

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Rechtsmedizin
Institut für Forensische Toxikologie
Leiter Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. G. Kauert

Effekte von Alkohol auf die Pharmakokinetik von Methylphenidat bei kombinierter Aufnahme

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Michaela Köhm
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: PD Dr. S. Tönnies
Koreferent: Prof. Dr. J. Lötsch

Datum der Disputation: 20.04.2010

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. G. Kauert im Institut für Forensische Toxikologie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main von September 2006 bis November 2008.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINER TEIL	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Definition und Klassifikation des ADHS	2
1.2.1	Ätiologie des ADHS	2
1.2.2	Strukturelle und funktionelle zerebrale Korrelate zu den Entstehungstheorien	3
1.2.3	Diagnostik und Differenzialdiagnostik des ADHS	4
1.2.4	Epidemiologie des ADHS	5
1.2.5	Verlauf und Prognose des ADHS	5
1.2.6	ADHS im Erwachsenenalter	6
1.2.7	Therapie der ADHS	6
1.3	Methylphenidat	8
1.3.1	Chemische Eigenschaften	8
1.3.2	Pharmakodynamik	10
1.3.3	Metabolismus	12
1.3.4	Pharmakokinetik	14
1.3.5	Abhängigkeit der Pharmakokinetik von der Enantiomerstruktur	15
1.3.6	Abhängigkeit der Pharmakokinetik vom Geschlecht	16
1.3.7	Toxikologie und Überdosierung	16
1.3.8	Interaktionen	17
1.3.9	Interaktion mit Alkohol	17
1.3.10	Beobachtungen zur Interaktion zwischen Kokain und Alkohol	18
1.4	Problemstellung	20
2	EXPERIMENTELLER TEIL	23
2.1	Geräte und Chemikalien	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Chemikalien	24
2.1.2.1	Standardlösungen	25
2.1.2.1.1	Herstellung der Methylphenidat-Lösung	25
2.1.2.1.2	Herstellung der Ritalinsäure-Lösung	25
2.1.2.1.3	Herstellung der Ethylphenidat-Lösung	25
2.1.2.1.4	Herstellung des Internen Standards	26
2.1.2.2	Sonstige Chemikalien	27

2.1.2.2.1	Herstellung des Phosphat-Puffers	27
2.1.2.2.2	Herstellung der gesättigten Natriumfluorid-Lösung	27
2.1.2.2.3	Herstellung von basischem Extraktionsmittel	27
2.1.2.2.4	Silanisieren der Reagenzgläser	28
2.1.3	Biologische Proben	28
2.1.3.1	Humane Leber	28
2.1.3.2	Serumproben	28
2.1.4	Statistische Auswertung	28
2.1.4.1	Pharmakokinetische Parameter	29
2.2	Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat	30
2.2.1	Herstellung von Leberhomogenat	30
2.2.2	Inkubation über 4 Stunden	31
2.2.3	Inkubation über 30 Minuten	32
2.2.4	Validierung des Leberinkubationsversuchs	33
2.2.5	Inkubation ohne Leberhomogenat	33
2.2.6	Inkubation in Leberhomogenat ohne Methylphenidat	34
2.2.7	Inkubation mit Enzymhemmung durch Natriumfluorid	34
2.2.8	Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Kokain	35
2.2.9	Inkubationen mit Variation der Ethanolkonzentration	35
2.2.10	Inkubationen mit Variation der Methylphenidatkonzentration	35
2.3	Inkubationsversuche in humanem Serum	36
2.3.1	Inkubation über 4 h	36
2.3.2	Inkubation über 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen	36
2.3.2.1	Inkubation unter Standardbedingungen in Phosphat-Puffer	37
2.3.2.2	Inkubation unter Standardbedingungen	37
2.3.2.3	Inkubation mit Natriumfluoridhemmung	37
2.4	Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz	37
2.4.1	Gesetzliche Voraussetzung und Antragstellung	38
2.4.2	Aufbau und Zielsetzung der Probandenstudie	40
2.4.3	Rekrutierung der Probanden und Probandenkollektiv	40
2.4.4	Geplanter Ablauf der Studientage	42
2.4.5	Bearbeitung von Serumproben	43
2.4.6	Evaluierung der Serumproben	43
2.4.7	Validierung der neu entwickelten analytischen Methode	44
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat	47
3.1.1	Inkubation über 4 Stunden	47

3.1.2	Inkubation über 30 Minuten	48
3.1.3	Validierung des Leberinkubationsversuchs	49
3.1.4	Inkubation ohne Leberhomogenat bzw. mit Leberhomogenat, aber ohne Methylphenidat	50
3.1.5	Inkubation mit Enzymhemmung durch Natriumfluorid	51
3.1.6	Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Kokain	53
3.1.7	Inkubationen mit Variation der Ethanolkonzentration	55
3.1.8	Inkubationen mit Variation der Methylphenidatkonzentration	56
3.2	Inkubation in humanem Serum	57
3.2.1	Inkubation über 4 Stunden	57
3.2.2	Inkubation über 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen	58
3.3	Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz	60
3.3.1	Validierung der neu entwickelten analytischen Methode	60
3.3.2	Auswertung der Blutalkoholkonzentrationen der Probanden	65
3.3.3	Evaluierung der Serumproben	66
3.3.3.1	TH 01-07	67
3.3.3.1.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	67
3.3.3.1.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	68
3.3.3.2	FM 04-07	70
3.3.3.2.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	70
3.3.3.2.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	71
3.3.3.3	CD 05-07	72
3.3.3.3.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	72
3.3.3.3.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	73
3.3.3.4	ST 07-07	74
3.3.3.4.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	74
3.3.3.4.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	75
3.3.3.5	DP 09-07	77
3.3.3.5.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	77
3.3.3.5.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	78
3.3.3.6	AM 10-07	79
3.3.3.6.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	79
3.3.3.6.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	80
3.3.3.7	DD 13-07	82
3.3.3.7.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	82
3.3.3.7.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	83
3.3.3.8	CS 14-07	84
3.3.3.8.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	84
3.3.3.8.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	85
3.3.3.9	SN 18-07	86
3.3.3.9.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	86

3.3.3.9.2	Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven	87
3.3.4	Pharmakokinetische Auswertung	89
3.3.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse	97
4	DISKUSSION	101
4.1	Inkubation in humanem Leberhomogenat	101
4.2	Inkubation in humanem Serum	104
4.3	Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz	105
4.3.1	Auswertung der Safety-Parameter und BAK	107
4.3.2	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter	108
4.3.2.1	Pharmakokinetik von TH 01-07	109
4.3.2.2	Pharmakokinetik von Methylphenidat	111
4.3.2.3	Pharmakokinetik von Ritalinsäure	113
4.3.2.4	Pharmakokinetik von Ethylphenidat	115
4.3.3	Pharmadynamik von Ethylphenidat	116
4.4	Analogie zu Kokain	118
4.5	Authentische Fälle in der Toxikologie	120
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	ABSTRACT	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	127

1 ALLGEMEINER TEIL

1.1 Einleitung

Methylphenidat ist das Medikament der ersten Wahl zur Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndroms (ADHS) im Kindes- und Jugendalter. Auch in der Behandlung von Erwachsenen, die seit der Kindheit unter ADHS leiden, wird es immer häufiger eingesetzt (Searight et al. 2000). Methylphenidat ist ein dem Amphetamin ähnlicher Stoff, der durch die Blockade des Dopamin- und des Noradrenalin-Transporters den Reuptake von Dopamin und Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt hemmt. Außerdem ist Methylphenidat zur medikamentösen Therapie von Narkolepsie im Erwachsenenalter zugelassen.

Obwohl bekannt ist, dass eine pharmakokinetische Wechselwirkung zwischen Methylphenidat und Alkohol besteht, wurde die Interaktion der kombinierten Einnahme beider Substanzen bisher nicht ausreichend untersucht. In den USA wurde 1999 in zwei Fällen der Überdosierung von Methylphenidat und gleichzeitigem Alkoholkonsum neben den bekannten Abbauprodukten Ritalinsäure, p-Hydroxymethylphenidat u.a. ein neuer aktiver Metabolit, das Ethylphenidat, gefunden (Markowitz et al. 1999). Analog zu den Versuchen bei gleichzeitiger Einnahme von Kokain und Alkohol, wird eine Metabolisierung von Methylphenidat zu Ethylphenidat durch eine Carboxylesterase in der Leber angenommen (Boyer, Petersen 1992). In einer darauffolgenden Studie wurden in Blutplasma und Urinproben Methylphenidat naiver Probanden, die Methylphenidat (20 mg) 30 Minuten vor Alkohol (0,6 Promille) konsumierten, die pharmakokinetischen Eigenschaften des Methylphenidats, des gebildeten Ethylphenidats und des regulären primären Abbauprodukts Ritalinsäure bestimmt (Markowitz et al. 2000). Dabei wurde aber nicht beachtet, in wie weit sich das Verhältnis von Ethylphenidat zu Methylphenidat und dessen Abbauprodukten ändert, sollte die Einnahmehereihenfolge der Prüfsubstanzen Methylphenidat und Ethanol variiert werden. Von Kokain ist bekannt, dass sich bei Veränderung der Einnahmehereihenfolge von Kokain und Ethanol Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Analyte Kokain, Kokaethylen und Benzoyllecgonin ändern (Farré et al. 1993; McCance-Katz et al. 1993). Ob dies auch für

Methylphenidat und Ethanol zutrifft, soll durch die vorliegende Arbeit überprüft werden.

1.2 Definition und Klassifikation des ADHS

Das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom bzw. die hyperkinetische Störung ist Bestandteil einer Gruppe von Störungsbildern, die in den gängigen Klassifikationssystemen ICD-10 und DSM IV durch die Symptome Unaufmerksamkeit, motorische Unruhe und Impulsivität definiert werden. Als Kernsymptomatik gilt dabei die Störung der Aufmerksamkeit mit Mangel der Ausdauer bei Leistungsanforderungen und die Tendenz, Tätigkeiten zu wechseln, bevor sie zu Ende gebracht werden, unruhiges Verhalten, insbesondere mit der fehlenden Fähigkeit, Stillsitzen zu können und Impulsivität mit zum Beispiel abrupten motorischen und/oder verbalen Aktionen, die nicht in den sozialen Kontext passen.

Entscheidende Faktoren zur Diagnose dieser Störung sind die für das Alter und den Entwicklungsstand entsprechende Ausprägung der Symptome, der frühe Beginn der Störung vor dem sechsten Lebensjahr, sowie eine Dauer des Bestehens der Symptomatik von mehr als sechs Monaten, ebenso wie das Auftreten in mehr als einer Situation und einer Umgebung, wie zum Beispiel zu Hause, im Klassenzimmer, in der Freizeit. Dabei sind Jungen häufiger betroffen als Mädchen. Weiterhin sind häufig auch Störungen in anderen Bereichen zu finden. Dazu gehören vor allem Entwicklungsstörungen der Sprache, des Lesens und der Rechtschreibung, Tic-Störungen, sowie Störungen des Sozialverhaltens. Diese sind jedoch für die Diagnosestellung nicht ausschlaggebend und treten nur sekundär zum oben beschriebenen Störungsbild auf.

1.2.1 Ätiologie des ADHS

Die Ursachen für die Entstehung des ADHS sind noch nicht vollständig geklärt. Das Störungsbild wird multifaktoriell ausgelöst. Seine Entstehung wird auf die Wechselwirkungen genetischer und exogener Risikofaktoren zurückgeführt. Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien zeigen, dass genetischen Faktoren für die Entstehung des ADHS eine entscheidende Rolle spielen (Thapar et al. 1999). Etwa 65 bis 90 % der phänotypischen Ausprägung werden auf genetische Faktoren zurückgeführt (Levy et al.

1997). Geschwister, Eltern oder andere Verwandte haben ein etwa drei- bis fünffach erhöhtes Risiko, an ADHS zu erkranken. Es wird angenommen, dass DNA-Polymorphismen verschiedener Gene zur Entstehung des ADHS beitragen (Asherson, IMAGE Consortium 2004). Den genetischen Faktoren untergeordnete, aber eine die Ausprägung der Störung beeinflussende Rolle, spielen exogene Faktoren. Zu diesen zählen unter anderem Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, ein erniedrigtes Geburtsgewicht, Infektionen und Toxine (zum Beispiel pränatale Alkohol-, Benzodiazepin- oder Nikotinexposition), ZNS-Erkrankungen und ZNS-Verletzungen, sowie ungünstige psychosoziale Bedingungen (Milberger et al. 1997). Pränatale Alkohol- und Nikotinexposition gelten dabei sogar als bedeutsame eigenständige Gruppe der exogenen Risikofaktoren (Thapar et al. 2003). Es wird außerdem darüber diskutiert, ob es einen Zusammenhang zwischen atopischen Erkrankungen wie Neurodermitis und ADHS gibt. Dies konnte bisher nicht belegt werden, da kein kausaler Zusammenhang zwischen dem IgE-Titer und der ADHS-Symptomatik beschrieben werden konnte (Blank, Remschmidt 1994). Der Schweregrad und die Stabilität der Symptomatik werden außerdem durch Erlebnisse der frühen Kindheit mit ungünstigen psychosozialen Faktoren, wie zum Beispiel Vernachlässigung, beeinflusst. Diesen Faktoren wird ein Zusammenhang mit dem zusätzlichen Auftreten von aggressivem und dissozialem Verhalten zugesprochen.

1.2.2 Strukturelle und funktionelle zerebrale Korrelate zu den Entstehungstheorien

Beweisend für die Entwicklung des Störungsbildes des ADHS sind strukturelle und funktionelle zerebrale Korrelate, die sich durch klinische Verfahren bestimmen lassen. Bildgebende Verfahren zeigen, dass am ADHS erkrankte Personen im Vergleich zu Gesunden eine um etwa 70 % erhöhte Bindungskapazität der präsynaptischen Dopamin-Transporter besitzen (Cheon et al. 2003), was wahrscheinlich auf die genetisch bedingte Expression dieser Transporter zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen demonstrieren, dass strukturelle und funktionelle, rechtsseitig betonte Auffälligkeiten im Bereich des präfrontalen Kortex, des anterioren Gyrus cinguli, sowie der Basalganglien und ihrer Verbindungen bestehen. Die vielfach beschriebene Volumenminderung des Gehirns ist Folge einer bereits frühen Abweichung der Hirnentwicklung und hat keinen Zusammenhang mit einer später eingesetzten externen

Schädigung, wie es bislang angenommen wurde. Diese Volumenminderung ist auch nicht auf die Behandlung mit Stimulanzien (Castellanos et al. 2002) zur Therapie des ADHS zurückzuführen. Elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchungen zeigen, dass auch das noradrenerge Neurotransmittersystem und das posteriore Aufmerksamkeitssystem an der Pathophysiologie des ADHS beteiligt sind (Biederman, Spencer 2000). Hirnelektrische Untersuchungen beweisen, dass bei Kindern mit ADHS im Vergleich zu gesunden Kindern die aufmerksamkeitsabhängigen und zielorientierten Informationsverarbeitungsprozesse gestört sind. Es kommt im gesamten zeitlichen Verlauf der Störungsentwicklung zu Auffälligkeiten in der Informationsverarbeitung (Steger et al. 2001), was die Zuordnung zu bestimmten Alters- und Entwicklungsstufen schwierig gestaltet.

1.2.3 Diagnostik und Differenzialdiagnostik des ADHS

Die Erfassung der klinischen Symptomatik und deren Verlauf in den verschiedenen Lebensbereichen des Patienten stehen im Zentrum der Diagnosestellung des Störungsbildes.

Dazu dienen vor allem die klinische Exploration der Eltern, des Kindes oder Jugendlichen, sowie das Sammeln von Informationen von am Leben des betroffenen Kindes beteiligten Menschen, wie Erziehern und Lehrern. Die Durchführung einer multiaxialen Diagnostik hat sich als sinnvoll erwiesen. Dabei wird das Störungsbild auf sechs Achsen begründet. Die erste Achse ist das klinisch-psychiatrische Syndrom, die zweite Achse die umschriebene Entwicklungsstörung. Das Intelligenzniveau bildet die dritte Achse, die körperliche Symptomatik die vierte, die assoziierten aktuellen abnormen Umstände die fünfte und die globale Beurteilung des psychosozialen Funktionsniveaus die sechste Achse (Remschmidt et al. 2001). Entscheidend für die Diagnosestellung ist, dass die Symptome zu einer deutlichen Beeinträchtigung im Leistungs- und Sozialbereich führen und nicht durch medikamenteninduzierte Störungen (Phenobarbital), durch organische Primärstörungen wie Hyperthyreose, durch tiefergehende Entwicklungsstörungen wie Autismus und durch psychiatrische Krankheitsbilder wie Depression, Psychose und Borderline-Störung erklärt werden können. Neben der Abklärung differentialdiagnostischer Parameter ist es wichtig, Störungen, deren Erscheinungsbild dem des ADHS ähnlich ist, zu erkennen und

auszuschließen. Die häufigsten Störungen, bei denen dies zutrifft, sind Störungen des Sozialverhaltens, Tic-Störungen und emotionale Störungen.

Die Diagnose ist durch die Klinik des Störungsbildes zu stellen. Dazu bedarf es einer umfassenden Anamnese, der Erhebung der Symptomatik und der direkten Beobachtung. Für die Diagnose geeignete Hilfsmittel sind Checklisten, Fragebogenverfahren und Interviews. Außerdem sollte sich eine Intelligenz-, Leistungs- und Entwicklungsdiagnostik des Kindes anschließen. Eine internistische und neurologische Untersuchung dient zum Ausschluss begleitender körperlicher Krankheiten und kann eine weiterführende Diagnostik bedingen.

1.2.4 Epidemiologie des ADHS

Für die Prävalenz des ADHS, also die Anzahl der Erkrankten in einem Jahr, wurden folgende Einschlussfaktoren definiert: das diagnostische Klassifikationssystem (DSM versus ICD-10), die Art der Stichprobe, beschrieben durch die Inanspruchnahme-Population und bevölkerungsbasierte Studien, das Diagnoseverfahren, aufgeteilt in Klinik, Fragebogenverfahren, strukturierte Interviews, sowie die Berücksichtigung der Auswirkung auf das psychosoziale Funktionsniveau. Die Erhebungen im Rahmen des Kinder- und Jugendsurveys des Robert Koch-Instituts in Berlin ergaben eine mittlere Prävalenzrate von 3,9 % für Kinder- und Jugendliche bis zum 17. Lebensjahr.

1.2.5 Verlauf und Prognose des ADHS

Bei 40 bis 80 % der Kinder, die die Diagnosekriterien des ADHS erfüllen, ist eine Persistenz der Störung ins Erwachsenenalter festzustellen, was in 5 Langzeitstudien beobachtet wurde (Basset-Grundy, Butler 2004). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass etwa ein Drittel der Fälle auch noch im Erwachsenenalter an dieser Störung leiden. Außerdem ist diese Störung im Erwachsenenalter mit weiteren Störungen assoziiert. Dazu zählen affektive Störungen, Substanzmissbrauch, antisoziale Persönlichkeitsstörungen, Delinquenz und dissoziales Verhalten. Darüber hinaus besteht ein erhöhtes Risiko dafür, Verkehrsunfälle und Unfälle zu erleiden. Ebenso kommt es zu verschiedenen Beeinträchtigungen im sozialen Verhalten wie Abbruch der Schul- oder Berufskarriere und gestörte zwischenmenschliche Beziehungen (Taylor 1999), was die Verluste der sozialen Anpassungsfähigkeit als Folge hat.

1.2.6 ADHS im Erwachsenenalter

Die Diagnosestellung der Störung im Erwachsenenalter ist schwieriger als im Kindesalter, was damit zusammenhängt, dass sich die Symptome, die aus dem Kindesalter bekannt sind, im Erwachsenenalter ändern. Es wird ein Rückgang der Hyperaktivität bei Erhaltenbleiben der Konzentrationsunfähigkeit und der Impulsivität beschrieben. Für die Diagnostik im Erwachsenenalter wurden Methoden entwickelt, die sich direkt am ICD-10 und DSM IV Klassifikationssystem orientieren. Dazu zählen unter anderem der Adult-ADHD-Self-Report-Scale, Wender-Utah-Scale, Connors Adult Rating Scales und die Diagnosen-Checkliste ADHS-DC. Neben der medikamentösen Therapie mit Methylphenidat als Mittel der ersten Wahl, werden zur Behandlung im Erwachsenenalter, ähnlich wie im Kindesalter, psychotherapeutische Verfahren empfohlen.

1.2.7 Therapie der ADHS

Die Therapie des ADHS umfasst drei therapeutische Verfahrensweisen. Zum einen werden Psychoedukation und Verhaltenstherapie durchgeführt, zum anderen wird das ADHS medikamentös behandelt.

Die Psychoedukation beinhaltet die Aufklärung über das Krankheitsbild, Informationen zur Ätiologie, zum Verlauf und zu den möglichen Behandlungsalternativen. Es sollten auch außerfamiliäre Bezugspersonen in die Therapie mit einbezogen werden. Psychotherapeutische Ansätze, die sich als wirksam erwiesen, stützen sich auf eine verhaltenstherapeutische Herangehensweise. Verhaltenstherapeutische Interventionen als Kind- und Eltern-Training, sowie die verhaltenstherapeutische Intervention in Kindergarten oder Schule haben sich als Erfolg versprechend erwiesen. Die Intervention basiert auf Definition des Problems (kritisches Verhalten) und Verhaltensanalyse (Bedingungsbeziehungen). Die Behandlung basiert hauptsächlich auf operanter Technik.

