.M.; Perkins, W.E.; Seibert, K.; Veenhuizen, A.W.; Zhang, Y.Y.; Isakson, P.C.; Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)., *J Med Chem*, 1997, **40**, 1347-1365.

117. Ferreira S.H.; Lorenzetti, B.B.; Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. *Inflamm Res*, 1996, **45**, 499-502.
118. Minami, T.; Okuda-Ashitaka, E.; Hori, Y.; Sakuma, S.; Sugimoto, T.; Sakimura, K.; Mishina, M.; Ito, S.; Involvement of primary afferent C-fibres in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2. *Eur J Neurosci*, 1999, **11**, 1849-1856.
119. Dubuisson, D.; Dennis, S.G.; The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977, **4**, 161-174.
120. Euchenhofer, C.; Maihofner, C.; Brune, K.; Tegeder, I.; Geisslinger, G.; Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neurosci Lett.* , 1998, **248**, 25-28.
121. Malmberg, A. B.; Yaksh. T.L.; Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, **263**, 136-146.
122. Smith C.J.; Zhang, Y.; Koboldt. C.M.; Muhammad, J.; Zweifel, B.S.; Shaffer, A.; Talley, J.J.; Masferrer, J.L.; Seiben, K.; Isakson, P.C.; Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Nat. Acad Sci U S A*, 1998, **95**, 13313-13318.
123. McCormack, K.; The spinal actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the dissociation between their anti-inflammatory and analgesic effects. *Drugs*, 1994, **47** Suppl 5, 28-45.
124. Zhao, S. Z.; McMillen, J. I.; Markenson, J. A.; Dedhiya, S. D.; Zhao, W. W.; Osterhaus, J. T., Yu, S. S., Evaluation of the functional status aspects of health-related quality of life of patients with osteoarthritis treated with celecoxib. *Pharmacotherapy*, 1999, **19**, 1269-1278
125. Simon, L. S.; Lanza, F. L.; Lipsky, P. E.; Hubbard, R. C.; Talwalker, S; Schwartz, B. D.; Isakson, P. C.; Geis, G. S.; Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum*, 1998, **41**, 1591-1602.
126. Simon, L. S.; Weaver, A. L.; Graham, D. Y.; Kivitz, A. J.; Lipsky. P. E.; Hubbard. R. C.; Isakson. P. C.; Verburg, K. M.; Yu. S. S.; Zhao, W. W.; Geis, C. S.; Antiinflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Jama* , 1999, **282**, 1921-1928.
127. Meller, S. T.; Gebhart, G. F.; Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain*, 1997, **1**, 43-52.

- 
128. Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R.; Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**, 131-138
129. Steinbach G.; Lynch, P.M.; Phillips, R.K.; Wallace, M.H.; Hawk, E.; Gordon, G.B.; Wakabayashi, N.; Saunders, B.; Shen, Y.; Fujimura, T.; Su, L.K.; Levin, B.; The Effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis, *N Engl J Med*, 2000, **342**, 1946-1952.
130. Hsu, A.L.; Ching, T.T.; Wang, D.S.; Song, X.; Rangnekar, V.M.; Chen, C.S.; The Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independent of Bcl-2, *J Biol Chem*, 2000, **275**, 11397-11403.
131. Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsujii, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, R.N.; Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998, **93**, 705-716.
132. Smalley, W.E., DuBois, R.N., Colorectal cancer and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Adv Pharmacol*, 1997, **39**, 1-20.
133. Smalley, W.E.; Ray, W.A.; Dougherty, J.; Griffin, M.R.; Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: A population-based study. *Arch Intern Med*, 1999, **159**, 161-166.
134. Bak, A.W.; McKnight, W.L.; Li, P.; Del Soldato, O.; Calignano, A.; Cirino, G.; Wallace, J.L.; Cyclooxygenase-independent chemoprevention with an aspirin derivative in a rat model of colonic adenocarcinoma. *Life Sci*, 1998, **62**, L367-373.
136. Bräutigam, L.; Nefflen, J.U.; Geisslinger, G.; Determination of etoricoxib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionisation, *J Chromtogr B*, 2003, **788**, 309-315.
137. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Korting, M.; *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 229.
138. Aisen, P.S.; Schäfer, K.A.; Grundman, M.; Pfeiffer, E.; Sano, M.; Davis, K.L.; Farlow, M.R.; Jin, S.; Thomas, R.G.; Thal, L.J.; Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003, **289**, 2819-2826.
139. National PBM Drug Monograph Valdecoxib (Bextra®) VHA Pharmacy Benefits Management Strategic Healthcare Group and the Medical Advisory Panel, November 2002
140. Produktmonographie CPMP/1167/02, EMEA 2002
141. Product information: Vioxx, rofecoxib, Merck & Co, Inc. West Point, PA 5/99.