Die medikamentöse Behandlung umfasst den Einsatz von Medikamenten der Gruppe der Stimulanzien, die auf Basis ihrer in Studien nachgewiesenen Wirksamkeit Medikamente der ersten Wahl zur Behandlung des Störungsbildes sind. Medikament der zweiten Wahl ist nach heutigen wissenschaftlichen Kenntnissen Atomoxetin. Alle anderen Präparate sind Medikamente dritter Wahl und sollten nur eingesetzt werden,

wenn Medikamente der ersten und zweiten Wahl keine Besserung der Symptome oder unerwünschte Wirkungen verursachen. Die Wirksamkeit der Stimulanzengruppe in Bezug auf die Kernsymptomatik des ADHS wurde in zahlreiche Studien bewiesen. Diese Gruppe umfasst unter anderem Methylphenidat, Amphetamin und Pemolin. Die Indikation für eine Medikation mit Stimulanzien ist gegeben, wenn die Diagnose des ADHS nach ICD-10 und DSM IV Kriterien gesichert ist, wenn die Symptomatik ausgeprägt und eine psychoedukative und psychotherapeutische Hilfe nicht umsetzbar ist oder sich die Symptome innerhalb einer Frist von einigen Wochen nicht bessern. Die Behandlung sollte mit einem schnell freisetzenden Stimulans begonnen werden, wobei die Dosierung der Stimulanzien individuell bestimmt wird. Bei Methylphenidat ist der Wirkungseintritt ab etwa einer halbe Stunde für eine Dauer von etwa vier Stunden zu erwarten. Retardformen beinhalten Methylphenidat, das in einer ersten Phase schnell, in einer zweiten Phase verzögert freigesetzt wird. Bei einer einmaligen Gabe dauert die Wirkung 6 bis 12 Stunden an. Auf die Gabe von teureren Retardprodukten sollte erst zurückgegriffen werden, sollte eine verlässliche Mehrfachgabe über den Tag durch fehlende Compliance nicht möglich sein und ein stabiler Tagesspiegel auf anderem Wege nicht erreicht werden kann. Auch die Dauer der Medikation wird individuell bestimmt. Die Wirksamkeit wird durch die Besserung der Symptome beurteilt und erfolgt nach klinischer Einschätzung und anhand der Information Außenstehender, die den Patienten gut kennen. Hierfür werden Einschätzungsskalen, wie die Connorskala benutzt. Sollte nach Beginn der Medikation mit Hilfe von Stimulanzien nach 6 Wochen keine Besserung der Symptome auftreten, werden Diagnose, Qualität der Wirksamkeitskontrolle und Compliance, sowie Dosierung der Medikation überprüft. Ist die Medikation mit Methylphenidat nicht wirksam, wird eine Umstellung des Behandlungsplans auf DL-Amphetamin empfohlen, dessen Wirkung im Zeitraum von einem Jahr zu überprüfen ist. Die Wirksamkeit sollte hier in einem Ein-Jahres Abstand überprüft werden. Pemolin sollte unter Berücksichtigung des Risikos von Leberschädigungen nur unter besonderen Bedingungen verschrieben werden. Die Nicht-Stimulanzien Therapie umfasst den Einsatz von Atomoxetin (Biederman et al. 2002). Diese Substanz ist nach Methylphenidat und Amphetamin am besten untersucht und hat eine gute Evidenzlage. Auch Trizyklische Antidepressiva werden als Medikation zur Therapie des ADHS eingesetzt. Diese sollten aber erst dann zum Einsatz kommen, sollten Stimulanzien und Atomoxetin nicht den gewünschten Effekt der Symptomminderung erbringen.

Unerwünschte Wirkungen, die bei der Therapie mit Methylphenidat oder Amphetamin auftreten können, sind in der Regel dosisabhängig, vermeidbar und nur zu Beginn der Therapie zu beobachten. Dazu gehören Appetitminderung, Schlafstörungen, abdominelle Beschwerden, klinisch unbedeutende Puls-/Blutdrucksteigerungen. Sonstige unerwünschte Bedingungen sind selten. Die Beeinträchtigung des Körperwachstums unter Methylphenidat ist vorübergehend und reversibel.

1.3 Methylphenidat

Methylphenidat ist eine dem Amphetamin ähnliche Substanz, die als Derivat der Piperidinsäure zur Stoffgruppe die dem Betäubungsmittelgesetz unterliegenden Weckamine gehört. Es wurde in den 40er Jahren das erste Mal synthetisiert.

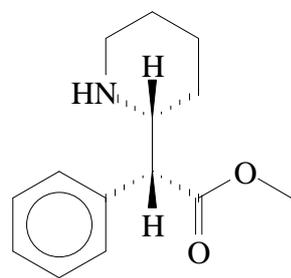
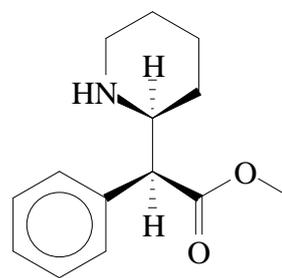
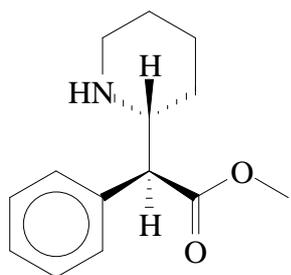
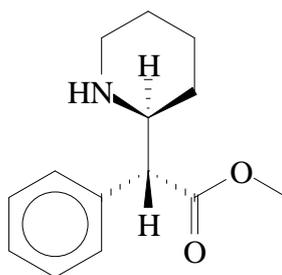
Es führt bei etwa 70 % der behandelten Kinder zu einer Besserung des klinische Bildes des ADHS (Greenhill et al. 2002; Swanson, Volkow 2003). Bei Erwachsenen ist die klinische Wirksamkeit auf 25 – 78 % der behandelten Patienten beschränkt (Schweitzer et al. 2001). 1/3 der behandlungsbedürftigen Patienten in den USA sind Erwachsene (Okie 2006). Allein zwischen 1991 und 1995 stieg die Methylphenidatproduktion in den USA um 500 % auf 10.410 kg an.

Weckamine leiten sich chemisch von den Katecholaminen bzw. von Ephedrin ab. Ihre Wirkung beruht auf der Freisetzung von Katecholaminen, was sie zu indirekt wirkenden Sympathomimetika macht. Besonders ausgeprägt ist die zentrale Wirkung: Im Zentralen Nervensystem blockiert Methylphenidat die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Dopamin in zentrale Synaptosomen (Volkow N.D. et al. 2002; Volkow et al. 2001; Volkow et al. 1998; Volkow et al. 2002). Zentrale Effekte sind lokomotorische Stimulation, Euphorie und zentrale Erregung, stereotypes Verhalten und Anorexie. Es kommt aber auch zu peripheren sympathomimetischen Wirkungen, die jedoch weniger ausgeprägt sind. Nebenwirkungen von Methylphenidat sind zentralnervöse Störungen wie Angst, Kopfschmerzen, Tremor, Appetitmangel, sowie Mundtrockenheit, Tachykardien, Blutdrucksteigerung und allergische Reaktionen.

1.3.1 Chemische Eigenschaften

Methylphenidat leitet sich chemisch von den Katecholaminen bzw. von Ephedrin ab. Durch den Wegfall der Hydroxylgruppe als funktionelle Gruppe wird die seine

Lipophilie begünstigt. Dies erklärt die zentralvenöse Wirkung, da durch die Lipophilie das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht wird. Das Methylphenidatmolekül besitzt zwei asymmetrische Kohlenstoffatome. Es lassen sich daher zwei chirale Zentren benennen. Hieraus leiten sich vier verschiedene Formen von Methylphenidat gebildet ab: *d*- und *l*-Erythro-Methylphenidat und *d*- und *l*-Threo-Methylphenidat. Klinischen Anwendung findet Methylphenidat vor allem in der Threo-Form als Razemat mit einem potenteren *d*-Enantiomer (= *d*-Methylphenidat) und einem weniger potenten *l*-Enantiomer (= *l*-Methylphenidat). (Kimko et al. 1999)

*d*-(R,R)-Methylphenidat*l*-(S,S)-Methylphenidat**Abbildung 1-1:** Threo-Methylphenidat*d*-(R,S)-Methylphenidat*l*-(S,R)-Methylphenidat**Abbildung 1-2:** Erythro-Methylphenidat

Die Erythroform von Methylphenidat wird in Medikamentenformulierungen nicht mehr verwendet, da diese verstärkt zu unerwünschten Nebenwirkungen führte (Rometsch

1958). Die *d*-Threoform ist verantwortlich für die bekannten psychotherapeutischen und anorektischen Effekte, sowie für die Erhöhung des Blutdrucks.

Methylphenidat ist in Alkohol, Ethylacetat und Ether löslich.

1.3.2 Pharmakodynamik

Die pharmakodynamische Wirkung von Methylphenidat ist auf die Beeinflussung des katecholaminergen Systems des Zentralen Nervensystems zurückzuführen (Wilens TE. 2008). Sein therapeutische Effekt in der Behandlung des ADHS beruht hauptsächlich auf der Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin durch Inhibition des präsynaptischen Dopamin-Transporters (Volkow et al. 1998) in Striatum und Motorkortex (Crawford et al. 1998; Vaidya et al. 1998; Moll et al. 2000). Dort führt es zur Verminderung der Motor- und Hyperaktivität. Es hat aber auch einen hemmenden Effekt auf den Noradrenalin-Transporter, der jedoch weniger stark ausgeprägt ist und sich, tierexperimentell nachweisbar, hauptsächlich auf den präfrontalen Kortex beschränkt (Bymaster et al. 2002). Die Bindung von Methylphenidat an den Dopamin-Transporter ist bei ADHS-Erkrankten stärker ausgeprägt als bei Gesunden (Dougherty et al. 1999; Dresel et al. 2000; Krause et al. 2000; Spencer et al. 2005). Die Blockade im Striatum ist dosisabhängig (Sonders et al. 1997; Vles et al. 2003). 0,25 mg/kg bzw. eine Plasmakonzentration von 5,7 ng/ml führen zu einer 50% Blockade (Volkow et al. 1998). Es wird davon ausgegangen, dass die Wirkung von Methylphenidat auf mehreren Signalwegen zur Anhäufung von Dopamin im synaptischen Spalt führt. Dazu gehören hauptsächlich die Blockade des Dopamin-Transporters, aber auch die Aufhebung der Inhibition des präsynaptischen D₂-Autorezeptors und die postsynaptische Aktivierung des D₁-Rezeptors (Seeman, Madras 1998). Die Hemmung des präsynaptischen Dopamin-Transporters bewirkt eine Verstärkung der Neurotransmission (Hitri et al. 1994), da sich Dopamin im synaptischen Spalt ansammelt. Gleichzeitig wird die eigentliche Transmission herunter geregelt, was im Patienten zur Verbesserung der Aufmerksamkeit und Verminderung der Ablenkbarkeit führt (Rosa-Neto et al. 2005). Die Verbesserung der kognitiven Symptomatik wurde tierexperimentell durch die Effekte von Methylphenidat am D₁-Rezeptor und α_2 -Adrenorezeptor demonstriert (Arnsten, Dudley 2005). Dass die Inhibition des Noradrenalin-Transporters durch Methylphenidat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Behandlung des ADHS besitzt, konnte bisher nur tierexperimentell gezeigt werden (Berridge et al. 2006).

Methylphenidat bindet in gleicher Sensitivität am Dopamin-Transporter wie am Noradrenalin-Transporter (Han, Gu 2006).

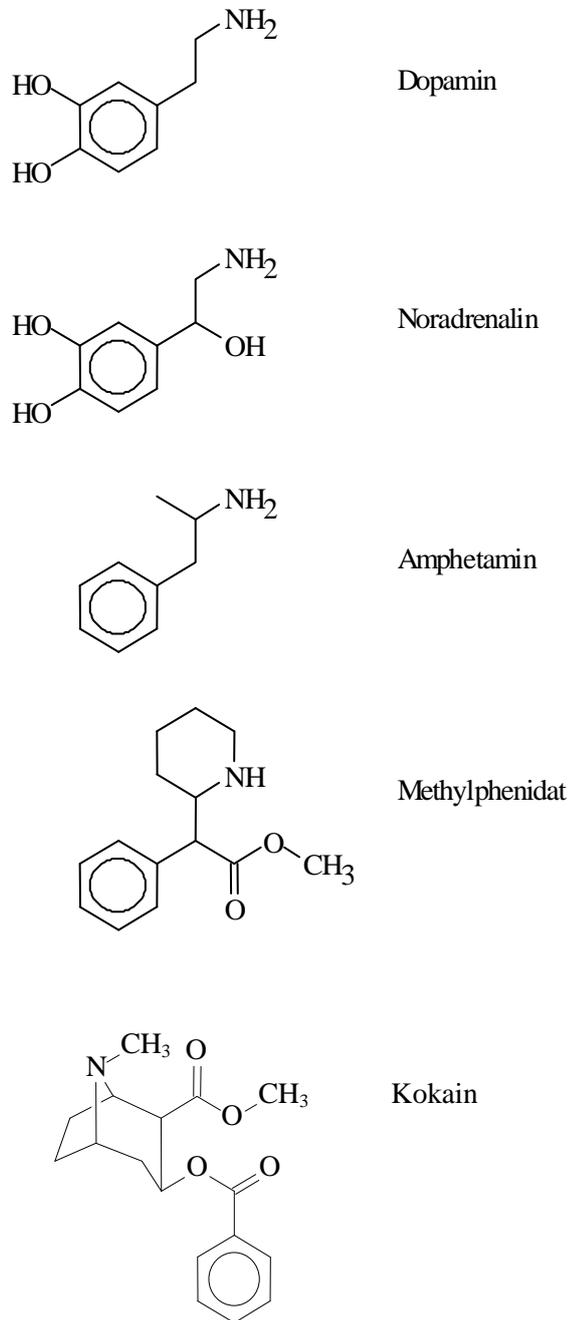


Abbildung 1-3: Chemischer Aufbau von Methylphenidat im Vergleich zu Substanzen, die ebenfalls am Dopamin-Transporter binden.

Es wird diskutiert, ob in den Hirnarealen, in denen es nur wenige Dopamin-Transporter gibt, Dopamin über Noradrenalin-Transporter ausgeschüttet wird. Dies würde bedeuten, dass sich die Transportvorgänge der Monoamine überkreuzen. Solche Rezeptoren, die meist an den Nervenenden lokalisiert sind und die einem Neurotransmitter die Ausschüttung eines anderen erlauben, bezeichnet man als Heterorezeptoren. Im Tierexperiment wurden besonders im frontalen Kortex solche Heterorezeptoren für Monoamine gefunden (Gobert et al. 1998; Gresch et al. 1995). Außerhalb des präfrontalen Kortex finden sich besonders im somatosensorischen Kortex bei Methylphenidateinnahme erhöhte Noradrenalkonzentrationen, die dort zur Steigerung der lokomotorischen Aktivität führen (Drouin et al. 2006). Auch andere Neurotransmitter wie Histamin, Acetylcholin und Serotonin scheinen durch Methylphenidat beeinflussbar zu sein und verbessern somit das klinische Bildes des ADHS (Santosh, Taylor 2000; Volkow et al. 2000). Die genaue Wirkung ist allerdings bisher noch nicht bekannt.

Die Ähnlichkeit des Angriffsorts von Methylphenidat und Dopamin und die Konkurrenz um diesen lassen sich durch deren chemische Struktureigenschaften erklären. Beide Substanzen besitzen einen Phenethylamin-Rest als funktionelle Gruppe, der wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Bindung an den Rezeptor des Dopamin-Transporters spielt. Methylphenidat kann am Dopamin-Transporter binden, es besitzt jedoch nicht die intrinsische Aktivität, um eine Konformationsänderung zu induzieren, die zu einer Translokation von der ligandenbindenden Seite in das intraneuronale Milieu führt. Im Gegensatz zu Amphetaminen führt die Bindung von Methylphenidat nicht zu einer transporterengebundenen Freisetzung von Dopamin aus dem Zytoplasma in den synaptischen Spalt, wenn der Transporter wieder in seine Ausgangsposition zurückkehrt (Szponry, Gorog 1961), was für sein niedriges Abhängigkeitspotential eine Rolle spielt.

1.3.3 Metabolismus

Methylphenidat wird im Körper hauptsächlich durch Hydrolyse in seine inaktiven Metabolite, darunter zum größten Teil Ritalinsäure, abgebaut. Dieser Abbaumechanismus setzt die absolute Bioverfügbarkeit von Methylphenidat auf 11-53% herab (Chan et al. 1983; Kimko et al. 1999). Somit übersteigt die Zirkulation von Ritalinsäure die der Ausgangssubstanz Methylphenidat im Körper deutlich (Wargin et

al. 1983). Die Hydrolyse ist hauptsächlich durch Esterspaltung über die humane Carboxylesterase 1A1 Isoform bedingt (Sun et al. 2004). Dieses Enzym ist enantioselektiv, was in Untersuchungen der gepoolten Einnahme des l- bzw. des d-Enantiomers gezeigt werden konnte. Darin wurde demonstriert, dass das l-Enantiomer einem schnelleren Metabolismus und einer schnelleren Clearance unterliegt als das d-Enantiomer (Kimko et al. 1999).

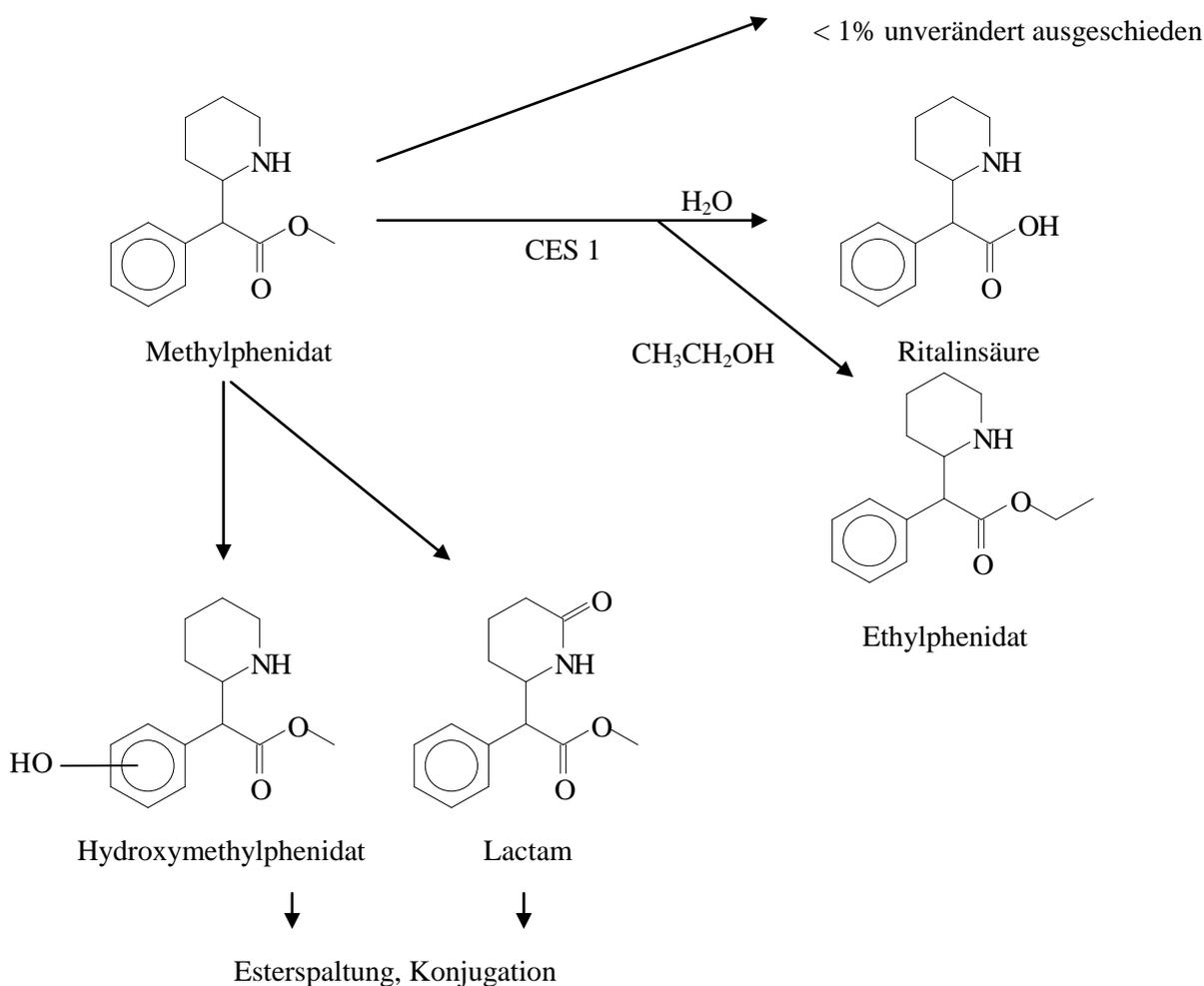


Abbildung 1-4: Metabolismus von Methylphenidat im Körper bei regulärem Abbau, sowie bei der Veresterung zu Ethylphenidat durch die humane Carboxylesterase 1A1 (CES 1).

Eine Versuchsreihe mit Ratten zeigte außerdem, dass das l-Enantiomer bei oraler Aufnahme eine wesentlich höhere Aufnahmegeschwindigkeit in das Zentrale Nervensystem besitzt als das d-Enantiomer (Swanson, Volkow 2003). Zu den durch den Urin ausgeschiedenen Metaboliten gehören Spuren von pharmakologisch inaktivem Lactam (<1%), durch Veresterung inaktiviertes Lactam (5-12% der Dosis), der aktive

Metabolit p-Hydroxymethylphenidat und unverändertes Methylphenidat (<1%). Diese Metabolite werden über aromatische Hydroxylierung, mikrosomale Oxidation und Konjugation gebildet.

1.3.4 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von Methylphenidat ist in gesunden Erwachsenen und in Kindern mit ADHS vergleichbar (Kimko et al. 1999). Die Absorption ist vollständig und schnell (Gualtieri et al. 1982). Die höchsten Werte der Serumkonzentration des Medikaments für t_{max} nach oraler Aufnahme werden nach etwa 1 bis 3 Stunden erreicht (Kimko et al. 1999). Eine inter-individuelle Variabilität in der Absorptionsrate wird angenommen. Oft wurde die Methylphenidateinnahme 30-45 Minuten vor den Mahlzeiten angeraten, da man annahm, dass die gleichzeitige Einnahme von Nahrung die Absorption von Methylphenidat verminderte. Dies wurde in einer Studie über die Einnahmegewohnheiten von gesunden Kindern mit gleichzeitiger Messung der Methylphenidatplasmakonzentration widerlegt (Chan et al. 1983). Die Plasmaproteinbindung von Methylphenidat ist mit etwa 15 % niedrig (Hungund et al. 1979). Methylphenidat hat eine Plasmahalbwertszeit von 2 - 2,5 Stunden, t_{max} liegt bei etwa 1,5 Stunden. Die absolute Bioverfügbarkeit wird durch die Hydrolyse auf 11-53% herabgesetzt. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend renal. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem Methylphenidat kann in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) gezeigt werden, dass nach oraler Aufnahme von Methylphenidat Höchstkonzentrationen der Methylphenidatdosis im Gehirn nach etwa 1-2 Stunden erreicht werden (Volkow et al. 2001), was sich mit den klinischen Effekten von Methylphenidat bei ADHS Patienten deckt. Außerdem wurde in diesen Studien gezeigt, dass sich nach Gabe von hohen Dosen von Methylphenidat eine Toleranz im Gehirn in Bezug auf die Blockade des Dopamin-Transporters ausbildet. Diese ist jedoch nicht von langer Dauer und schon am folgenden Tag wieder aufgehoben (Swanson et al. 1999). Eine Methylphenidatnormaldosis hemmt etwa 50 % der Dopamin-Transporter. Eine maximale Hemmung der Dopamin-Transporter, die bei etwa 80 % liegt, wird bei einer Serumkonzentration von etwa 8-10 ng/ml Methylphenidat erreicht. Das bedeutet, dass in Bezug auf Methylphenidat ein Ceiling-Effekt besteht. Eine weitere Erhöhung der Methylphenidatdosis bewirkt demnach keine erhöhte Hemmung der Dopamin-Transporter.

1.3.5 Abhängigkeit der Pharmakokinetik von der Enantiomerstruktur

Methylphenidat liegt in verschiedenen Enantiomerstrukturen vor. Die in der Therapie des ADHS meist verwendete Zusammensetzung ist ein Razemat bestehend aus d- und l-Threo-Methylphenidat (Kimko et al. 1999). Es zeigte sich in Studien, dass d-Methylphenidat die aktive Form des Pharmakons ist, die im zentralen Nervensystem spezifisch am Dopamin- und am Noradrenalin-Transporter bindet (Volkow N.D. et al. 2002). Dagegen ist die Bindung von l-Methylphenidat an diesen Transportern nicht spezifisch (Ding et al. 2004; Volkow et al. 1995; Ding Y.S. et al. 1997). Zhang et al. (2002) beobachteten tierexperimentell, dass l-Methylphenidat einen antagonistischen Effekt auf die Wirkung von d-Methylphenidat im zentralen Nervensystem hat. l-Methylphenidat inhibierte dosisabhängig die von d-Methylphenidat und Kokain ausgelöste lokomotorische zentrale Stimulation bei Ratten (Tarazi et al. 2000). In einer in-vitro Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass Methylphenidat zu Ritalinsäure stereoselektiv über die humane Carboxylesterase 1A hydrolysiert wird (Sun et al. 2004; Markowitz, Patrick 2008), wobei l-Methylphenidat im Vergleich zu d-Methylphenidat dabei 6-fach bevorzugt wurde. Die Halbwertszeit von d-Methylphenidat ist signifikant länger als die von l-Methylphenidat (Patrick et al. 2005a). Der first-pass Effekt und die Clearance von d,l-Methylphenidat ist ebenfalls stereoselektiv und führt dadurch zu den im Vergleich höheren Plasmakonzentrationen von d-Methylphenidat (Patrick et al. 2005a; Markowitz et al. 2003). Der Anteil an l-Methylphenidat beträgt etwa 1-15% der d-Methylphenidatkonzentrationen (Ramos et al. 1999; Modi et al. 2000; Patrick et al. 2005a). Neben der geringeren Bioverfügbarkeit für l-Methylphenidat, besitzt es im Plasma eine höhere Stabilität als die d-Enantiomerform (Srinivas et al. 1993).

Auch Ethylphenidat wird über die humane Carboxylesterase 1A enantioselektiv gebildet. So konnte in einer Probandenstudie gezeigt werden, dass die l-Form von Ethylphenidat bevorzugt aus der Ausgangssubstanz d-Methylphenidat entstand (Patrick et al. 2007). Daneben kam es auch zur Bildung von d-Ethylphenidat. Die d-Ethylphenidatkonzentration erreichte jedoch nur etwa 10% der l-Ethylphenidatkonzentration. Durch in-vitro Versuche mit synthetisiertem Ethylphenidat konnte gezeigt werden, dass das d-(R,R)-Enantiomer von Ethylphenidat die höchste Aktivität an sowohl Dopamin- als auch Noradrenalin-Transportern besitzt (Patrick et al. 2005b).

1.3.6 Abhängigkeit der Pharmakokinetik vom Geschlecht

Patrick et al. (2007) konnten geschlechtliche Unterschiede in der Pharmakokinetik von d-Methylphenidat nachweisen. Es zeigte sich, dass die AUC von d-Methylphenidat bei alleiniger Methylphenidateinnahme sowie bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme bei Männern (93,4 ng*h/ml bzw. 114 ng*h/ml) signifikant höher war als bei Frauen (73,5 ng*h/ml bzw. 92,6 ng*h/ml). Die Wirkung von Ethanol und Methylphenidat wurde von den weiblichen Probanden stärker wahrgenommen als von den männlichen. Die Einnahme in Kombination mit Alkohol führte zu einer verstärkten Wirkungswahrnehmung im Vergleich zur alleinigen Methylphenidateinnahme. Patrick et al. (2007) führten die unterschiedliche Wahrnehmung auf die erniedrigte Bioverfügbarkeit der verabreichten Methylphenidat-Retardform zurück. Verantwortlich dafür wurde die verlängerte Absorption gemacht, die durch den verstärkten first-pass Effekt und einen im Vergleich zu den männlichen Patienten versetzten Aufnahmeort des Pharmakons im distalen Gastrointestinaltrakt der weiblichen Probanden (Markowitz et al. 2003; Pentikis et al. 2005; Sonuga-Barke et al. 2007) ausgelöst wurde. Dies würde auch erklären, weshalb bei ADHS-Patientinnen die Wirkung von Methylphenidat schneller nachzulassen scheint als bei männlichen Patienten (Sonuga-Barke et al. 2005).

1.3.7 Toxikologie und Überdosierung

Die Mittlere Letale Dosis (LD 50) von Methylphenidat liegt bei Ratten unter intravenöser Applikation bei 48,3 mg/kg und bei 367 mg/kg unter oraler Einnahme. Ratten, die mit Methylphenidatdosen von 120 mg/kg/Tag über 90 Tage behandelt wurden, zeigten eine Abnahme des Körpergewichtes, aber keine Anzeichen der Wachstumsminde rung, Infertilität oder Karzinogenität. Hunde, die über 120 Tage mit Dosen von 10 mg/kg/Tag Methylphenidat behandelt wurden, zeigten hyperaktives und hypererregtes Verhalten, hatten aber keine Appetitminderung, Wachstumsverzögerung oder Lebergewebsschäden.

Zeichen der akuten Methylphenidatüberdosierung machen sich durch die Überstimulation des Zentralen Nervensystems und durch sympathomimetischen Effekte bemerkbar. Unter anderem treten Übelkeit, Schläfrigkeit, vermehrte Schweißbildung, Kopfwahl, aufsteigendes Hitzegefühl, Tachykardie, Palpitationen, kardiale Arrhythmie,

Hypertonie, Mydriasis, Mundtrockenheit, Tremor, Hyperreflexie, Muskelzuckungen, Euphorie, Paranoia, Halluzinationen, sowie in extremen Fällen Hyperthermie und Koma auf.

1.3.8 Interaktionen

Der hauptsächliche Anteil von Methylphenidat wird durch Esterasen hydrolysiert. Die Biotransformation zum Lactam basiert auf oxidativem Metabolismus. Die genauen Isoformen des Cytochroms, die an diesem Vorgang beteiligt sind, konnten bisher nicht identifiziert werden. In einer *in vitro* Studie, die die Präparation von humanen Mikrosomen beinhaltete, wurde festgestellt, dass Methylphenidat über CYP2D6 und CYP2B6 metabolisiert wird. Ritalinsäure war über diese Cytochrome nicht beeinflussbar. Jedoch konnte diese Annahme in einer Probandenstudie widerlegt werden. In dieser Studie blieb nach Gabe eines Hemmstoffs des CYP2D3 *in vivo* der erwartete Anstieg von Methylphenidat aus (DeVane et al. 2000). Also kann ein Zusammenhang für den Metabolismus von Methylphenidat zumindest mit Cyp2D6 ausgeschlossen werden.

Es können außerdem Medikamenten-Interaktionen bei gleichzeitiger Methylphenidateinnahme beschrieben werden. Die kombinierte Einnahme mit Clonidin führte in einigen Fällen zu schweren unerwünschten Effekten. In kombinierter Einnahme mit Doxapram, Moclobemide und MAO-Inhibitoren besteht die Gefahr der Hypertension. In Kombination mit Phenobarbital, Phenytoin und Primidon besteht die Möglichkeit der Steigerung der Plasmakonzentrationen aller 3 Substanzen.

1.3.9 Interaktion mit Alkohol

Die Entstehung des aktiven Metaboliten Ethylphenidat bei kombinierter Einnahme von Alkohol und Methylphenidat wurde erstmals *in-vitro* in einer Versuchsreihe mit Rattenleber (Bourland et al. 1997), die mit Methylphenidat und Ethanol inkubiert wurde, beobachtet. In zwei Fällen der Drogenüberdosierung wurde Ethylphenidat erstmals in Blut in einer im Vergleich zu Methylphenidat und Ritalinsäure sehr geringen Konzentrationen (Markowitz et al. 1999) entdeckt. Daraufhin wurde eine Probandenstudie durchgeführt, die 6 gesunde Probanden einschloss. In dieser wurde den Probanden unter kontrollierten Bedingungen Methylphenidat (20 mg) 30 Minuten vor

Einnahme des Alkohols (BAK bis ca. 0,6 g/kg), verabreicht (Markowitz et al. 2000). Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat wurden in Blut und Urinproben gemessen. Die Einnahme von Methylphenidat und Ethanol wurde von den Probanden gut vertragen. Ethylphenidat konnte erst nach kombinierter Einnahme zusammen mit Alkohol nachgewiesen werden. Ethylphenidat entstand nur in geringen Mengen, dagegen wurde Ritalinsäure in einer Konzentration nachgewiesen, die dem zehnfachen der Methylphenidatkonzentration entspricht. Die maximale Konzentration der Ethylphenidatbildung, C_{max} , lag bei 0,43 ng/ml, t_{max} lag für Ethylphenidat bei 1,8 h und die Halbwertszeit der Elimination bei 1,5 h. Die AUC von Ritalinsäure war 23 ± 4 -mal größer als die AUC von Methylphenidat, wobei die AUC von Ethylphenidat, die bei 1,2 h*ng/ml lag, nur $2,3\% \pm 1,3$ der AUC von Methylphenidat entsprach. Es wurde vermutet, dass der Metabolismus von Methylphenidat zu seinem Ethylester Ethylphenidat durch eine humane Carboxylesterase katalysiert wird, analog zu den Beobachtungen der Entstehung von Kokaethylen bei kombinierter Einnahme von Kokain und Alkohol (Jatlow et al. 1991). In einer weiteren Studie, die besonders auf die Enantioselektivität und Geschlechtsspezifität von Methylphenidat und Ethylphenidat ausgelegt war, wurde festgestellt, dass beim Metabolismus von Methylphenidat zu Ethylphenidat hauptsächlich das l-Enantiomer von Ethylphenidat gebildet wird, bei dem man analog zur Beobachtung zur Enantioselektivität von Methylphenidat im Vergleich zum d-Enantiomer eine geringere zentrale Wirkung vermutet (Patrick et al. 2007).

1.3.10 Beobachtungen zur Interaktion zwischen Kokain und Alkohol

Die Interaktion zwischen Methylphenidat und Alkohol mit Entstehung von Ethylphenidat wird auf die Umesterung durch den Subtyp CES1A1 der humanen Carboxylesterase zurückgeführt, die ebenfalls in Gegenwart von Ethanol den Metabolismus von Kokain zu Kokaethylen katalysiert (Dean et al. 1991; Laizure et al. 2003; Bosron et al. 1997; Boyer, Petersen 1992). Es werden verschiedene Formen der humanen Carboxylesterase, die eine große Rolle im Abbau und Metabolismus von Drogen, die eine Esterstruktur besitzen (wie Kokain, Heroin) spielen, unterschieden. Die Isoenzyme der Carboxylesterase werden in drei Familien eingeteilt (Satoh, Hosokawa 1998).

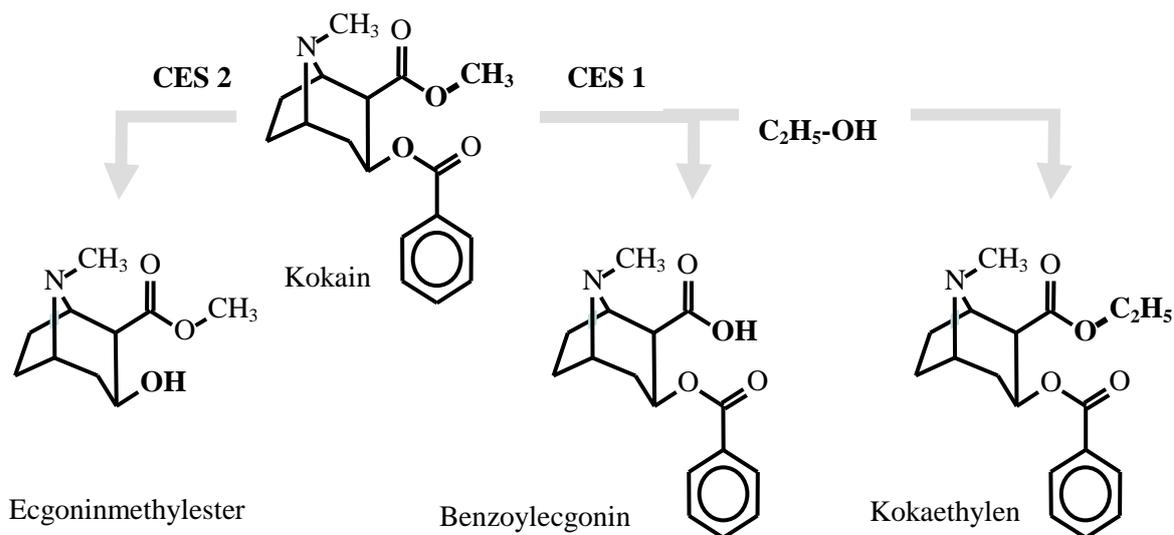


Abbildung 1-5: Metabolismus von Kokain über die katalytische Wirkung der humanen Carboxylesterase 1 (CES 1) und 2 (CES 2).

In der humanen Leber konnten zwei Isoenzyme identifiziert werden: CES1A1 (Shibata et al. 1993) und CES2 (Pindel et al. 1997). Eine dritte Carboxylesterase CES3 wird sowohl in der Leber als auch im Dickdarm ausgebildet (Sanghani et al. 2004). Die Substrate von CES3 sind noch nicht umfassend untersucht. CES1A1 und CES2 haben zum Teil eine überlappende Substratspezifität. Die Hydrolyse von Kokain wird durch die humane Carboxylesterasen CES1A1 und CES 2 katalysiert. Dabei katalysiert CES1A1 die Hydrolyse des Methylesters und CES2 die Hydrolyse des Benzoylestere (Brzezinski et al. 1994; Pindel et al. 1997). Bei gleichzeitiger Einnahme von Kokain und Ethanol wird Kokaethylen gebildet, das in Blut- und Urinproben nachweisbar ist und eine geringfügig verlängerte Halbwertszeit als Kokain besitzt. Gleichzeitig wird bei kombinierter Aufnahme zusammen mit Ethanol eine Erhöhung der Serumkonzentration von Kokain festgestellt. Beides ist für die pharmakologischen euphorisierenden und toxischen Effekte auf den Organismus verantwortlich, ebenso wie für die signifikante Steigerung der Herzfrequenz. (McCance-Katz et al. 1993; Perez-Reyes, Jeffcoat 1992). Die Veresterung von Kokain in Gegenwart von Ethanol zu Kokaethylen ist von der Einnahmehihenfolge beider Substanzen abhängig, was eine Studie mit sechs männlichen Probanden zeigte (Perez-Reyes 1994). Bei vorausgehender Einnahme von Ethanol ist die Bildung von Kokaethylen höher, als bei vorausgehender Aufnahme von Kokain. Dies wird darauf zurückzuführen, dass bei einer Aufnahme von Alkohol 25-30

Minuten vor Einnahme der Kokaindosis, Organsysteme, besonders die Leber, bereits durch den Alkohol beeinflusst sind (Perez-Reyes 1994). Die Plasmakonzentration von Kokain erreicht nach 60 Minuten ihr Maximum. Die auf die Kokaineinnahme folgende Alkoholaufnahme bewirkte keine Änderung der Plasmakonzentration oder der AUC von Kokain. Die höchste Konzentration von Kokaethylen im Plasma wird am Ende der Messungen innerhalb von 2 Stunden beobachtet.

1.4 Problemstellung

Die kombinierte Einnahme von Methylphenidat und Alkohol führt neben der Bildung des regulären Abbauprodukts Ritalinsäure zur Bildung des Ethylesters Ethylphenidat. Dadurch, dass ADHS nach neusten Erkenntnissen nicht ausschließlich eine Erkrankung des Jugendalter ist, sondern eine Persistenz ins Erwachsenenalter beobachtet wurde und außerdem besonders bei Erwachsenen, die an ADHS leiden eine erhöhte Gefahr für Drogen- und Substanzmissbrauch besteht (Schubiner et al. 2000), stellt sich für die Prüfung der pharmakokinetischen Auswirkungen des Ko-Ingestion von Methylphenidat und Alkohol eine neue Indikation. Die medikamentöse Therapie der ersten Wahl von Erwachsenen, die an ADHS erkranken, bleibt die Therapie mit Methylphenidat, welche in Deutschland bislang nicht zugelassen ist. Da davon ausgegangen werden kann, dass Jugendliche, noch wahrscheinlicher Erwachsene neben der Einnahme der Dauermedikation, Alkohol konsumieren, soll in einer Probandenstudien untersucht werden, ob eine Abhängigkeit der pharmakokinetischen Eigenschaften von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure von der Einnahmereinfolge beider Prüfsubstanzen besteht, so wie es für die Einnahme von Kokain und Ethanol bestätigt wurde. Außerdem sollen die Eigenschaften des Methylphenidatmetabolismus in in-vitro Inkubationsversuchen in humanem Leberhomogenat und in humanem Serum charakterisiert werden.

Durch Inkubationsversuchen in humanem Leberhomogenat soll der Metabolismus von Methylphenidat und sowohl die Bildung von Ritalinsäure als auch von Ethylphenidat unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

-
- Die Bildung von Ethylphenidat nach Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in humanem Leberhomogenat soll überprüft werden, ebenso wie die Bildung des regulären Abbauprodukts Ritalinsäure.
 - Dazu soll eine analytische Methode für den Nachweis von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure in humanem Leberhomogenat neu entwickelt werden.
 - Die Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Messung der Ethylphenidatbildung sowie deren Qualität, sollen durch Validierung nach Richtlinie der GTFCh überprüft werden, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse unter verschiedenen Bedingungen zu gewährleisten.
 - Methylphenidat wird zusammen mit Ethanol unter verschiedenen Bedingungen in humanem Leberhomogenat inkubiert:
 - Es soll überprüft werden, ob es sich bei der Bildung von Ethylphenidat und Ritalinsäure um enzymatische Prozesse handelt.
 - Dazu sollen die Enzymsättigungsbereiche für die Ethanolkonzentration und die Methylphenidatkonzentration bestimmt werden.
 - Bei Inkubation äquimolarer Mengen von Methylphenidat und Kokain soll überprüft werden, in wie weit die Metabolisierungswege beider Substanzen zusammenhängen.
 - In einem Inkubationsversuch von Methylphenidat und Ethanol in humanem Serum soll die Serumstabilität der Analyte überprüft werden

In einer Probandenstudie nach GCP-Richtlinie soll geprüft werden, ob und wie viel Ethylphenidat bei konkurrierender Einnahme einer therapeutischen Dosis Methylphenidat (20 mg) und einer moderaten Blutalkoholkonzentration von ca. 0,8 g/kg durch Aufnahme von Wein entsteht und ob signifikante Unterschiede in der Pharmakokinetik von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure nachzuweisen sind, sollte die Einnahmereihenfolge der Prüfsubstanzen Methylphenidat und Ethanol variiert werden. Dazu werden 9 gesunde, männliche Probanden rekrutiert, die Methylphenidat ohne und in Kombination mit Alkohol zu drei verschiedenen Studientagbedingungen in variiertem Reihenfolge einnehmen.

- Eine analytische Methode zum Nachweis von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat in Serumproben mittels LC TOF MS wird neu entwickelt. Diese wird nach Richtlinie der GTFCh validiert.
- Die Auswertung der Serumproben erfolgt anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat zu den drei Konditionen. Aus diesen Daten werden deren pharmakokinetische Parameter mittels WinNonLin (Version 5.2) und Microsoft Excel Office Version 2003, 2007) nach Einkompartimentmodell berechnet. Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Auswertung der drei Konditionen werden durch nicht-parametrische Tests über SPSS (Version 14) auf signifikante Unterschiede überprüft.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Für die Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat und humanem Serum werden folgende Geräte verwendet:

- Wasserbad mit Schüttlervorrichtung GFL-1092 (GFL, Burgwedel)
- Ultra Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen) mit großem Pürrier-Aufsatz
- Zentrifuge (Haereus Biofuge pico) mit max. 13 x 1000/min Umdrehungen
- Waage
- Microprocessor pH-Meter pH 535 (WTW, Weilheim)
- Autosamplergläser
- LC TOF MS: 1100 oa-TOF System (Agilent, Waldbronn) mit 100 x 2.0 mm Polaris C18-Ether 3 µm Säule (Varian, Darmstadt)

Die Analyse der in der Probandenstudie gewonnenen Serumproben erfolgt mittels

- Rapid Trace (Caliper Life Sciences, Rüsselsheim) / Gilson GX-274 ASPEC (Gilson, Limburg-Offheim)
- Varian Bond Elut Certifier HF Kartuschen 300 mg, 3 ml (Varian, Darmstadt)
- TurboVap (Caliper Life Sciences, Rüsselsheim)
- Heizblock (Liebisch, Bielefeld)
- LC TOF MS (Agilent, Waldbronn)

Die Fest-Phasen-Extraktion der Serumproben erfolgt unter Benutzung einer Rapid Trace bzw. einer Gilson Workstation. Die Serumproben werden über basische Extraktion eluiert. Für die Extraktion werden Varian Certifier HF Kartuschen (300 mg, 3 ml) verwendet. Die Messung der aufgearbeiteten Serumproben erfolgt mittels Flugzeitmassenspektrometrie durch MSD TOF (Agilent, Waldbronn).