142. Product information: Celebrex, celecoxib, Searle-Pfizer Pharmaceuticals. Chicago, IL 12/98.
143. Product information: Bextra, valdecoxib, Pharmacia-Pfizer Pharmaceuticals, Chicago, IL 2/02.
144. Product information: Vioxx, rofecoxib, Merck & Co, Inc. West Point, PA 7/03.

## B. Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ACSF	Artificial Cerebrospinal Fluid, Künstlicher Liquor
AmAc	Ammoniumacetatpuffer
C <sub>18</sub>	Octadecyl- (C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> )
C <sub>8</sub>	Octyl- (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )
CAD	Collision activated Dissociation
CE	Collision Energy (eV)
CEM	Channel Electron Multiplier
CID	Collision Induced Dissociation
cps	Counts per second
CXP	Cell Exit Potential (V)
CYP	Cytochrom P-450
DP	Declustering Potential (V)
EIA	Enzyme Immuno Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtAc	Ethylacetat
FIA	Flow Injection Analysis
FP	Focussing Potential (V)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intravenös
IP	Ionization Potential (V)
<i>k'</i>	Kapazität einer chromatographischen Säule
Kp.	Kondensationspunkt
LC/MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
<i>N</i>	Anzahl der Theoretischen Böden einer Säule
NEB	Nebulizer Gas
PP	Pophatpuffer
R	Resolution
RP	Reversed Phase
SD	Standard Deviation (Standard Abweichung)
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Solid Phse Extraction ; Festphasenextraktion
SPE	Solid Phase Extraction
T	Temperatur °C
TIC	Total Ion Current
v/v	Volumenverhältnisse
<i>w</i> <sub>1/2</sub>	Peakbreite auf halber Peakhöhe

## C. Publikationsliste

Bräutigam L.; Nefflen J.U.; Geisslinger G.;  
Determination of etoricoxib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionisation.  
*J Chromatogr B*. 2003 ,**788**(2),309-315.

Tegeder, I.; Bräutigam, L.; Seegel, M.; Al-Dam, A.; Turowski, B.; Geisslinger, G.; Kovacs, A.F.;  
Cisplatin tumor concentrations after intra-arterial cisplatin infusion or embolization in patients with oral cancer.  
*Clin Pharmacol Ther*. 2003, **73**(5), 417-426.

Kämpfer, H.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.; Pfeilschifter, J.; Frank, S.; Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair.  
*J Invest Dermatol*. 2003, **120**(5), 880-890.

Grundmann-Kollmann, M.; Podda, M.; Brautigam, L.; Hardt-Weinelt, K.; Ludwig, R.J.; Geisslinger, G.; Kaufmann, R.; Tegeder, I.;  
Spatial distribution of 8-methoxypsoralen penetration into human skin after systemic or topical administration. *Br J Clin Pharmacol*, 2002, **54**(5), 535-539.

Tegeder, I.; Schmidtko, A.; Brautigam, L.; Kirschbaum, A.; Geisslinger, G.; Lötsch, J.;  
Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2002, **71**(5), 325-333.