2.1.2 Chemikalien

Für die Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat und humanem Serum werden folgende Chemikalien verwendet:

- Di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer (0,1 Molar, pH 7,4)
- Natriumfluorid-Salz
- Gesättigte Natriumfluoridlösung, hergestellt aus Natriumfluorid-Salz
- Norkokain 1 mg/ml Lösung, Norbenzoylecgonin 1 mg/ml Lösung (Promochem, Wesel); daraus hergestellter Interner Standard auf Acetonitril-Basis: Norkokain 1 µg/ml, Norbenzoylecgonin 2,5 µg/ml
- Methylphenidat-Hydrochlorid (Novartis, Nürnberg); daraus hergestellte Methylphenidat-Lösung in Methanol (1 mg/ml)
- Ritalinsäure-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, München); daraus hergestellte Ritalinsäure-Lösung in Aqua dest. (1 mg/ml)
- Ethanolische Salzsäure (1,25 molar) (Fluka, Seelze)
- Ethylphenidat-Lösung (0,05 mg/ml)
- Ethanol vergällt

Zur Herstellung von Leberhomogenat wird außerdem folgendes benötigt:

- Leber (je etwa 100g) von im Institut für Forensische Medizin der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main obduzierten Leichen.

Für die Analyse der Serumproben der Probandenstudie werden folgende Chemikalien verwendet:

- Basisches Extraktionsmittel (Dichlormethan, Isopropanol, Ammoniak im Verhältnis 80:20:2)
- Methylphenidat-Lösung in Methanol (1 mg/ml)
- Ritalinsäure-Lösung in Aqua dest. (1 mg/ml)
- Ethylphenidat-Lösung (0,05 mg/ml)
- Interner Standard: Norkokain 1 µg/ml, Norbenzoylecgonin 2,5 µg/ml

Für die Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz:

- Equasym 20 mg Tabletten (UCB, Monheim am Rhein) mit eigener Erlaubnis der Betäubungsmittelausgabe, erteilt durch die Bundesopiumstelle

2.1.2.1 Standardlösungen

2.1.2.1.1 Herstellung der Methylphenidat-Lösung

Methylphenidat-Hydrochlorid (Ciba, Schweiz) wird eingewogen und in Methanol gelöst, so dass eine 1 mg/ml Lösung entsteht. Methylphenidat-Hydrochlorid (269,77 g/Mol) besitzt eine höhere Molmasse als Methylphenidat (233,30 g/Mol). Zur Herstellung einer 1 mg/ml Lösung Methylphenidat werden demnach 1,16 mg Methylphenidat-Hydrochlorid eingewogen und in 1 ml Methanol gelöst, um eine 1 mg/ml Lösung Methylphenidat herzustellen.

2.1.2.1.2 Herstellung der Ritalinsäure-Lösung

Ritalinsäure-Hydrochlorid (Ciba, Schweiz) wird eingewogen und in destilliertem Wasser gelöst, so dass eine 1 mg/ml Lösung entsteht. Versuche zur Löslichkeit von Ritalinsäure in Lösungsmitteln wie Methanol oder Aceton zeigten, dass Ritalinsäure in diesen Lösungsmitteln schlecht löslich war und nur unter Zugabe von Natronlauge gelöst werden konnte. Dagegen ist die Löslichkeit von Ritalinsäure in destilliertem Wasser sehr gut.

2.1.2.1.3 Herstellung der Ethylphenidat-Lösung

Ethylphenidat wird analog zu Markowitz et al. (1999) hergestellt. Dazu werden 50 µl (entspricht 50 µg) Ritalinsäure aus der in 2.1.3.2 hergestellten 1 mg/ml Lösung unter leichtem Luftstrom in einem Autosamplerglas eingedampft. Daraufhin wird die eingedampfte Ritalinsäure mit 1 ml 1,25 molarer ethanolischer Salzsäure überspült, das Gefäß verschlossen und über 24 h im Trockenschrank bei 80°C zur Reaktion belassen. Der Umsatz von Ritalinsäure zu Ethylphenidat wird durch Messung der relativen Peak-Flächen über LC TOF MS bestimmt. Dazu wird die entstandene Lösung 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung werden 50 µl vor der Lagerung im Trockenschrank als Nullwert und 24 h nach der Reaktion im Trockenschrank direkt in das LC TOF MS mit einem Injektionsvolumen von 2 µl eingespritzt. Die Messung der relativen Peak-Flächen nach 24 h zeigt die vollständige Umsetzung der Ritalinsäure zu Ethylphenidat, dargestellt in Abbildung 2-1.

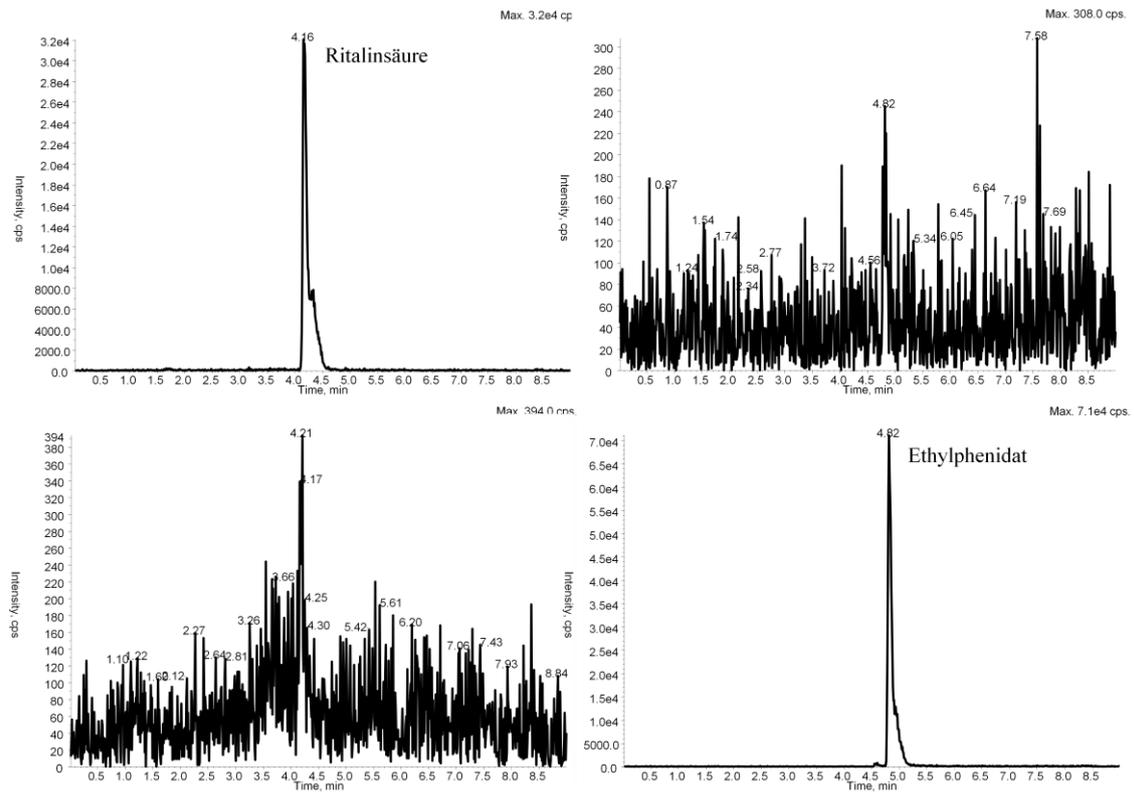
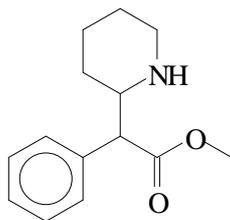


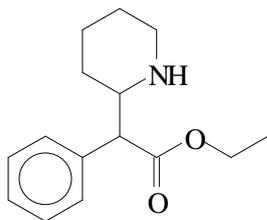
Abbildung 2-1: Chromatogramm zur Bestimmung der Produktreinheit und Identität von Ethylphenidat durch LC TOF MS zum Zeitpunkt 0 (obere Reihe) und nach 24 h (untere Reihe) (links Ritalinsäure (Ausgangsprodukt), rechts Ethylphenidat (Reaktionsprodukt)).

2.1.2.1.4 Herstellung des Internen Standards

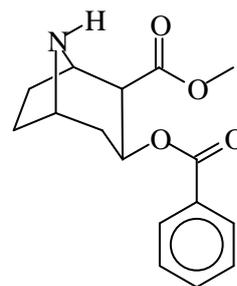
Als Interne Standards für Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure werden auf Grund der chemischen Ähnlichkeit der funktionellen Gruppen (Abbildung 2-2) Norkokain (1 mg/ml Ausgangskonzentration) und Norbenzoyllecgonin (1 mg/ml Ausgangskonzentration) verwendet. Diese werden durch Acetonitril so verdünnt, dass Endkonzentrationen von 1 µg/ml für Norkokain bzw. 2,5 µg/ml für Norbenzoyllecgonin entstehen. Die Internen Standards werden auf Acetonitril-Basis hergestellt, um dadurch einen weiteren Faktor zur Proteinfällung im Leberinkubationsversuch einzubringen.



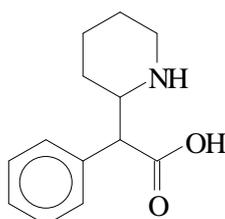
Methylphenidat



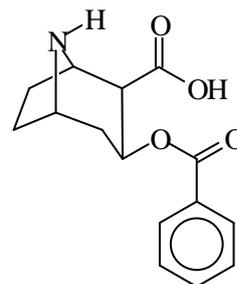
Ethylphenidat



Norkokain



Ritalinsäure



Norbenzoyllecgonin

Abbildung 2-2: Vergleich der Strukturformeln von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) mit dem ISTD (Norkokain für MPH und EPH, Norbenzoyllecgonin für RA).

2.1.2.2 Sonstige Chemikalien

2.1.2.2.1 Herstellung des Phosphat-Puffers

Zur Herstellung des Phosphat-Puffers wird ein 1 molarer Di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer verwendet. Dieser wird auf eine Molarität von 0,1 verdünnt. Der pH -Wert wird durch Natronlauge bzw. Salzsäure auf 7,4 eingestellt, kontrolliert durch Benutzung eines pH-Meters.

2.1.2.2.2 Herstellung der gesättigten Natriumfluorid-Lösung

Natriumfluorid-Salz wird unter Rühren in destilliertem Wasser gelöst, bis eine Sättigung eintritt, die sich durch den Bodensatz des überschüssigen Salzes im Gefäß zeigt. Die Löslichkeit von Natriumfluorid-Salz in destilliertem Wasser liegt bei 4 g auf 100 ml.

2.1.2.2.3 Herstellung von basischem Extraktionsmittel

Basisches Extraktionsmittel wird durch Mischung von Ammoniak, Isopropanol und Dichlormethan im Verhältnis 2:20:80 hergestellt.

2.1.2.2.4 Silanisieren der Reagenzgläser

In Vorversuchen zeigte sich, dass sich Silanisieren der Gläser positiv auf die Analyse der Serumproben, sowohl bei der Aufarbeitung als auch beim Auffangen des Eluats, auswirkt. Die Gläser werden mit Dichlormethylsilan silanisiert und danach mit Toluol und Isopropanol gespült, um schließlich im Trockenschrank getrocknet zu werden.

2.1.3 Biologische Proben

2.1.3.1 Humane Leber

Die für die Inkubationsversuche benötigte humane Leber wird vom Institut für Forensische Medizin der J. W. Goethe-Universität nach Obduktionen der Leichen zur Verfügung gestellt. Dabei wird insbesondere darauf geachtet, die Überschreitung des Autolysezeitraum von 3 Tagen zu vermeiden, um damit die Funktionsfähigkeit der Leberenzyme zu gewährleisten. Außerdem wird die Leber direkt nach Erhalt homogenisiert, um eingefroren zu werden, sodass die Haltbarkeit des Lebermaterials verlängert wird (Dean et al. 1991).

2.1.3.2 Serumproben

Die Leerserumproben stammen aus dem bei -20°C tiefgefrorenem Leerserum-Pool des Instituts für Forensische Toxikologie. Die Reinheit dieser Proben in Bezug auf Methylphenidat und andere Inhaltsstoffe wird über Messung durch GCMS und LC TOF MS bestätigt.

Die Serumproben der hier durchgeführten Probandenstudie werden direkt nach Abnahme des EDTA-Bluts aus der Venenverweilkanüle abgesert und bei -20°C tiefgefroren. So können die Proben bis zur Analyse konserviert werden. Aus jeder Serumprobe werden vor dem Einfrieren $350\ \mu\text{l}$ Serum entnommen und für die Messung der Blutalkoholkonzentration durch Headspace-Gaschromatographie verwendet.

2.1.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Leberinkubationsversuche erfolgt unter Benutzung von Microsoft Excel (Version Office 2003, 2007). Die Bildungsgeschwindigkeiten der

Analyte werden durch die Steigung der relativen Peak-Flächen über den Messzeitverlauf berechnet. Die Regression wird als Maß der Linearität angegeben. Die Signifikanz der Messergebnisse wird nach Annahme einer Normalverteilung durch die Bestimmung des Mittelwerts und dessen Standardabweichung, sowie über Student-t Test bzw. F-Test bestimmt.

Die pharmakokinetischen Daten der hier durchgeführten Probandenstudie werden unter Benutzung von WinNonLin (Pharsight, Version 5.2) berechnet. Unter Annahme eines Einkompartimentmodells werden dort die für die Pharmakokinetik von Methylphenidat und dessen Metaboliten wesentlichen Charakteristika in Form von Verteilungsvolumen in Bezug auf die Bioverfügbarkeit von Methylphenidat (V_f), Area under the curve (AUC), Halbwertszeit der Absorption (K_{01}), Halbwertszeit der Elimination (K_{10}), Latenzzeit (t_{lag}), maximale Konzentration (C_{max}), maximale Zeit (t_{max}), Clearance in Bezug auf die Bioverfügbarkeit von Methylphenidat (Cl_f), extrapolierte AUC vom Zeitpunkt Null bis unendlich (AUC_{inf}) und Mean Residence Time (MRT_{inf}), ebenfalls extrapoliert bis ins Unendliche, bestimmt. Durch die hohe inter-individuelle Heterogenität der pharmakokinetischen Daten der Probanden wird zum Vergleich der drei Studientagbedingungen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen. Über nicht-parametrische Tests, wie den Mann-Whitney-U Test wird mittels SPSS (Version 14) die Signifikanz der Daten festgestellt.

2.1.4.1 Pharmakokinetische Parameter

Die pharmakokinetischen Parameter, die unter Annahme eines Einkompartimentmodells aus den Konzentrations-Zeit-Kurven der Analyte über WinNonLin berechnet werden, umfassen die maximale Konzentration (C_{max}), als maximale Menge des Analyten pro Serumvolumen und die dazugehörige maximale Zeit (t_{max}). Ebenso wird die Area under the Curve (AUC) als Integral der Arzneimittelkonzentration im Serum über die Zeit, zum einen über den Messzeitraum, zum anderen über den Messzeitraum hinaus ins Unendliche extrapoliert (AUC_{inf}), berechnet. Sie ist das Maß für die Substanzmenge im Organismus. Die Latenzzeit (t_{lag}) ist die Zeitdifferenz zwischen Arzneimittelapplikation und dem Zeitpunkt, zu dem der Analyt messbar ist. Durch Berechnung der Absorptionshalbwertszeit (HL K_{01}) können über die Absorption des Arzneimittels bzw. die Bildung der Metaboliten Aussagen gemacht werden. Sie ist die Zeit, die vergeht, damit die Hälfte der Arzneimittelkonzentration aus dem Serum absorbiert wird. Die Eliminationshalbwertszeit (HL K_{10}) ist die Zeit, die während der

Eliminationsphase vergehen muss, damit die Arzneimittelkonzentration im Serum auf die Hälfte abgefallen ist. Sie wird durch das Verteilungsvolumen und die Clearance begrenzt. Die Mean residence time (MRT) ist die mittlere Verweildauer eines intakten Arzneimittelmoleküls im Körper. Sie beinhaltet alle kinetischen Prozesse einschließlich der in-vivo Freisetzung aus der Dosierungsform nach oraler Aufnahme, der Absorption und der Elimination. Sie wird ebenfalls über den Messzeitraum hinaus ins Unendliche extrapoliert. Die Clearance (Cl_f) beschreibt die Elimination des Arzneistoffs aus dem Körper. Sie ist definiert als das Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit von einer Substanz befreit wird. Sie ist hier von der Bioverfügbarkeit von Methylphenidat abhängig. Ebenso wie das Verteilungsvolumen (V_f), definiert als das Flüssigkeitsvolumen, das notwendig ist, um die gesamte Arzneimittelmenge aufzulösen, damit es eine der Plasmakonzentration entsprechende Konzentration aufweist. Da Clearance und Verteilungsvolumen nur fiktive Größen sind, die von der Bioverfügbarkeit der Substanzen abhängen, werden sie durch WinNonLin nur für Methylphenidat bestimmt. Zu Verteilungsvolumen und Clearance von Ethylphenidat und Ritalinsäure kann durch die erhobenen Daten keine Aussage gemacht werden.

2.2 Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat

2.2.1 Herstellung von Leberhomogenat

Leber wird direkt während bzw. nach der Obduktion aus dem Sektionssaal des Instituts für Forensische Medizin der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Es wird darauf geachtet, dass der Autolysezeitpunkt von 3 Tagen nicht überschritten wird. Die Leber wird abgewogen und das Gewicht sorgfältig dokumentiert. Um im Inkubationsversuch eine konstante Konzentration an Lebermaterial zu gewährleisten, wird dem Lebergewicht entsprechend Phosphat-Puffer zur Verdünnung der Leberhomogenats beigefügt. Dabei werden Bedingungen aus den Studien nach Bailey (1995a; 1994; 1995b), der Kokain zusammen mit verschiedenen Alkoholen in Leberhomogenat inkubierte, verwendet. Mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und einer Schere wird die Leber in möglichst kleine Stücke zerteilt und in ein für das Ultra Turrax Gerät geeignetes Zentrifugenglas gegeben. Dieses Zentrifugenglas wird durch ein Becherglas stabilisiert. Zu 100 g zerkleinerte Leber werden 50 ml des

oben hergestellten Phosphat-Puffers gegeben, so dass letztendlich ein Gesamtvolumen des Leberhomogenats von ca. 150 ml entsteht. Das Leber-Puffer-Gemisch wird dann unter Benutzung des großen Pürrier-Aufsatzes des Ultra Turrax zu gleichmäßigem Leberhomogenat verarbeitet. Das Gesamtvolumen des Leberhomogenats wird abgemessen und dokumentiert. Danach wird das entstandene Homogenat möglichst gleichmäßig auf zuschraubbare Plastikgefäße verteilt. Nach der sorgfältigen Beschriftung und Nummerierung der Plastikgefäße, wird das Leberhomogenat bei -80°C bis zur Inkubation eingefroren. Dadurch, dass nachgewiesen wurde, dass die Leberenzyme durch Einfrieren nicht zerstört werden (Dean et al. 1991), kann das Leberhomogenat auf diesem Weg für die folgenden Versuche konserviert werden.

2.2.2 Inkubation über 4 Stunden

Eine bei -80°C tiefgefrorene Portion des in 2.2.1 hergestellten humanen Leberhomogenats wird langsam aufgetaut. Das Wasserbad mit Schüttlervorrichtung wird auf 37°C eingestellt. 1,5 ml Eppendorf-Gefäße werden vorbereitet und sorgfältig mit den Abnahmezeitpunkten beschriftet. In diese Gefäße werden jeweils 10 μl gesättigte Natriumfluorid-Lösung vorgegeben, da Natriumfluorid nachweislich ein Hemmstoff von Esterasen (Dean et al. 1991) ist und somit der Metabolismus von Methylphenidat nach der Probenentnahme verhindert werden kann. Zusätzlich werden 50 μl des Internen Standards, der zur Leberproteinfällung auf Acetonitril-Basis hergestellt wurde, bestehend aus der Lösung von $1\mu\text{g/ml}$ Norkokain und $2,5\mu\text{g/ml}$ Norbenzoylecgonin, dazugegeben und mit der Natriumfluorid-Lösung vermischt. Zur weiteren Hemmung der enzymatischen Reaktion wird ein Eiswasserbad vorbereitet, in dem die abgenommenen Proben bis zur weiteren Probenbearbeitung aufbewahrt werden sollen. Nach Auftauen des Leberhomogenats wird dieses mit 4 ml des Phosphat-Puffers vermischt, um ein Leberhomogenat-Puffer-Gemisch in einem Verhältnis von 2:1 zu erreichen. 1 ml des Phosphat-Puffers wird als Trägerlösung für die Inkubationslösung, bestehend aus 6 μl Methylphenidat (im Ansatz 1 mg/L) und 60 μl Ethanol (im Ansatz 7,9 g/L), separat verwendet. Das Leberhomogenat-Puffer-Gemisch und die Trägerlösungen werden über etwa 10 Minuten getrennt im Wasserbad auf 37°C erwärmt und unter leichtem Schütteln gemischt. Nach 10 Minuten wird die Trägerlösung dem Leberhomogenat-Puffer-Gemisch hinzugefügt und die Zeit bis zur jeweiligen Probenentnahme gemessen. 200 μl Proben werden zu folgenden Zeitpunkten

entnommen: 0 Minuten (Leerwert) - 30 Minuten - 1 Stunde - 2 Stunden - 3 Stunden - 4 Stunden. Die Proben werden in den vorbereiteten Eppendorf Gefäßen mit den sich darin befindlichen Lösungen vermischt und im Eiswasserbad aufbewahrt, bis sie bei höchster Umdrehung zentrifugiert werden. Nach Zentrifugation werden 50 µl des klaren Überstands zur direkten Messung mittels LC TOF MS in vorbereitete Autosamplergläser überführt.

2.2.3 Inkubation über 30 Minuten

Eine bei -80 °C tiefgefrorene Portion des in 2.2.1 hergestellten Leberhomogenats wird langsam aufgetaut. Während des Tauvorgangs wird das Wasserbad mit Schüttlervorrichtung auf eine Temperatur von 37°C vorgewärmt. Da es beim Versuchsaufbau über 4 Stunden (2.2.2) zu keiner kompletten Fällung der Leberprotein bzw. Leberpartikel kam, wird die Methode in Bezug auf die Proteinfällung abgewandelt. Um eine effektive Fällung der Leberprotein/Leberpartikel zu erreichen, wird hierfür Acetonitril im Überschuss verwendet. Alle Konzentrationen von der Probenentnahme bis zum Internen Standard werden beibehalten, damit die Ergebnisse mit dem Versuchsaufbau über 4 Stunden (2.2.2) vergleichbar sind. In 1,5 ml Eppendorf-Gefäße werden 200 µl Acetonitril, 50µl Interner Standard auf Acetonitril-Basis und 10 µl gesättigte Natriumfluorid-Lösung, von der bekannt ist, dass sie die enzymatische Katalyse von Esterasen in der Leber hemmt (Dean et al. 1991), vorgegeben. Zur Probenentnahme werden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet, um die Aufnahme des dickflüssigen Leberhomogenats zu erleichtern. Gleichzeitig werden für den Versuch Trägerlösungen in Phosphat-Puffer vorbereitet. Dazu wird jeweils 1 ml des Phosphat-Puffers verwendet, in die je nach Fragestellung eine variable, vom Versuchsaufbau abhängige Methylphenidatkonzentration bzw. Ethanolkonzentration vorgegeben werden. Bechergläser werden vorbereitet, in denen 3 ml Phosphat-Puffer mit 2 ml des aufgetauten Leberhomogenats vermischt werden. Nach Zugabe der Trägerlösung (siehe 2.2.2) entsteht somit ein Leberhomogenat-Puffer-Gemisch im Verhältnis 2:1, was deutlich stärker konzentriert ist, als es in der Studie von Bailey (1995a) vorgegeben wurde. Die mit dem Leberhomogenat-Puffer-Gemisch gefüllten Bechergläser werden in das Wasserbad gestellt und getrennt von den Trägerlösungen unter leichtem Schütteln gleichmäßig auf 37°C erwärmt. Nach etwa 10 Minuten werden die Trägerlösungen herausgenommen und auf die Bechergläser mit dem Leberhomogenat-Puffer-Gemisch

verteilt und vermischt. Ab diesem Zeitpunkt wird mit Hilfe einer Stoppuhr die Zeit gemessen. Aus praktischen Gründen und weil bei diesen Zeitabständen ein ausreichend linearer Anstieg der Ritalinsäure- und Ethylphenidatbildung nachweisbar ist, werden zu folgenden Zeitpunkten 200 µl Proben in leere Eppendorffgefäße entnommen: bei 10 Minuten - 16 Minuten - 23 Minuten - 30 Minuten. Sofort nach Entnahme der Proben werden diese bei höchster Umdrehung für zwei Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation, durch das bereits ein Großteil der Leberproteine und -partikel ausfällt, werden 50 µl des klaren Überstands in die Eppendorf-Gefäße, in den sich Acetonitril, Interner Standard und Natriumfluorid-Lösung befinden, überführt und vermischt. Das dabei entstandene Gemisch wird ein weiteres Mal für drei Minuten bei höchster Umdrehung zentrifugiert. 50 µl des klaren Überstands werden zur direkten Analyse mittels LC TOF MS in die vorab beschrifteten Autosamplergläser überführt.

2.2.4 Validierung des Leberinkubationsversuchs

Als Standardkonzentrationen für alle folgenden Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat werden folgende Inkubationskonzentrationen für Methylphenidat und Ethanol in Anlehnung an die Versuche von Bailey für Kokain und Propanol (1995a) festgelegt. Für Methylphenidat werden 6 µl einer im Ansatz 1mg/L Lösung verwendet, für Ethanol 60 µl einer 98 % Lösung, was 7,9 g/L Ethanol im Ansatz entspricht. Zur Validierung der Reproduzierbarkeit und Laborpräzision der neu entwickelten analytischen Methode zum Nachweis der Ethylphenidatbildung unter dieser Standardbedingung, werden die Steigungen und die Regression der relativen Peak-Flächen von Ethylphenidat über den Messzeitverlauf an 8 Versuchstagen mit n=3 Versuchen derselben Leber bestimmt. Die Probenentnahme erfolgt auf Grundlage der Inkubationsversuche über 30 Minuten und aus praktischen Gründen bei 10 – 16 – 23 – 30 Minuten (siehe 2.2.3).

2.2.5 Inkubation ohne Leberhomogenat

Bei Inkubation von Methylphenidat ohne bzw. zusammen mit Ethanol bzw. von Ritalinsäure zusammen mit Ethanol in Phosphat-Puffer, soll untersucht werden, in wie weit die Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat von humanem Leberhomogenat abhängt. Dazu wird im in 2.2.3 beschriebenen Versuchsaufbau nach Standardbedingung

das Leberhomogenat durch 6 ml Phosphat-Puffer (0,1 molar, pH 7,4) ersetzt. Zum Phosphat-Puffer, der ebenso wie das Leberhomogenat unter leichtem Schütteln auf 37°C erwärmt wird, werden die Inkubationslösungen, die nur Methylphenidat bzw. Methylphenidat und Ethanol bzw. Ritalinsäure enthalten, zugefügt. Die Entnahme und Aufbearbeitung der Proben erfolgt nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode. Proben werden bei 10 - 20 - 30 - 60 -120 -180 - 240 Minuten entnommen und mittels LC TOF MS gemessen.

2.2.6 Inkubation in Leberhomogenat ohne Methylphenidat

Bei Inkubation von Ritalinsäure und Ethanol in humanem Leberhomogenat soll die Abhängigkeit der Ethylphenidatbildung von Methylphenidat untersucht werden. Die Ausgangsbedingung für die Verdünnung des Leberhomogenats bleibt, wie in 2.2.3 beschrieben, erhalten. Dem Leberhomogenat wird nach der Erwärmung im Wasserbad an Stelle des Methylphenidats Ritalinsäure (im Ansatz ebenfalls 1 mg/L) zusammen mit Ethanol beigemischt. Proben werden bei 10 – 20 – 30 – 60 – 120 – 180 – 240 Minuten entnommen und nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode bearbeitet. Die Bildung von Ethylphenidat wird mittels LC TOF MS gemessen.

2.2.7 Inkubation mit Enzymhemmung durch Natriumfluorid

Ob sowohl die Bildung von Ritalinsäure als auch die von Ethylphenidat enzymatisch von einer Esterase katalysiert werden, soll bei Inkubation unter Zusatz von Natriumfluorid für n=3 untersucht werden. Dabei wird der in 2.2.3 verwendete Versuchsaufbau, die Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in den dort beschriebenen Konzentrationen, übernommen. Jedoch werden 200 µl einer gesättigten 4 % Natriumfluoridlösung zusätzlich in jede Inkubationslösung appliziert. Gesättigte Natriumfluorid-Lösung gilt als Hemmstoff von Esterasen und hemmt nachweislich ebenfalls die Veresterung von Kokain in Gegenwart von Ethanol zu Kokaethylen (Dean et al. 1991). Proben werden aus praktischen Gründen bei 10 – 16 – 23 – 30 Minuten entnommen und wie in 2.2.3 beschrieben bearbeitet. Die Bildungsgeschwindigkeiten von Ritalinsäure und Ethylphenidat werden mittels LC TOF MS gemessen und mit dem standardisierten Versuchsaufbau ohne Natriumfluoridlösung (siehe 2.2.3) derselben Leber verglichen.

2.2.8 Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Kokain

Da angenommen wird, dass die Umesterung von Methylphenidat zu Ethylphenidat in Anwesenheit von Ethanol über das selbe Enzym, die humane Carboxylesterase 1A, katalysiert wird, das ebenfalls am Metabolismus von Kokain in Anwesenheit von Ethanol zu Kokaethylen beteiligt ist, wird untersucht, ob die gleichzeitige Inkubation von Methylphenidat, Kokain und Ethanol sich hemmend auf die Bildung von Ethylphenidat bzw. Ritalinsäure und Kokaethylen bzw. Benzoylecgonin auswirkt. Dazu werden äquimolare Mengen von Methylphenidat und Kokain der Trägerlösung mit Ethanol (60 µl entspricht 7,9 g/L Alkohol) wie in 2.2.3 beschrieben im Leberhomogenat-Puffer-Gemisch inkubiert. Methylphenidat wird in der Ausgangskonzentration 6µl einer im Ansatz 1 mg/L Lösung appliziert, Kokain in einer äquimolaren Konzentration von 7,8 µl einer im Ansatz 1 mg/L Lösung für n=5. Proben werden bei 10 - 16 - 23 - 30 Minuten entnommen und wie in 2.2.3 beschrieben bearbeitet, bevor sie durch LC TOF MS ausgewertet und mit einer Standardinkubation ohne Kokain des selben Leberhomogenats verglichen werden.

2.2.9 Inkubationen mit Variation der Ethanolkonzentration

Um die Abhängigkeit der Ethylphenidat bzw. Ritalinsäurebildung von der Konzentration des inkubierten Ethanols zu untersuchen, wird in den Inkubationen die Ethanolkonzentration bei konstanter Methylphenidatkonzentration variiert. Dazu wird Ethanol in den nachfolgenden Konzentration der Inkubationslösung, die standardisiert 6 µl Methylphenidat (entspricht im Ansatz 1 mg/L) enthält, zugefügt: 0 µl (0 g/L) - 3 µl (0,4 g/L) - 10 µl (1,3 g/L) - 20 µl (2,6 g/L) - 40 µl (5,3 g/L) - 60 µl (7,9 g/L) Ethanol. Proben werden bei 10 - 16 - 23 - 30 Minuten entnommen und wie in 2.2.3 beschrieben bearbeitet, bevor sie mittels LC TOF MS ausgewertet werden.

2.2.10 Inkubationen mit Variation der Methylphenidatkonzentration

Um die Abhängigkeit der Ethylphenidatbildung von der Methylphenidatkonzentration zu untersuchen, wird in den Inkubationen die Methylphenidatkonzentration bei konstanter Ethanolkonzentration variiert. Methylphenidat wird in den folgenden Konzentrationen inkubiert: 2 µl (0,3 mg/L) - 4 µl (0,7 mg/L) - 6 µl (1,0 mg/L) - 8 µl

(1,3 mg/L) werden den 60 µl (7,9 g/L) Ethanol in den Inkubationslösungen beigemischt (jeweils n=5). Proben werden bei 10 – 16 – 23 – 30 Minuten entnommen und wie in 2.2.3 beschrieben bearbeitet, bevor sie mittels LC TOF MS analysiert werden.

2.3 Inkubationsversuche in humanem Serum

2.3.1 Inkubation über 4 h

Da die Serumproben, die in der Probandenstudie gewonnen werden, bis zur Analyse mittels LC TOF MS gekühlt aufbewahrt werden und da bekannt ist, dass Kokain in Serum metabolisiert wird (Mattes et al. 1996), wird die Stabilität von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure in humanem Serum untersucht. Dazu wird Methylphenidat in der standardisierten Konzentration der Leberinkubationen (1 mg/L) zusammen mit Ethanol (7,9 mg/L) ebenfalls in standardisierter Konzentration in 6 ml Leerserum (pH 8), das vom Institut für Forensische Toxikologie über den Blutspendedienst des Universitätsklinikums der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main bezogen wird und dessen Reinheit durch Messung über GCMS und LC TOF MS überprüft wurde, über 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Proben werden bei 0 – 1 – 2 – 3 – 4 Stunden entnommen und wie in den Leberinkubationen (2.2.3) beschrieben, bearbeitet, bevor sie mittels LC TOF MS analysiert werden.

2.3.2 Inkubation über 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen

Um signifikante Unterschiede der Seruminkubation unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wird Methylphenidat zusammen mit Ethanol mit bzw. ohne Serum (pH 7,4) für jeweils n=5 bei 37°C inkubiert. Proben werden zu zwei Zeitpunkten, bei 0 und 2 h entnommen. Die Differenzen der relativen Peak-Flächen beider Zeitpunkte von Ethylphenidat und Ritalinsäure werden berechnet und verglichen.

2.3.2.1 Inkubation unter Standardbedingungen in Phosphat-Puffer

Um die alkalische Hydrolyse von Methylphenidat zu Ritalinsäure näher zu untersuchen, wird Methylphenidat zusammen mit Ethanol in Phosphat-Puffer (pH 7,4, 0,1 molar) für n=5 Ansätze inkubiert. Proben werden bei 0 und 2 h entnommen. Die Probenbearbeitung folgt dem in 2.2.3 beschriebenen Verfahren, bevor die Proben mittels LC TOF MS analysiert werden. Die Differenzen der relativen Flächen von Ritalinsäure und Ethylphenidat beider Zeitpunkte werden mit den anderen Versuchsbedingungen verglichen.

2.3.2.2 Inkubation unter Standardbedingungen

Um die Stabilität von Methylphenidat bei Inkubation in Serum näher zu untersuchen, wird Methylphenidat zusammen mit Ethanol in Serum, dessen pH-Wert durch verdünnte Salzsäure auf 7,4 eingestellt wurde, inkubiert (n=5). Proben werden nach dem in 2.2.3 beschriebenen Verfahren bei 0 und 2 h entnommen und ausgewertet.

2.3.2.3 Inkubation mit Natriumfluoridhemmung

Um einen möglichen enzymatische Prozess am Metabolismus von Methylphenidat und der Bildung von Ethylphenidat bzw. Ritalinsäure in der Seruminkubation zu untersuchen, wird Methylphenidat zusammen mit Ethanol unter Zusatz von 200 µl Natriumfluorid-Lösung in Serum (pH 7,4) inkubiert. Proben werden bei 0 und 2 h entnommen und nach der in 2.2.3 aufgeführten Methode bearbeitet und ausgewertet.

2.4 Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz

Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Methylphenidat und dessen Metaboliten Ritalinsäure und Ethylphenidat, wird eine Probandenstudie nach GCP-Richtlinie (GCP-Verordnung) geplant. Diese soll Aufschluss darüber geben, in wie weit Ritalinsäure beim Metabolismus von Methylphenidat entsteht und wie viel Ethylphenidat bei kombinierter Einnahme zusammen mit Ethanol gebildet wird, vor allem unter Berücksichtigung der Einnahmereinfolge. Die Studie muss vor der Durchführung nach den gesetzlichen Regelungen des Arzneimittelgesetzes (AMG) zur Genehmigung

der lokalen Ethik-Kommission, sowie der Bundesbehörde vorgelegt, sowie dem Regierungspräsidium in Darmstadt angemeldet werden.

2.4.1 Gesetzliche Voraussetzung und Antragstellung

Die Studie wird nach den Richtlinien der „Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen (GCP - Verordnung)“ vom 9. August 2004, die durch das Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherung verabschiedet wurde, durchgeführt (GCP-Verordnung). Diese bezieht sich auf das Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (AMG). Zweck dieser Verordnung ist die Einhaltung der Guten Klinischen Praxis in der Planung, Durchführung und Dokumentation klinischer Prüfungen am Menschen. Sie dient der Gewährleistung der Rechte, der Sicherheit und des Wohlergehens der betroffenen Personen, die als Probanden an der Studie teilnehmen und der Glaubwürdigkeit der Ergebnisse der Prüfung. Sie regelt die Aufgaben, Verantwortungsbereiche und Verfahren hinsichtlich der Planung, Genehmigung, Durchführung und Überwachung von klinischen Prüfungen am Menschen nach § 4 Abs. 23 des Arzneimittelgesetzes sowie die Dokumentation und Berichterstattung dieser. Zur Genehmigung der hier durchgeführten klinischen Studie ist deshalb die Antragstellung durch den Sponsor an die Bundesbehörde und die örtliche Ethik-Kommission nötig. Der Antrag muss folgende Angaben und Unterlagen laut GCP-Verordnung enthalten: die Kopie des Bestätigungsschreibens für die von der Europäischen Datenbank vergebende EudraCT-Nummer des Prüfplans, ein vom Sponsor oder dessen Vertreter unterzeichnetes Begleitschreiben in deutscher Sprache, das die EudraCT-Nummer, den Prüfplancode des Sponsors und den Titel der klinischen Prüfung enthält und auf Besonderheiten der klinischen Prüfung hinweist, der vom Hauptprüfer oder dem Leiter der klinischen Prüfung sowie vom Sponsor oder seinem Vertreter unterzeichnete Prüfplan unter Angabe des vollständigen Titels der klinischen Prüfung, der Fassung und des Datums, Name und Anschrift des Sponsors, Namen und Anschriften der Einrichtungen, die als Prüfstelle oder Prüflabor in die klinische Prüfung eingebunden sind, sowie des Hauptprüfers und des Leiters der klinischen Prüfung, Angaben über die Berufe von Prüfern, die nicht Arzt sind, der wissenschaftlichen Anforderungen des jeweiligen Berufs und der seine Ausübung voraussetzenden Erfahrungen in der Patientenbetreuung

sowie Darlegung, dass der jeweilige Beruf für die Durchführung von Forschungen am Menschen qualifiziert und Darlegung des besonderen Gegebenheiten der klinischen Prüfung, die die Prüfertätigkeit eines Angehörigen des jeweiligen Berufs rechtfertigen, Prüferinformation, Bezeichnungen und Charakterisierung der Prüfpräparate und Wirkstoffe, Gegenstand der klinischen Prüfung und deren Ziele, Anzahl, Alter und Geschlecht der betroffenen Personen, Erläuterungen der Kriterien zur Auswahl der betroffenen Personen sowie der hierzu zu Grunde gelegten statistischen Erwägungen, Begründung dafür, dass die gewählte Geschlechterverteilung in der Gruppe der betroffenen Personen zur Feststellung möglicher geschlechtsspezifischer Unterschiede bei der Wirksamkeit oder Unbedenklichkeit des geprüften Arzneimittels angemessen ist, der Plan der Weiterbehandlung und medizinischen Betreuung der betroffenen Personen nach dem Ende der klinischen Prüfung, die Bestätigung, dass betroffene Personen über die Weitergabe ihrer pseudonymisierten Daten im Rahmen der Dokumentations- und Mitteilungspflichten nach §12 und §13 an die dort genannten Empfänger aufgeklärt werden. Zusätzlich werden der Ethikkommission folgende Angaben gemacht: Erläuterung der Bedeutung der klinischen Prüfung, Bewertung und Abwägung der vorhersehbaren Risiken und Nachteile der klinischen Prüfung gegenüber dem erwarteten Nutzen, Angaben zur Finanzierung, Lebensläufe und Qualifikationsnachweise der Prüfer, Angaben zu möglichen wirtschaftlichen und anderen Interessen der Prüfer im Zusammenhang mit den Prüfpräparaten, Angaben zur Eignung der Prüfstelle, Informationen und Unterlagen, die die betroffenen Probanden erhalten, in deutscher Sprache, Beschreibung der vorgesehenen Untersuchungsmethode und eventuelle Abweichungen von den in der medizinischen Praxis üblichen Untersuchungen, Beschreibung der vorgesehenen Verfahrensweise, mit der verhindert werden soll, dass betroffene Personen gleichzeitig an mehreren klinischen Prüfungen oder Forschungsprojekten teilnehmen oder vor Ablauf einer erforderlichen Karenzzeit an der klinischen Studie teilnehmen, Beschreibung, wie der Gesundheitszustand gesunder betroffener Personen dokumentiert werden soll, Nachweis einer Versicherung nach §40 Abs. 1 Satz 3 Nr. 8 und Abs. 3 des Arzneimittelgesetz, hinsichtlich der der Entschädigung der betroffenen Personen getroffene Vereinbarungen, Erklärung zur Einhaltung des Datenschutzes, alle wesentlichen Elemente der zwischen Sponsor und der Prüfstelle vorgesehenen Verträge, Kriterien für das Aussetzen oder die vorzeitige Beendigung der klinischen Prüfung.

Zur Verwendung bzw. Ausgabe von Methylphenidat als Prüfsubstanz ist außerdem von der Prüfstelle, sowie von der Apotheke, über die die Prüfsubstanz bezogen werden soll, ein Antrag an die Bundesopiumstelle zu stellen, der die Sicherungen des Aufbewahrungsortes der Prüfsubstanz, sowie die Qualifikation des Hauptprüfers und die Zielsetzung der Studie beinhaltet, da Methylphenidat dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt. Das zuständige Regierungspräsidium wird ebenfalls von der Durchführung der Studie informiert.

Nach Abschluss der Studie wird diese bei Ethik-Kommission und Bundesbehörde durch einen Studienabschlussbericht abgemeldet.

2.4.2 Aufbau und Zielsetzung der Probandenstudie

Die hier durchgeführte Probandenstudie wird als klinische Pilotstudie der Phase I geplant, da sie Ethylphenidat als eine neue aktive Substanz bei gesunden Probanden untersucht. Ziel ist es, an 3 Studientagen, an denen verschiedene Einnahmebedingungen herrschen, zu messen, ob es zu signifikanten Unterschieden der Pharmakokinetik von Methylphenidat und dessen Abbauprodukten Ritalinsäure und Ethylphenidat bei Änderung und Vergleich der Einnahmereinfolge der Prüfsubstanzen Methylphenidat und Ethanol kommt. Zur Kontrolle wird an einem Studientag Methylphenidat ohne Alkohol eingenommen.

2.4.3 Rekrutierung der Probanden und Probandenkollektiv

Vor Studienbeginn werden 10 männliche Probanden, hauptsächlich Medizinstudenten, rekrutiert, da anzunehmen ist, dass sich der Metabolismus von Methylphenidat bei weiblichem und männlichem Geschlecht unterscheidet (Patrick et al. 2007). Diese erfüllen folgende Einschlusskriterien: sie sind männlich, im Alter zwischen 18 und 40 Jahren alt und nach Anamnese, festgelegten Laborparametern und einer orientierenden internistischen und neurologischen Untersuchung gesund. Als dafür vorgegebene Laborparameter dienen Nierenwerte (Kreatinin und Harnstoff), Leberwerte (GPT, GOT), Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Cl^-), Gerinnungswerte (Quick, TZ, Thrombozytenzahl) und das große Blutbild, sowie TSH als Marker für die Schilddrüsenfunktion. In der orientierenden internistischen und neurologischen Untersuchung wird besonders Wert darauf gelegt, den Gesundheitsstaus der Probanden anhand der kardiovaskulären und

neurologischen Funktion zu bestimmen. Die kardiovaskuläre Untersuchung beinhaltet im Speziellen die Inspektion und Auskultation von Herz und Lungen, ebenso wie die Bestimmung der Vitalparameter (Blutdruck und Puls), die während der Studientage ebenfalls überwacht werden. Neurologisch werden die Reflexe auf Seitengleichheit und Ausprägung überprüft und die Hirnnerven untersucht. Um eine Drogenabhängigkeit auszuschließen, wird bei der Rekrutierung und zu Beginn eines jeden Studientages der gewonnene Urin einem Drogenscreening unterzogen. Die Ausschlusskriterien werden anhand des Nebenwirkungsspektrums von Methylphenidat bzw. Ethanol festgelegt und bei der Rekrutierung durch eine ausführliche Anamnese abgefragt. Die Ausschlusskriterien beinhalten eine vorbestehende Therapie, den chronischen Missbrauch und/oder die Substanzabhängigkeit von Methylphenidat, Drogenabhängigkeit, Alkoholismus, vorbestehende Lebererkrankungen, Alkoholempfindlichkeitsstörung, das akute Stadium eines Schlaganfalls, Epilepsieneigung, schwere Depressionen, schizophrene Symptome, Anorexia nervosa, eine psychopathologische Persönlichkeitsstruktur, eine Vorgeschichte mit aggressivem Verhalten und Suizidgefährdung, in der Familienanamnese beschriebene motorische Tics, Tourette-Syndrom und andere motorischen Störungen, schwere Hypertonie, Hyperthyreoidismus, Angina pectoris, kardiale Arrhythmien, Glaukom, Thyreotoxikose, die gleichzeitige Einnahme von MAO-Inhibitoren bzw. deren Einnahme innerhalb der letzten 2 Wochen und bekannte Überempfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff oder sonstigen Bestandteilen wie z.B. Laktose (Galaktose-Intoleranz, Lapp-Laktasemangel oder Glukose-Galaktose-Malabsorption).