Tegeder, I.; Bräutigam, L.; Podda, M.; Meier, S.; Kaufmann, R.; Geisslinger, G.; Grundmann-Kollmann, M.;  
Time course of 8-methoxypsoralen concentrations in skin and plasma after topical (bath and cream) and oral administration of 8-methoxypsoralen.  
*Clin Pharmacol Ther*, 2002, **71**(3),153-61.

Bräutigam, L.; Vetter, G.; Tegeder, I.; Heinkele, G.; Geisslinger, G.;  
Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry.  
*J Chromatogr B*, 2001,,**761**(2), 203-212.

Tegeder, I.; Niederberger, E.; Vetter, G.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.;  
Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E(2) release in the spinal cord.  
*J Neurochem*, 2001, **79**(4), 777-786.

Franzen, R.; Pautz, A.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.; Pfeilschifter, J.; Huwiler, A.;  
Interleukin-1beta induces chronic activation and de novo synthesis of neutral ceramidase in renal mesangial cells.  
*J Biol Chem*, 2001, 276(38), 35382-35389.

Grösch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Bräutigam, L.; Geisslinger, G.;  
COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer  
cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib.  
*FASEB J*, 2001, 15(14), 2742-2744.

Niederberger, E.; Tegeder, I.; Vetter, G.; Schmidtko, A.; Schmidt, H.; Euchenhofer, C.;  
Bräutigam, L.; Grosch, S.; Geisslinger, G.;  
Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation  
of NF-kappaB.  
*FASEB J*, 2001, 15(9), 1622-1624.

Grothusen, A.; Hardt, J., Bräutigam, L.; Lang, D.; Böcker, R.;  
A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and  
flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes.  
*Arch Toxicol*, 1996, 71(1-2), 64-71.

## D. Lebenslauf

Lutz Bräutigam  
Wolfenäcker Str. 35A  
91334 Hemhofen

---

Geburtsdatum:	04.04.1968
Geburtsort:	Lüneburg
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Ausbildung

---

1978 - 1987	Gymnasium, Johanneum Lüneburg
Mai – September 1989	Studium der Theaterwissenschaft an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
Oktober 1989 – August 1995	Diplomstudium Chemie Universität Erlangen
Oktober 1993 – März 1994	Imperial College, London, ERASMUS
Januar 1995	Chemie Diplom-Hauptprüfung
Februar – August 1995	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Erlangen, Arbeitsgruppe, Prof. Dr. Ronald Böcker, <i>„RP-HPLC-Analytik und Untersuchungen zum Metabolismus In-vitro von Methimazol durch Flavinhaltige Monooxygenasen“</i>
April 1998 – März 1999	Gasthörer für BWL an der Fernuniversität Hagen
Februar 2000 – Dezember 2002	Doktorarbeit am <i>pharmazentrum frankfurt</i> , Institut für klinische Pharmakologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger <i>„Analytik und pharmakologische Effekte selektiver Cyclooxygenase Inhibitoren“</i>

---

**Praktika**

1989	Regiehospitanz am Ernst-Deutsch Theater in Hamburg Beteiligung an einer studentischen Theaterproduktion in Erlangen
August – Oktober 1992	Werkstudent bei Siemens im Forschungszentrum Erlangen
1991 – 1993	Fachschaft Chemie
August - Oktober 1995	Betreuung des Nebenfachpraktikums Toxikologie für Naturwissenschaftler am Lehrstuhl für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Erlangen

**Beruflicher Werdegang**

Januar 1996 – März 1999	Pharmaberater im Praxis-Außendienst der ASTA Medica AG
Januar – März 1999	Trainings- und Fortbildungsbeauftragter
Mai 1999 – Dezember 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im <i>pharmazentrum frankfurt</i>

**Bundeswehr und Zivildienst**

Juli – September 1987	Wehrdienstgrundausbildung in Lüneburg
Oktober 1987 – Februar 1989	Zivildienst im Rettungsdienst des Roten Kreuzes in Peine

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation

„ *Analytik und pharmakologische Effekte selektiver Cyclooxygenase Inhibitoren* “  
selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 01.10. 2003

(Lutz Bräutigam)