Die 10 Probanden werden außerdem bereits während der Rekrutierung über die Ziele und Belastungen der Studie aufgeklärt und es wird auf mögliche Gefahren und Nebenwirkungen hingewiesen. Auch die Verwendung der im Rahmen der Studie entstehenden Ergebnisse und die dabei bestehende Pseudonymisierung der Probandendaten und die Datenschutzbestimmungen werden besprochen und dokumentiert. Die Teilnahme wird bestätigt, wenn die Einverständniserklärung unterschrieben wurde. Im Rahmen der Rekrutierung, ebenso wie an jedem einzelnen Studientag wird ein Urin-Drogenscreening durchgeführt, um eine eventuelle Drogenabhängigkeit auszuschließen. Außerdem werden die Vitalparameter (Puls, Blutdruck) überprüft und dokumentiert, um sie mit den Werten der an den Studientagen gemessenen Parameter zu vergleichen.

2.4.4 Geplanter Ablauf der Studientage

3 verschiedene Konditionen in Bezug auf die Einnahmereinfolge von Methylphenidat und Ethanol als Prüfsubstanzen sollen an 3 Studientagen untersucht werden. Die drei Konditionen beinhalten die alleinige Einnahme von Methylphenidat (MPH alleine), die Aufnahme von Ethanol 30 Minuten vor der Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH) und die umgekehrte Reihenfolge, die Einnahme von Methylphenidat 30 Minuten vor Ethanolaufnahme (MPH+Ethanol). Methylphenidat wird dabei zu jeder der drei Studientagbedingungen in einer therapeutischen Dosis von 20 mg (Equasym, UCB) eingenommen, Ethanol wird in Form von Wein bis zu einer Blutalkoholkonzentration von ca. 0,8 g/kg (12 Vol% \approx 9,6 g/100ml) bei Durchführung der zweiten und dritten Kondition verabreicht.

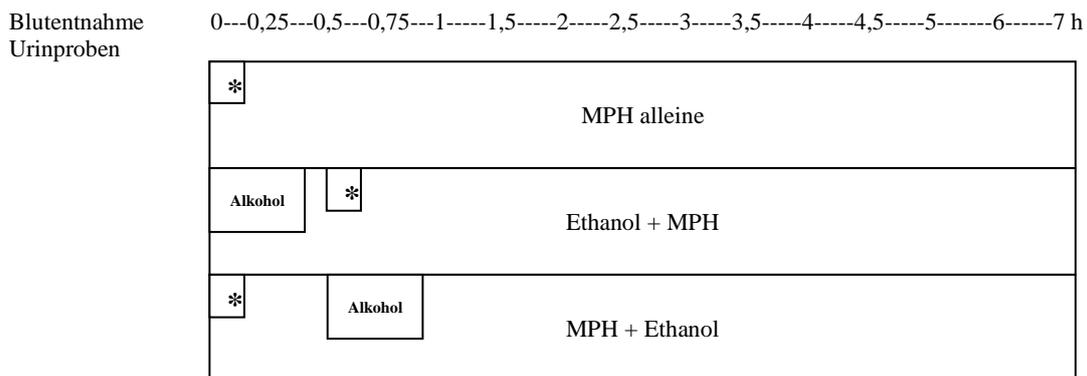


Abbildung 2-3: Ablauf der Studientage (*= Methylphenidat, Alkohol = Wein bis zu einer BAK von ca. 0,8 g/kg)

Die Probanden werden an allen drei Studientagen, gebeten zur Durchführung der Studie nüchtern in das Institut für Forensische Toxikologie zu kommen. Damit sollen einheitliche Bedingungen in Bezug auf die Einnahme der Prüfsubstanzen geschaffen werden. Dort wird ein einheitliches Frühstück vollständig eingenommen, bevor die Venenverweilkanülen gelegt werden. Nach Einnahme der jeweiligen Methylphenidatdosis, werden in der ersten Stunde viertelstündlich, dann halbstündlich dann stündlich insgesamt 15 Blutproben einer geringen Blutmenge von 10 ml pro Zeitpunkt entnommen, sofort abzentrifugiert, abesert und im Kühlschrank bei -20° bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt. Urin wird ab der Einnahme der Prüfsubstanzen gesammelt. Zwischen den einzelnen Studientagen muss zum Schutz der Probanden

mindestens ein zeitlicher Abstand von 5 Tagen liegen, um die vollständige Elimination von Methylphenidat zu gewährleisten.

2.4.5 Bearbeitung von Serumproben

Das nach der Blutentnahme durch die Venenverweilkanüle abgenommenen EDTA-Blut wird direkt nach Abnahme zentrifugiert, abesert und bei -20°C bis zur Analyse eingefroren. Am Tag der Analyse werden die Seren aufgetaut und auf die Substanzen Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure auf der Basis der neu entwickelten analytischen Methode, deren Qualität nach den Richtlinien der GTFCH bestätigt wurde (2.4.7), analysiert. Die Reinsubstanzen von Methylphenidat und Ritalinsäure stehen als Feststoff zur Verfügung. Referenzlösungen von Methylphenidat und Ritalinsäure mit einer Konzentration von 1mg/ml werden mit Hilfe von Lösungsmitteln hergestellt. Ethylphenidat wird nach Angabe von Markowitz et al. (1999) mittels Ethanolischer-Salzsäure ($1,25$ molar) und eingedampfter Ritalinsäure synthetisiert. Diese Lösungen werden als Referenzen für die gleichzeitige Serumkalibration benutzt. Zur Messung der Substanzen in den Serumproben wird eine Festphasen-Extraktion von 1 ml Serum in silanisierten Gläsern in Anlehnung an das Standard-Protokoll für basische Substanzen (Toennes, Kauert 2001) durchgeführt und die Analyse mittels HPLC gekoppelt an eine Flugzeitmassenspektrometrie angeschlossen. Dazu werden die abgedampften Extrakte mit $2 \times 100\mu\text{l}$ Methanol zu einer Vorgabe von $50\mu\text{l}$ Isopropanolischer Salzsäure überspült, erneut abgedampft und wiederum mit $50\mu\text{l}$ Acetonitril:Wasser ($80:20$, v/v), das $0,1\%$ Ameisensäure beinhaltet, überspült. Von dieser Lösung werden $4\mu\text{l}$ unter der Benutzung eines Agilent 1100 oa-TOF Systems (Waldbronn) in positivem Ionisation Modus (ESI) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt in einem Massenspektrum von m/z 100 to 1000 bei gleichzeitiger Korrektur der Massenachse mittels zweier Kalibratoren. Es wird eine $100 \times 2,0\text{ mm}$ Polaris C18-Ether $3\mu\text{m}$ Säule (Varian, Darmstadt) bei 50°C bei einem Acetonitril/Ameisensäure $0,1\%$ Gradienten (10 zu 100% , v/v) von $0,4\text{ ml/Min}$ über einen Zeitraum von 9 Minuten benutzt.

2.4.6 Evaluierung der Serumproben

Die Serumproben der Studienprobanden, gesammelt über den jeweiligen Studientag, werden durch die in 2.4.5 beschriebene Methode auf Methylphenidat und dessen

Metabolite analysiert. Die daraus resultierenden Konzentrations-Zeit-Kurven der Probanden werden im Vergleich der verschiedenen Studientagbedingungen aufgetragen. Daraus werden die pharmakokinetischen Eigenschaften wie Verteilungsvolumen, Area under the curve, Absorptionshalbwertszeit, Eliminationshalbwertszeit, Latenzzeit, t_{max} , C_{max} , Clearance, AUC_{inf} und Mean Residence Time (siehe 2.1.6.1) in Abhängigkeit zu den verschiedenen Studientagbedingungen über WinNonLin (Version 5.3) und Microsoft Excel (Version Office 2003, 2007) berechnet und über nicht-parametrische Tests unter Verwendung von SPSS (Version 14) verglichen.

2.4.7 Validierung der neu entwickelten analytischen Methode

Die Validierung der neu entwickelten analytischen Methode zur Bestimmung von Methylphenidat und dessen Metaboliten sowohl in den Leberinkubationsversuchen als auch aus den Serumproben der hier durchgeführten Probandenstudie, basiert auf der Validierungsrichtlinie der GTFCh (Peters F. T. et al. 2004). Sie ist Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse und erforderlich für die Dokumentation der Eignung des Analyseverfahrens. Die Validierung basiert auf verschiedenen Parametern, die der Reproduzierbarkeit des analytischen Verfahrens dienen. Die Selektivität beschreibt die Erfassung verschiedener nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen wie Metabolite, Verunreinigungen oder Abbauprodukte. Sie dient der eindeutigen Erfassung des Analyten und ist Voraussetzung für die Qualität der analytischen Methode. In der Praxis werden dazu mindestens sechs Leerproben aus verschiedenen Chargen aufgearbeitet, sowie mindestens zwei Nullproben, die ausschließlich Internen Standard enthalten und Leerproben mit anderen in authentischen Proben zu erwarteten Substanzen/Metabolite. Die Linearität der Kalibration, das heißt die Fähigkeit innerhalb eines gegebenen Bereichs Testergebnisse zu liefern, die direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe sind, wird innerhalb des Kalibrationsbereichs bestimmt. Der Kalibrationsbereich ist dabei das Intervall zwischen oberer und unterer Konzentration des Analyten in der Probe, für das ein geeignetes Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität gezeigt werden kann. In der Praxis werden dabei Kalibratoren bei mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen, die möglichst gleichmäßig über den Kalibrationsbereich verteilt sind, durch Aufstocken von Leerserum hergestellt. Unter Wiederholbedingungen werden sechs Bestimmungen bei

jeder Konzentration durchgeführt. Die Ausreißer werden mittels Grubbs-Test mit einem Signifikanzniveau von 95% getestet. Es dürfen insgesamt nicht mehr als zwei Ausreißer und diese nicht im gleichen Konzentrationsniveau auftreten. Weiterhin wird die Varianzhomogenität mittels F-Test zwischen höchster und niedrigster Konzentration oder mittels Cochran-Test über alle Konzentrationen (Signifikanz 99%) bestimmt. Ist die Varianzhomogenität gegeben, wird eine lineare Regression und der statistische Test der Anpassung mittels Linearitätstest nach Mandel (Signifikanz 99%) durchgeführt. Ist keine Varianzhomogenität gegeben, im Regelfall für Kalibrationsbereiche, die mehr als eine Zehnerpotenz umfassen, wird der Kalibrationsbereich so weit eingeschränkt, bis eine Varianzhomogenität besteht. Die Genauigkeit, das heißt der Abstand eines einzelnen Wertes vom Sollwert, hervorgerufen durch systematische und zufällige Fehler, wird in der Praxis folgendermaßen bestimmt. Es wird ein homogener Pool von Qualitätskontrollproben bei mindestens zwei (niedrig und hoch relativ zum Kalibrationsbereich) durch Aufstockung von Leerserum hergestellt. Die einzelnen Proben werden aliquotiert und bei normalen Bedingungen (-20°C) gelagert. Es findet eine Analyse von mindestens zwei dieser Proben jeder Konzentration an mindestens acht verschiedenen Tagen statt. Der systematische Fehler wird aus dem Mittelwert aller Bestimmungen und dem Sollwert bei jeder Konzentration berechnet. Werte innerhalb eines Intervalls von $\pm 20\%$ nahe der Bestimmungsgrenze gelten als akzeptabel. Die Richtigkeit ist der Abstand des Mittelwerts vom Sollwert, das Ausmaß wird als systemischer Fehler ausgedrückt. Die Präzision ist der Grad der Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Das Maß wird als eine Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Die Wiederholpräzision ist die Präzision unter Bedingungen, bei denen unabhängige Messergebnisse mit identischem Probenmaterial im selben Labor von derselben Person mit derselben Gerätschaft innerhalb kurzer Zeitintervalle erhalten werden. Die Laborpräzision ist die Präzision bei der Bestimmung derselben Probe innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung eines Parameters wie Person, Gerät oder Zeit. Die Vergleichspräzision (Reproduzierbarkeit) ist die Präzision unter Bedingungen, bei denen Messergebnisse mit derselben Methode mit identischem Probenmaterial in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Personen mit verschiedenem Equipment erhalten werden. Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist der kleinste Analytgehalt, der mit vorgegebener Sicherheit (99%) vom Leerwert unterscheidbar ist. Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) ist

der kleinste Gehalt, der mit der vorgegebenen relativen Ergebnisunsicherheit (33%, Signifikanz 99%) bestimmt werden kann.

3 ERGEBNISSE

3.1 Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat

3.1.1 Inkubation über 4 Stunden

6 ml des humanen Leberhomogenats (pH 7,4) werden bei 37°C unter leichtem Schütteln mit 6 µl einer im Ansatz 1 mg/L Methylphenidat-Lösung und 60 µl Ethanol (entspricht im Ansatz 7,9 g/L Alkohol) über einen Zeitraum von 4 Stunden inkubiert. Proben werden wie in 2.2.3 beschrieben bei 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 Stunden entnommen und bearbeitet.

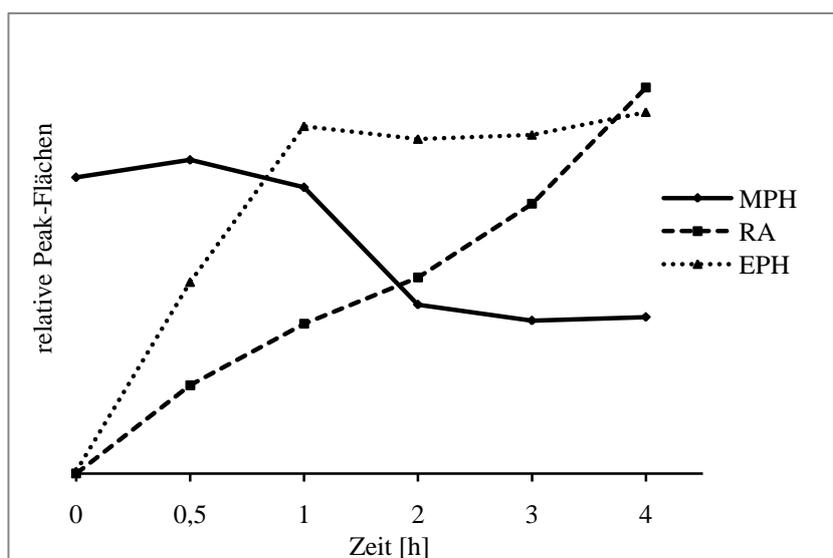


Abbildung 3-1: Relative Peak-Flächen von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) bei Inkubation über 4 h (EPH und RA auf der Sekundärachse).

Die relativen Peak-Flächen von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat werden über LC TOF MS gemessen. Für Methylphenidat und Ethylphenidat wird als Interner Standard Norkokain (1 µg/ml) verwendet, für Ritalinsäure Norbenzoylecgonin (2,5 µg/ml). Zur Steigerung der Genauigkeit der Messung werden die relativen Peak-Flächen der Analyte durch die relativen Peak-Flächen des jeweiligen Internen Standards

dividiert. Abbildung 3-1 zeigt den Verlauf der relativen Peak-Flächen von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat zu den Entnahmezeitpunkten.

Methylphenidat nimmt über 4 Stunden im Verlauf kontinuierlich ab. Ritalinsäure wird über den gesamten Messzeitraum nahezu linear gebildet. Ethylphenidat wird ebenfalls zu Beginn der Messung bis zu einer Stunde nach Messbeginn nahezu linear gebildet. Nach der ersten Stunde stagniert die Bildung von Ethylphenidat, was sich, wie der Verlauf der relativen Peak-Flächen von Ritalinsäure, auf den Verlust der Enzymstabilität nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C zurückführen lässt. Außerdem zeigt dieser Versuch über 4 Stunden, dass für eine Messreihe zum Vergleich der Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat der Messzeitraum auf 30 Minuten eingegrenzt werden kann, da es in diesem Zeitraum zu einer ausreichend linearen Bildung beider Metabolite kommt.

3.1.2 Inkubation über 30 Minuten

Bei Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Ethanol über 4 Stunden wurde gezeigt, dass es innerhalb der ersten 30 Minuten der Inkubation zu einem ausreichend linearen Anstieg der Ritalinsäure- bzw. Ethylphenidatbildung kommt. In dieser Inkubation, welche die Bedingungen aus 2.1.1 übernimmt, soll untersucht werden, ob dies bei einer Verkürzung der Messzeit auf 30 Minuten zutrifft. Methylphenidat, im Ansatz ebenfalls 1 mg/L, wird zusammen mit Ethanol (im Ansatz 7,9 g/L) im Leberhomogenat-Puffer-Gemisch, hergestellt wie in 2.2.3 beschrieben, bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Proben werden aus praktischen Gründen bei 10 – 16 – 23 – 30 Minuten entnommen und nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode bearbeitet, bevor sie über LC TOF MS gemessen werden.

Abbildung 3-2 zeigt die Trendlinien der relativen Peak-Flächen von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure und deren Regression aufgetragen zum Messzeitraum, wobei Ritalinsäure und Ethylphenidat auf der Sekundärachse dargestellt sind.

Es zeigt sich, dass auch in diesem Fall Methylphenidat über den Zeitraum der Messung fast linear abnimmt (Regressionskoeffizient von 0,98), während es zu einer ausreichend linearen Zunahme der relativen Peak-Flächen von Ritalinsäure (Regressionskoeffizient von 0,96) und Ethylphenidat (Regressionskoeffizient von 0,99) kommt. Bei nachgewiesener ausreichender Linearität kann bei den folgenden Inkubationen der Zeitraum der Probeentnahme also auf 30 Minuten eingegrenzt werden.

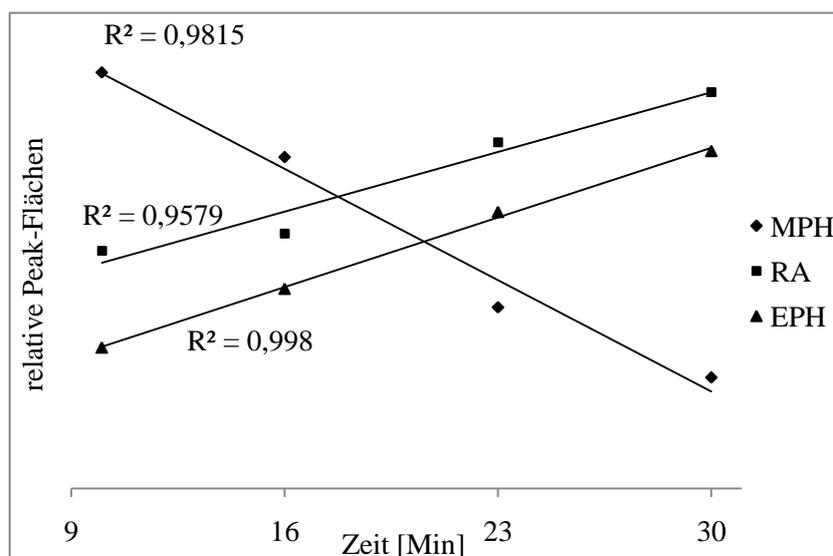


Abbildung 3-2: Trendlinien der relative Peak-Flächen von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) bei Inkubation über 30 Minuten (RA und EPH auf der Sekundärachse) mit Regression.

3.1.3 Validierung des Leberinkubationsversuchs

Die in 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Ethanol in humanem Leberhomogenat bei 37°C unter standardisierter Bedingung und leichter Durchmischung gemachten Beobachtungen zeigen, dass der Abbau von Methylphenidat und die Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat in der ersten halben Stunde der Messung in Bezug auf die Steigung der relativen Peak-Flächen ausreichend linear verläuft. Die Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Ethylphenidatbildung in Bezug auf dessen Steigung, also der Bildungsgeschwindigkeit, soll nach Validierungsrichtlinie der GTFCh (Peters F. T. et al. 2004) in den hier durchgeführten Inkubationen bestimmt werden, um somit etwas über die Verlässlichkeit und die Qualität der neu entwickelten analytischen Methode zum Nachweis der Ethylphenidatbildung auszusagen. Dazu werden an 8 verschiedenen Tagen n=3 Inkubationen der standardisierten Konzentrationen von Methylphenidat und Ethanol in humanem Leberhomogenat einer einzigen Leber unter derselben Bedingung durchgeführt und bewertet. Aus den Messungen der relativen Peak-Flächen der Ethylphenidatbildung werden die Mittelwerte der Steigungen bestimmt. Daraus lassen sich Standardabweichung, relative Standardabweichung, Wiederholpräzision, sowie

Laborpräzision bestimmen. Tabelle 3-1 zeigt die Ergebnisse der 8 Versuchstage für n=3 Messungen.

Es lässt sich für Tag-zu-Tag Messung ein Mittelwert der Bildungsgeschwindigkeit von Ethylphenidat, ausgedrückt in der Steigung der relativen Peak-Flächen über den Messzeitraum, im Bereich von 0,002 bis 0,003 berechnen. Daraus resultiert eine Standardabweichung, die von 0 bis 0,001 reicht. Die relative Standardabweichung der 8 Versuchstage liegt zwischen 7,19 % und 24,9 %.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8
#1 : Steigung	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002	0,003	0,003
#1 : r^2	0,993	0,910	0,993	0,945	0,832	0,995	0,921	0,915
#2 : Steigung	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,004	0,004
#2 : r^2	0,975	0,966	0,980	0,929	0,959	0,966	0,915	0,961
#3 : Steigung	0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004
#3 : r^2	0,888	0,901	0,988	0,981	0,992	0,981	0,946	0,997
Mittelwert der Steigung	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002	0,004	0,004
Standardabweichung	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0	0,0006	0,0006
VK	11,3%	27,6%	12,2%	24,9%	16,6%	7,2%	17,5%	19,5%

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit für die Bildung von Ethylphenidat im standardisierten Versuchsaufbau (MPH 1mg/L, Ethanol 7,9 g/L) über 8 Tage für n=3.

Aus diesen Ergebnissen, gemessen über 8 Versuchstage mit jeweils 3 Versuchsreihen, ergibt sich ein Gesamtmittelwert von 0,003 für die Bildungsgeschwindigkeit von Ethylphenidat. Aus diesen Messergebnissen ergeben sich laut Valistat (Version 1.0) wiederum eine relative Standardabweichung für die Wiederholpräzision von 18,3 % und eine relative Standardabweichung für die Laborpräzision von 23,8 % für den Standard-Versuchsaufbau bei Messung der Ethylphenidatbildung über 30 Minuten. Die Qualität und Reproduzierbarkeit der neu entwickelten analytischen Methode zum Ethylphenidatnachweis kann somit bestätigt werden.

3.1.4 Inkubation ohne Leberhomogenat bzw. mit Leberhomogenat, aber ohne Methylphenidat

Um den Metabolismus von Methylphenidat näher zu charakterisieren, soll untersucht werden, ob die Bildung von Ethylphenidat von Lebermaterial und Methylphenidat

abhängt. Ein Versuchsaufbau untersucht dabei die Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Phosphat-Puffer (pH 7,4, 0,1 molar), also den Ersatz des Leberhomogenats im Inkubationsversuch, ein weiterer Versuchsaufbau die Inkubation von Ritalinsäure und Ethanol in Phosphat-Puffer (pH 7,4, 0,1 molar), also den Ersatz von Methylphenidat im Inkubationsversuch. In einem weiteren Versuchsaufbau wird Ritalinsäure zusammen mit Ethanol in humanem Leberhomogenat inkubiert. Proben werden bei 0-1-2-3-4 Stunden entnommen (n=3).

Bei Inkubation von Methylphenidat in Gegenwart von Ethanol in Phosphat-Puffer kann ausschließlich Ritalinsäure nachgewiesen werden. Es kommt zu keiner Ethylphenidatbildung. Bei Inkubation von Ritalinsäure zusammen mit Ethanol in Phosphat-Puffer bzw. in Leberhomogenat kommt es ebenfalls zu keiner Ethylphenidatbildung. In keinem der Versuche wird also Ethylphenidat gebildet, was bedeutet, dass die Bildung von Ethylphenidat im Inkubationsversuch sowohl von Methylphenidat als auch vom Vorhandensein von humanem Leberhomogenat abhängt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass es sich bei der Bildung von Ethylphenidat um einen enzymatischen Prozess handelt, der unter anderem von Leberenzymen katalysiert wird. Bei der Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Phosphat-Puffer entsteht außerdem eine hohe Ritalinsäurekonzentration, was unter der Bedingung, dass die Reaktion ohne Leberhomogenat unabhängig von einer enzymatischen Reaktion verläuft, mit hoher Wahrscheinlichkeit von der alkalische Hydrolyse des Methylphenidats bei einem pH-Wert von 7,4 verursacht wird (Wargin et al. 1983). Bei Inkubation von Methylphenidat in Phosphat-Puffer wird im Vergleich zur Inkubation in Leberhomogenat eine 4,7-fach höhere Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure erreicht.

3.1.5 Inkubation mit Enzymhemmung durch Natriumfluorid

Zur näheren Charakterisierung des enzymatischen Prozess der Ethylphenidatbildung, wird Methylphenidat zusammen mit Ethanol in standardisierter Konzentration unter Zusatz von 200 µl einer gesättigten Natriumfluorid-Lösung inkubiert. Da bekannt ist, dass Natriumfluorid die enzymatische Aktivität von Esterasen hemmt, die humane Carboxylesterase, die am Metabolismus von Kokain beteiligt ist (Dean et al. 1991), inbegriffen, sollen die Ergebnisse dieser Inkubation mit der Inkubation ohne Natriumfluorid verglichen werden. Abbildung 3-3 zeigt den dazugehörigen direkten

Vergleich der Mittelwerte der Bildungsgeschwindigkeiten beider Substanzen mit und ohne Natriumfluoridhemmung im Säulendiagramm mit Standardabweichung.

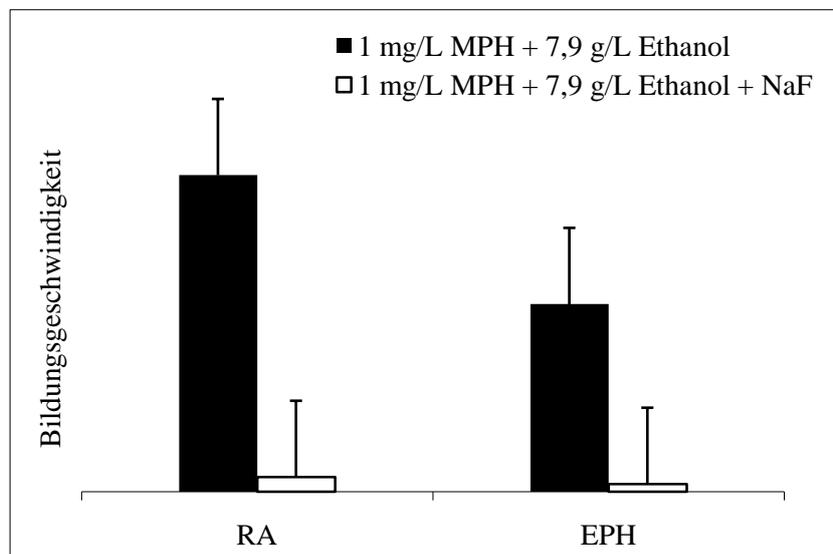


Abbildung 3-3: Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure und Ethylphenidat unter Standardbedingungen und unter Enzymhemmung durch Natriumfluorid (n=3).

Es zeigt sich ein signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) in den Bildungsgeschwindigkeiten von Ritalinsäure und Ethylphenidat, vergleicht man die standardisierte Inkubation mit der Hemmung durch Natriumfluorid. Unter Natriumfluoridhemmung werden sowohl Ritalinsäure als auch Ethylphenidat gebildet, aber in wesentlich geringerer Geschwindigkeit als unter der Standardbedingung. Die Geschwindigkeit der Ritalinsäurebildung nimmt um 92,4 % ab, die von Ethylphenidat sogar um 96,0 %. Dieser Versuch bekräftigt die Annahme, dass Ritalinsäure und Ethylphenidat durch einen durch Fluorid hemmbaren Mechanismus gebildet werden, höchst wahrscheinlich über die humane Carboxylesterase 1A. Aus der in 3.1.4 durchgeführten Versuchsreihe, in der das humane Leberhomogenat durch Phosphat-Puffer ersetzt wurde, ist bekannt, dass es nur bei Inkubation von Leberhomogenat zu einer Ethylphenidatbildung kommt. Damit wird gezeigt, dass es sich bei der Bildung von Ethylphenidat und Ritalinsäure um enzymatische Prozesse handelt, die zumindest in der Leber lokalisiert sind.

3.1.6 Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Kokain

Da angenommen wird, dass der Metabolismus von Methylphenidat bei gleichzeitiger Aufnahme von Ethanol zu Ethylphenidat analog zu der Veresterung von Kokain und Ethanol zu Kokaethylen erfolgt und an diesen Prozessen die humane Carboxylesterase Isoform 1A beteiligt ist, soll geprüft werden, ob sich die Bildungen von Ethylphenidat und Ritalinsäure bzw. von Kokaethylen und Benzoyllecgonin, als korrespondierende Metabolite von Kokain, bei Inkubation von Methylphenidat und Ethanol unter Zusatz eine äquimolaren Kokainkonzentration hemmen lassen. Dazu wird Methylphenidat (im Ansatz 1mg/L) zusammen mit Ethanol (im Ansatz 7,9g/L) in Leberhomogenat unter Standardbedingungen unter Zusatz einer äquimolaren Kokainkonzentration inkubiert und mit der Inkubation ohne Kokain verglichen.

Abbildung 3-4 zeigt die gemessenen Mittelwerte der Bildungsgeschwindigkeiten von Ritalinsäure und Ethylphenidat für n=6, sowie deren Standardabweichung im Vergleich mit und ohne Zusatz der äquimolaren Kokainkonzentrationen.

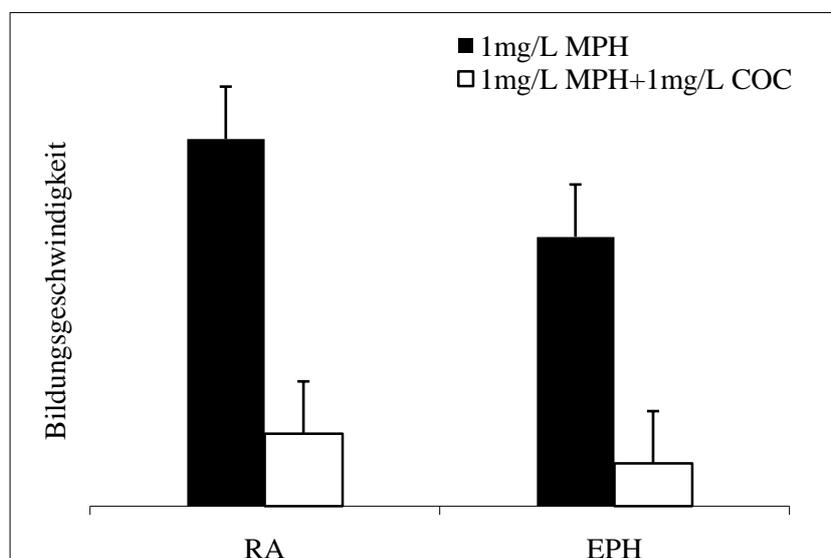


Abbildung 3-4: Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) unter Standardbedingungen und bei zusätzlicher Inkubation von äquimolaren Konzentrationen von Kokain (COC) (n=6).

Bei der Auswertung zeigt sich, dass die Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat bei Inkubation von Methylphenidat und Ethanol zusammen mit Kokain bei gleichzeitiger Bildung von Kokaethylen und Benzoyllecgonin signifikant ($p < 0,01$) gehemmt wird.

Die Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure nimmt dabei im Vergleich zur Standardinkubation ohne Kokain um 80,3 % ab, die Bildungsgeschwindigkeit von Ethylphenidat sogar um 84,2%. Die Hemmung der Bildung von Ethylphenidat und Ritalinsäure bei zusätzlicher Inkubation von Kokain könnte sich auf eine Enzymsättigung bei gleichzeitigem Vorliegen von Methylphenidat und Kokain als Substrat der humanen Carboxylesterase 1A zurückführen lassen. Bei einer mehr als 50 % Hemmung der Ritalinsäure- bzw. Ethylphenidatbildung ist es aber wahrscheinlicher, dass Kokain eine höhere Affinität zum Enzym aufweist und dadurch bevorzugt Kokaethylen bzw. Benzoyllecgonin gebildet werden. Im Verhältnis wird aus Kokain eine etwa 2-3fach höhere Konzentration Kokaethylen gebildet als aus Methylphenidat Ethylphenidat, dargestellt in Abbildung 3-5. Zumindest zeigt dieser Versuch, dass die Metabolisierungswege von Methylphenidat und Kokain zusammenhängen und deren Katalyse über dasselbe Enzym verläuft.

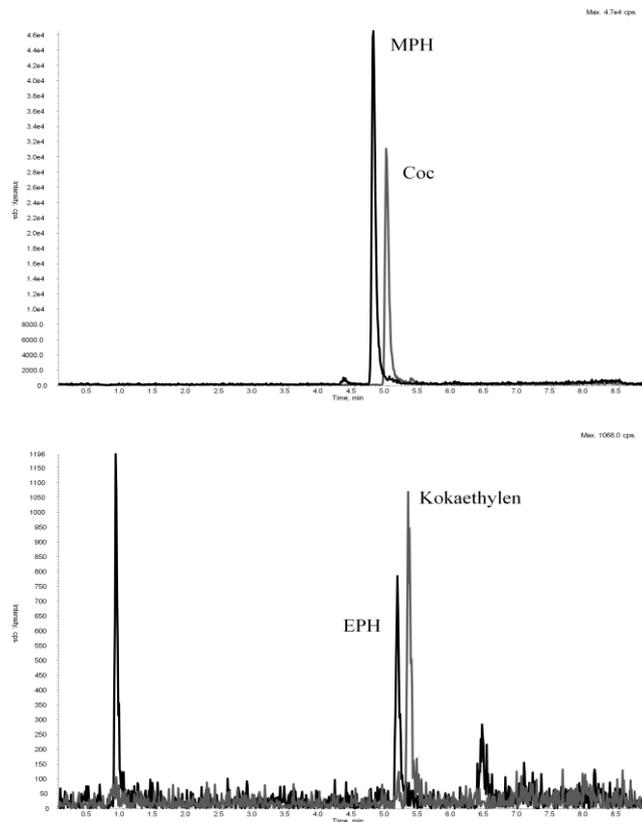


Abbildung 3-5: Chromatogramme für Methylphenidat (MPH) und Kokain (Coc) (oben) im Vergleich zu Ethylphenidat (EPH) und Kokaethylen (unten).

3.1.7 Inkubationen mit Variation der Ethanolkonzentration

Um die Bildung von Ethylphenidat in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration zu untersuchen, werden die Konzentration von Ethanol bei konstanter Konzentration von Methylphenidat (im Ansatz 1 mg/L) in den Inkubationsversuch aus 2.2.3 mit humanem Leberhomogenat variiert. Folgende Konzentrationen von Ethanol werden dabei inkubiert: 0 – 0,4 – 1,3 – 2,6 – 5,3 – 7,9 g/L, sowie die Enzymhemmung mittels Natriumfluorid bei einer Ethanolkonzentration von 7,9 g/L. Abbildung 3-6 zeigt die Ergebnisse als Säulendiagramm unter Darstellung der mittleren Bildungsgeschwindigkeiten (n=6) von Ritalinsäure und Ethylphenidat im Vergleich der verschiedenen Konzentrationen von Ethanol mit Standardabweichung.

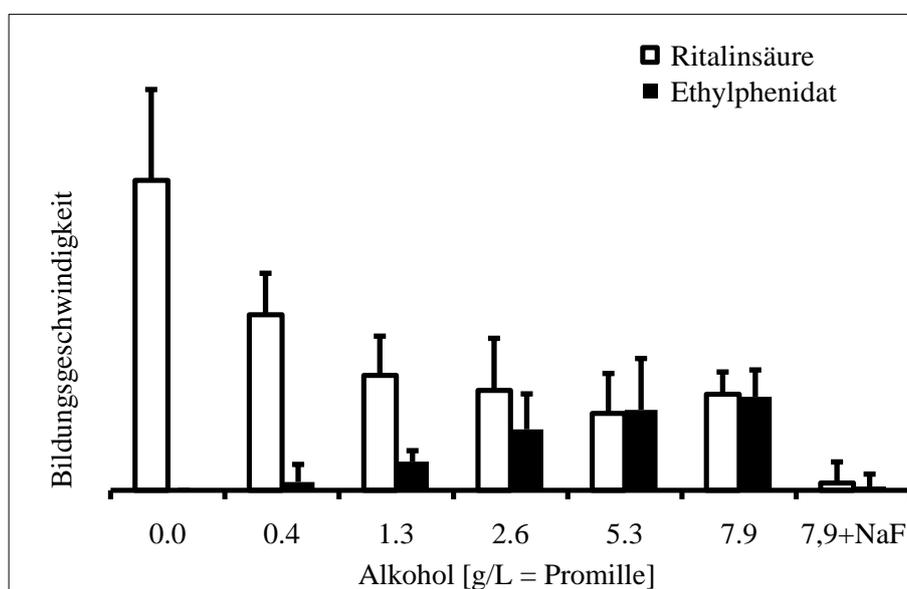


Abbildung 3-6: Enzymsättigung durch Ethanol: Variation der Ethanolkonzentration im Inkubationsversuch bei konstanter Methylphenidatkonzentration (1 mg/L), sowie bei Enzymhemmung durch Natriumfluorid (NaF, 4%) für n=6; Mittelwerte mit Standardabweichung.

Bei Erhöhung der Ethanolkonzentration kommt es zur Zunahme der Ethylphenidatbildungsgeschwindigkeit. Gleichzeitig nimmt die Bildungsgeschwindigkeit für Ritalinsäure gegenläufig ab. Ohne Zusatz von Ethanol wird keine Bildung von Ethylphenidat nachgewiesen, lediglich die Bildung von Ritalinsäure. Ab einer Ethanolkonzentration von 5,3 g/L stellt sich eine Sättigung der Ethylphenidatbildung ein, was auf eine Sättigung der humanen Carboxylesterase 1A bei einem Überschuss an Ethanol als Co-Substrat zurückzuführen sein kann. Die

Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure nimmt bei Zunahme der Ethanolkonzentration immer weiter ab, bis sich bei 5,3 g/L Ethanol ebenfalls eine Sättigung einstellt. Vergleicht man die Bildungsgeschwindigkeiten für Ethylphenidat und Ritalinsäure bei einer Ethanolkonzentration von 7,9 g/L mit und ohne Natriumfluorid-Hemmung, so kann man einen signifikanten Unterschied in der Bildungsgeschwindigkeit beider Substanzen mit $p < 0,01$ feststellen (siehe 3.1.5). Es ist dabei sowohl die Bildung von Ritalinsäure als auch die von Ethylphenidat betroffen, was nahe legt, dass beide Substanzen über dasselbe durch Fluorid hemmbare Enzym abgebaut werden. Auch die Beobachtungen der gegenläufig veränderten Bildungsgeschwindigkeiten beider Substanzen bei zunehmender Ethanolkonzentration bekräftigt diese Hypothese. Die Höhe der Bildungsgeschwindigkeiten von Ritalinsäure und Ethylphenidat sind von der Ethanoldosis abhängig.

3.1.8 Inkubationen mit Variation der Methylphenidatkonzentration

Um die Eigenschaften des Methylphenidatmetabolismus in Bezug auf die Abhängigkeit der Methylphenidatkonzentration zu charakterisieren, werden Inkubationen mit Variation der Methylphenidatkonzentration bei konstanter Ethanolkonzentration (im Ansatz 7,9 g/L) durchgeführt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Ethylphenidat wird bestimmt und verglichen. Folgende Methylphenidatkonzentrationen werden aus praktischen Gründen inkubiert: 0,3 – 0,7 – 1,0 – 1,3 mg/L. Abbildung 3-7 zeigt die Mittelwerte der Steigungen von Ethylphenidat für $n=6$ der untersuchten Methylphenidatkonzentrationen mit Standardabweichung als Säulendiagramm.

Bei Steigerung der Methylphenidatkonzentration von 0,3 auf 0,7 mg/L zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Ethylphenidatbildungsgeschwindigkeit ($p < 0,01$). Die Bildungsgeschwindigkeiten von Ethylphenidat bei einer Methylphenidatkonzentration von 0,7 mg/L bis 1,3 mg/L zeigen eine Sättigung in Bezug auf die Ethylphenidatbildung. Ab 0,7 mg/L Methylphenidat stellt sich also wiederum eine Sättigung des Enzyms ein, wobei zwischen 0,3 und 0,7 mg/L Methylphenidat wahrscheinlich eine maximale Ethylphenidatbildung erreicht wird, nachvollziehbar im signifikanten Anstieg der Bildungsgeschwindigkeiten.

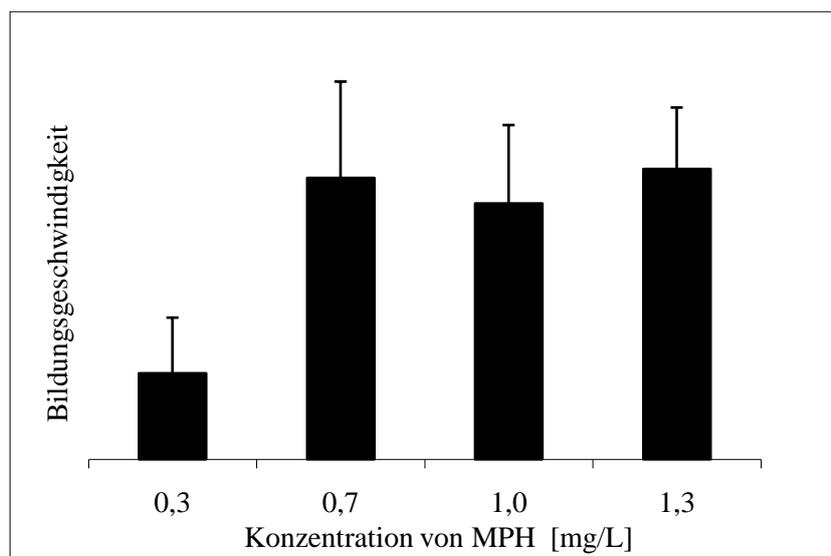


Abbildung 3-7: Enzymsättigung durch MPH: Ethylphenidatbildung bei konstanter Ethanolkonzentration (7,9 g/L) und Variationen der Methylphenidatkonzentration (n=6).

3.2 Inkubation in humanem Serum

3.2.1 Inkubation über 4 Stunden

Für die Aufbewahrung der Serumproben der hier durchgeführten Probandenstudie soll die Stabilität der Analyte im Serum untersucht werden. Da der enzymatischer Abbau durch im Serum befindliche Esterasen für Kokain beschrieben wurde, stellt sich die Frage, in wie weit dies auch für Methylphenidat eine Rolle spielt. Methylphenidat (im Ansatz 1mg/L) wird zusammen mit Ethanol (7,9g/L) unter den in 2.2.3 beschriebenen Standardbedingungen über 4 Stunden in Leerserum (pH 8) unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Proben werden bei 0 – 1 – 2 – 3 – 4 Stunden entnommen und wie in 2.2.3 bearbeitet. Abbildung 3-8 zeigt die relativen Peak-Flächen über den Messzeitverlauf.

Über einen Messzeitraum von 4 Stunden zeigt sich eine konstante Abnahme der relativen Peak-Fläche von Methylphenidat, während die relativen Peak-Flächen von Ritalinsäure zunehmen. Diese nehmen jedoch im Vergleich zur Inkubation in Leberhomogenat nur um < 0,01% zu. Außerdem kommt es zu einer Bildung von Ethylphenidat, die ebenfalls nur etwa eine Konzentration von < 0,01% im Vergleich zur

Bildung in den Leberinkubationen mit Methylphenidat und Ethanol erreicht. Trotzdem ist Ethylphenidat nachweisbar. Durch diesen Seruminkubationsversuch kann die Stabilität von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure im Serum bei 37°C nicht bestätigt werden. Der Abbau von Methylphenidat und die Bildung von Ritalinsäure könnte durch einen enzymatischen Prozess oder aber auch durch alkalische Hydrolyse, wie es in den Inkubationsversuchen in Phosphat-Puffer beobachtet wurde, erklärt werden. Die Entstehung von Ethylphenidat beruht dagegen ausschließlich auf einem enzymatischen Prozess.

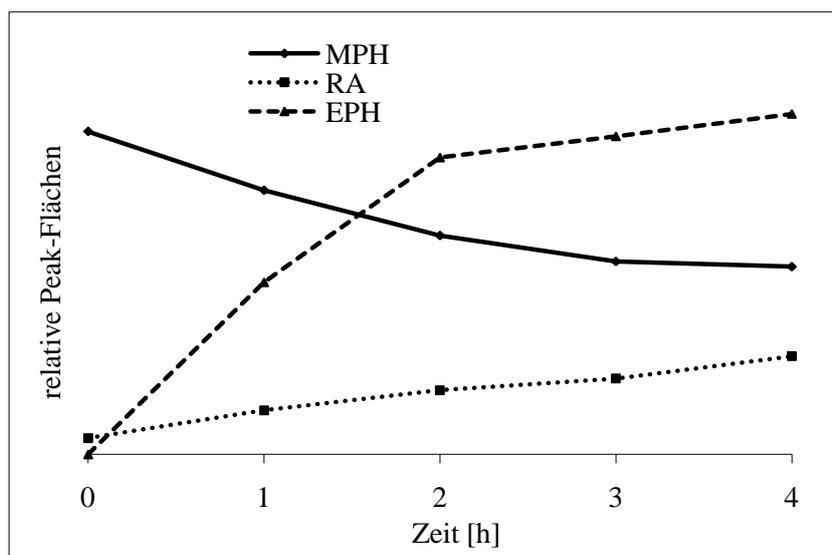


Abbildung 3-8: Relative Peak-Flächen von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) bei Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Serum unter Standardbedingungen für n=5 (EPH und RA auf der Sekundärachse).

3.2.2 Inkubation über 2 Stunden unter verschiedenen Bedingungen

Zur näheren Charakterisierung der Eigenschaften des Metabolismus von Methylphenidat in Serum werden Seruminkubationen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt und verglichen. Methylphenidat (im Ansatz 1 mg/L) wird zusammen mit Ethanol (im Ansatz 7,9 g/L) unter Standardbedingungen in Phosphat-Puffer (0,1 molar, pH 7,4) inkubiert. Außerdem werden Methylphenidat und Ethanol in den standardisierten Konzentrationen (siehe 2.2.3) in Serum, dessen pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt wurde, inkubiert, um die alkalische Hydrolyse von Methylphenidat in Serum

zu verlangsamen und die Vergleichbarkeit zu den Inkubationen in Phosphat-Puffer zu verbessern. In einem weiteren Versuchsaufbau wird Methylphenidat im auf pH 7,4 regulierten Serum zusammen mit Ethanol und gesättigter Natriumfluorid-Lösung inkubiert, gemäß der Leberenzymhemmung von Esterasen, die in 2.1.5 nachgewiesen wurde. Dies soll Rückschlüsse auf den möglichen enzymatischen Prozess der Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat durch Serumesterasen geben. Abbildung 3-9 zeigt den Vergleich der berechneten Mittelwerte der Differenzen der relativen Peak-Flächen der Metabolite mit Standardabweichung als Säulendiagramm.

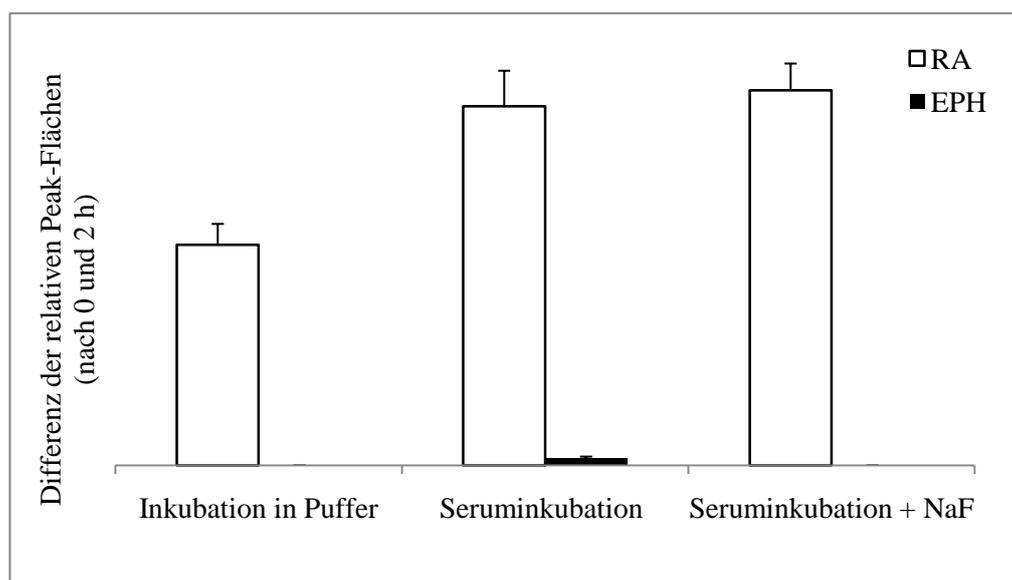


Abbildung 3-9: Differenz der relativen Peak-Flächen der Bildung von Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) nach 0 und 2 Stunden bei Seruminkubation (pH 7,4): Vergleich der Mittelwerte mit Standardabweichung verschiedener Bedingungen für n=5 .

Bei Inkubation in Phosphat-Puffer (pH 7,4, 0,1 molar) kann ausschließlich die Bildung von Ritalinsäure nachgewiesen werden. Ethylphenidat wird nicht gebildet. Die Bildung der Ritalinsäure ist vollständig auf alkalische Hydrolyse zurückzuführen, da ein enzymatischer Prozess im Phosphat-Puffer ausgeschlossen werden kann. Die Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Ethanol in Serum, dessen pH-Wert auf 7,4 eingestellt wurde, zeigt, dass es auch in diesem Fall zu einer Bildung von Ritalinsäure kommt und zwar einer signifikant ($p < 0,01$) höheren als im Inkubationsversuch im Phosphat-Puffer (pH 7,4). Die Bildung von Ritalinsäure im Serum ist also nicht vollständig auf alkalische Hydrolyse zurückzuführen, es ist im Serum ein Enzym an der Bildung beteiligt. Auch die Bildung von Ethylphenidat ist in der Seruminkubation

nachweisbar, jedoch in einer deutlich geringeren Konzentration im Vergleich zur gemessenen Ritalinsäurebildung. Bei Seruminkubation (pH 7,4) unter Zusatz von Natriumfluorid zeigt sich die vollständige Hemmung der Ethylphenidatbildung. Die Bildung der Ritalinsäure wird dagegen nicht gehemmt. Das deutet darauf hin, dass die Bildung von Ethylphenidat über eine durch Fluorid hemmbar Serumesterase katalysiert wird. Die Bildung der Ritalinsäure unterliegt ebenfalls einem enzymatischen Prozess, da die Konzentration bei Inkubation in Serum signifikant höher ist als bei Inkubation in Puffer. Dieses Enzym ist allerdings nicht durch Fluorid hemmbar und deshalb auch nicht an der Bildung von Ethylphenidat beteiligt. Die Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat findet im Serum unabhängig an verschiedenen Enzymen statt.

3.3 Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz

3.3.1 Validierung der neu entwickelten analytischen Methode

Die für die Auswertung der in der Probandenstudie gewonnen Serumproben neu entwickelte analytische Methode zum Nachweis von Methylphenidat und dessen Metaboliten Ritalinsäure und Ethylphenidat wird nach den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen validiert (Peters F. T. et al. 2004) (siehe 2.4.8). Die Linearität wird durch Messung der Substanzen in festgelegten, über den Messbereich verteilten Konzentrationen aus aufgestocktem Leerserum mittels Cochran-Test bestimmt. Es werden an einem Tag 6 x 6 Konzentrationsstufen gemessen. Die Mittelwerte dieser Messreihen werden berechnet, ebenso wie Standardabweichung und Varianz. Straggler (Signifikanz 95%) und Ausreißer (Signifikanz 99%) werden mittels Grubbs-Test ausgeschlossen. Die Varianzhomogenität wird mittels F-Test bestimmt, die Linearität über den Mandel-Test (Signifikanz 99%). Es ergeben sich die in Tabelle 3-2 bis Tabelle 3-4 gemessenen Werte der relativen Peak-Flächen der Analyte zur Bestimmung der Linearität ausgewertet über Valistat (Version 1.0).

Der Grubbs-Test auf Straggler und Ausreißer kann diese ausschließen, der F-Test auf Varianzhomogenität ist in allen Fällen positiv und der Mandel-Test auf Linearität ist ebenfalls in allen drei Fällen positiv. Somit wird die Linearität der Messmethode für Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure erfolgreich validiert.

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	0	10	20	30	40	50
1	0,01823	0,24170	0,49605	0,75811	0,94795	1,24725
2	0,01249	0,26932	0,46895	0,72903	1,05429	1,13184
3	0,01016	0,24361	0,49881	0,73569	0,97589	1,20519
4	0,01321	0,26850	0,53260	0,76501	1,08900	1,24387
5	0,01461	0,25850	0,54654	0,79655	1,09305	1,27139
6	0,06338	0,24596	0,53342	0,82022	0,98438	1,27676
Mittelwert	0,02201	0,25460	0,51273	0,76743	1,02409	1,22939
SD	0,02044	0,01255	0,02951	0,03524	0,06258	0,05411
Varianz	0,00042	0,00016	0,00087	0,00124	0,00392	0,00293

Tabelle 3-2: Valistat: Relative Peak-Flächen zur Bestimmung der Linearität von Methylphenidat.

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	0	2	4	6	8	10
1	0,00000	0,03187	0,07618	0,11878	0,16164	0,20742
2	0,00086	0,03406	0,07199	0,11342	0,15909	0,19776
3	0,00000	0,03520	0,07429	0,11011	0,15609	0,20000
4	0,00000	0,02947	0,07466	0,12056	0,16316	0,21032
5	0,00000	0,03337	0,07726	0,12207	0,16129	0,21149
6	0,00000	0,03342	0,07818	0,10762	0,16226	0,20235
Mittelwert	0,00014	0,03290	0,07543	0,11543	0,16059	0,20489
SD	0,00035	0,00200	0,00225	0,00592	0,00259	0,00567
Varianz	0,00000	0,00000	0,00001	0,00004	0,00001	0,00003

Tabelle 3-3: Valistat: Relative Peak-Flächen zur Bestimmung der Linearität von Ethylphenidat.

Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	0	100	200	300	400	500
1	0,00651	0,53377	0,75000	1,19737	1,43128	1,90811
2	0,00677	0,29635	0,60377	1,03646	1,54913	1,86857
3	0,00440	0,36723	0,70270	1,15060	1,37864	1,91444
4	0,00632	0,28850	0,70098	1,16981	1,51429	2,47619
5	0,00730	0,36064	0,68333	1,11304	1,45495	1,88718
6	0,00801	0,38452	0,76531	1,12552	1,33945	1,82819
Mittelwert	0,00655	0,37184	0,70102	1,13213	1,44462	1,98045
SD	0,00122	0,08852	0,05710	0,05582	0,07934	0,24485
Varianz	0,00000	0,00784	0,00326	0,00312	0,00630	0,05990

Tabelle 3-4: Valistat: Relative Peak-Flächen zur Bestimmung der Linearität von Ritalinsäure.

Die Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit wird gemessen, indem an 8 aufeinander folgenden Tagen eine hohe und eine niedrige Konzentration im Rahmen der im Messbereich liegenden Konzentrationen der drei Analyte für n=2 bestimmt werden. Über die Bestimmung des Mittelwerts und der Standardabweichung, sowie der Wiederholpräzision und Laborpräzision werden Aussagen über die Reproduzierbarkeit gemacht. Aus den in Tabelle 3-5 gezeigten Ergebnissen ergibt sich ein Gesamtmittelwert von 2,638 µg/L für die gemessene Methylphenidatkonzentration von 3 µg/L über 8 Tage.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	2,576	3,525	2,675	2,191	2,076	2,329	2,594	2,576
2	2,912	3,588	2,628	2,047	2,627	2,465	2,73	2,675
Mittelwert	2,744	3,557	2,652	2,119	2,352	2,397	2,662	2,626
SD	0,238	0,045	0,033	0,102	0,390	0,096	0,096	0,070
RSD, %	8,66	1,25	1,25	4,81	16,57	4,01	3,61	2,67

Tabelle 3-5: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Methylphenidatmessung bei einer Konzentration von 3 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	30,001	29,29	28,694	28,389	21,959	30,67	29,305	29,432
2	29,672	29,738	28,618	29,199	22,262	29,729	29,64	29,173
Mittelwert	29,837	29,514	28,656	28,794	22,111	30,200	29,473	29,303
SD	0,233	0,317	0,054	0,573	0,214	0,665	0,237	0,183
RSD, %	0,78	1,07	0,19	1,99	0,97	2,20	0,80	0,63

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Methylphenidatmessung bei einer Konzentration von 30 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

Daraus errechnet sich eine relative Standardabweichung von 16,31%. Für die Laborpräzision ergibt sich eine relative Standardabweichung von 6,63%, für die Wiederholpräzision ein Wert von 16,78%. Aus den in Tabelle 3-6 gemessenen Werten für die hohe Konzentration von Methylphenidat von 30 µg/L liegt der Gesamtmittelwert bei 28,486 µg/L, daraus resultiert eine relative Standardabweichung von 8,95%. Es errechnet sich daraus eine Laborpräzision mit einer relativen Standardabweichung von 9,26% und eine Wiederholpräzision mit einer relativen Standardabweichung von 1,28%.

Aus den in Tabelle 3-7 bestimmten Daten für Ethylphenidat, gemessen bei einer Konzentration von 0,6 µg/L über 8 Tage, berechnet sich ein Gesamtmittelwert von 0,535 µg/L und eine relative Standardabweichung von 21,56%. Die Wiederholpräzision wird mit einer relativen Standardabweichung von 12,05%, die Laborpräzision mit 22,09% angegeben.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	0,504	0,435	0,795	0,43	0,461	0,418	0,591	0,497
2	0,571	0,421	0,729	0,49	0,689	0,46	0,577	0,497
Mittelwert	0,538	0,428	0,762	0,460	0,575	0,439	0,584	0,497
SD	0,050	0,010	0,047	0,042	0,161	0,030	0,010	0,000
RSD, %	8,81	2,31	6,13	9,22	28,04	6,77	1,70	0,00

Tabelle 3-7: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Ethylphenidatmessung bei einer Konzentration von 0,6 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD =Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	6,007	4,917	5,691	5,617	5,078	5,787	5,968	5,372
2	6,134	4,948	5,747	6,087	5,263	5,823	6,088	5,445
Mittelwert	6,071	4,933	5,719	5,852	5,171	5,805	6,028	5,409
SD	0,090	0,022	0,040	0,332	0,131	0,026	0,085	0,052
RSD, %	1,48	0,44	0,69	5,68	2,53	0,44	1,41	0,95

Tabelle 3-8: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Ethylphenidatmessung bei einer Konzentration von 6 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

Aus den in Tabelle 3-8 gemessenen Werten der hohen Ethylphenidatkonzentration von 6 µg/L über 8 Tage, berechnen sich ein Gesamtmittelwert von 5,623 µg/L und eine relative Standardabweichung von 7,29%. Es lässt sich daraus eine Wiederholpräzision mit einer relativen Standardabweichung von 2,42% und eine Laborpräzision mit einer relativen Standardabweichung von 7,52% berechnen.

Die in Tabelle 3-9 gemessenen Werte der Messung von Ritalinsäure bei einer niedrigen Konzentration von 30µg/L über 8 Tage führt zu einem Gesamtmittelwert von 31,365 µg/L und einer relativen Standardabweichung von 12,03%, sowie zu einer relativen

Standardabweichung der Wiederholpräzision von 7,02% und der Laborpräzision von 12,3%.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	32,588	33,612	25,065	32,299	29,997	27,856	34,762	35,661
2	29,486	36,158	28,964	25,884	29,532	27,958	36,92	35,104
Mittelwert	31,037	34,885	27,015	29,092	29,765	27,907	35,841	35,383
SD	2,193	1,800	2,757	4,536	0,329	0,072	1,526	0,394
RSD, %	7,07	5,16	10,21	15,59	1,11	0,26	4,26	1,11

Tabelle 3-9: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Ritalinsäuremessung bei einer Konzentration von 30 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
1	295,035	324,801	294,319	320,773	302,906	315,251	312,218	317,306
2	296,393	321,132	290,359	316,769	306,61	307,311	299,112	317,794
Mittelwert	295,714	322,967	292,339	318,771	304,758	311,281	305,665	317,550
SD	0,960	2,594	2,800	2,831	2,619	5,614	9,267	0,345
RSD, %	0,33	0,80	0,96	0,89	0,86	1,80	3,03	0,11

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit der Ritalinsäuremessung bei einer Konzentration von 300 µg/L über 8 Tage für n=2. (SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung)

Die in Tabelle 3-10 gezeigten Messergebnisse der Bestimmung einer hohen Konzentration von 300 µg/L Ritalinsäure über 8 Tage führt zu einem Gesamtmittelwert von 308,631 µg/L und einer relativen Standardabweichung von 3,6%, sowie einer relativen Standardabweichung der Laborpräzision von 3,71% und der Wiederholpräzision von 1,39%.

Die Grenzwerte (limit of detection) der Messmethode werden durch die Messung einer Kalibrationsreihe mit sehr niedrigen Konzentrationen der Analyte bestimmt. Diese bewegen sich im Rahmen der gemessenen minimalen Konzentrationen der durch Markowitz et al. (2001) durchgeführten Probandenstudie.

Für Methylphenidat werden folgende Konzentrationsstufen gemessen: 0,00 - 0,10 - 0,50 - 1,00 - 2,00 - 3,00 - 4,00 µg/L. Es werden keine Ausreißer beschrieben und es besteht

nach Mandel-Test eine Linearität. Die Nachweisgrenze liegt dabei für Methylphenidat bei 0,078 µg/l und die Bestimmungsgrenze bei 0,615 µg/L.

Für Ethylphenidat werden folgende Konzentrationen für die Grenzwert-Bestimmung gemessen: 0,00 - 0,25 - 0,50 - 1,00 - 1,50 - 2,00 µg/L. Ausreißer können mittels F-Test nicht nachgewiesen werden und es besteht nach Berechnung durch den Mandel-Test eine Linearität. Es ergibt sich für Ethylphenidat eine Nachweisgrenze von 0,055 µg/L und eine Bestimmungsgrenze von 0,463 µg/L.

Die Grenzwerte der Ritalinsäure-Bestimmung werden über folgende Konzentrationen gemessen: 0,00 - 1,00 - 5,00 - 10,00 - 15,00 - 20,00 - 30,00 µg/L. Es besteht eine Linearität. Ausreißer werden nicht nachgewiesen. Die Nachweisgrenze für Ritalinsäure liegt bei 0,967 µg/L, die Bestimmungsgrenze bei 7,427 µg/L.

3.3.2 Auswertung der Blutalkoholkonzentrationen der Probanden

350 µl der Serumproben der Probanden werden an den beiden Studientagen, an denen Ethanol in Kombination mit Methylphenidat verabreicht wird, direkt vor dem Einfrieren abgenommen und für die Messung der Blutalkoholkonzentration über Headspace-Gaschromatographie benutzt. Die Tabellen 3-11 und 3-12 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutalkoholkonzentrationen der 9 Probanden zu den Bedingungen der ethanolabhängigen Studientage.

Zeit [h]	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7
MW	0,31	0,44	0,58	0,65	0,66	0,64	0,59	0,53	0,47	0,41	0,34	0,28	0,22	0,14	0,08
SD	0,19	0,23	0,26	0,27	0,24	0,20	0,19	0,19	0,19	0,20	0,21	0,21	0,21	0,19	0,14
VK, %	60	53	44	41	36	32	32	35	40	49	61	77	95	135	171

Tabelle 3-11: Ethanol+MPH: Mittelwerte und Standardabweichung der Blutalkoholkonzentrationen [%] der Probanden.

Zeit [h]	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7
MW	0,00	0,06	0,13	0,21	0,33	0,47	0,53	0,55	0,51	0,45	0,38	0,31	0,24	0,12	0,05
SD	0,00	0,06	0,12	0,17	0,24	0,20	0,13	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,11	0,06
VK, %	300	105	89	77	70	42	24	22	28	31	38	44	55	91	118

Tabelle 3-12: MPH+Ethanol: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutalkoholkonzentrationen [%] der Probanden.

Es zeigen sich hohe inter-individuelle Schwankungen der einzelnen Blutalkoholkonzentrationen. Die angestrebte Blutalkoholkonzentration von 0,8 g/kg wurde im Mittel von den Probanden nicht erreicht.

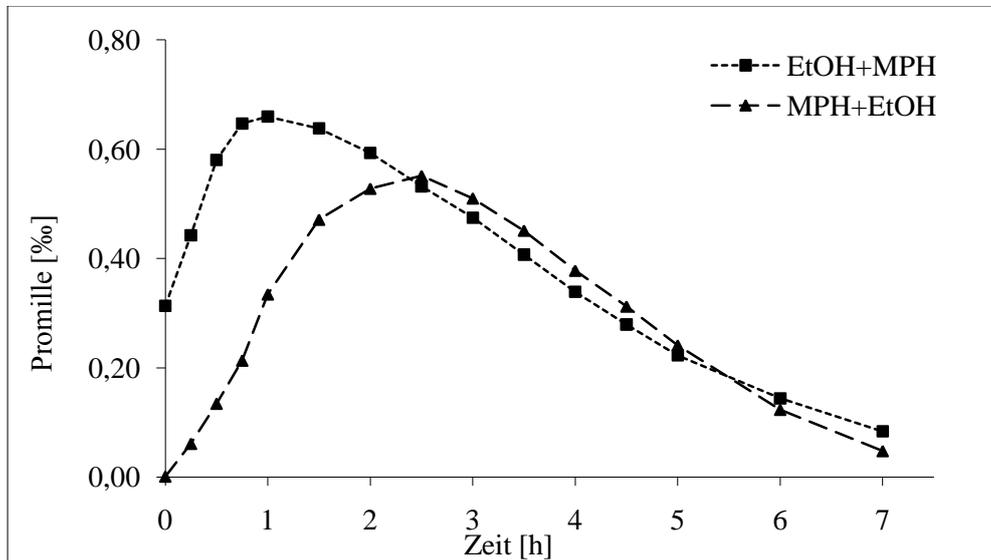


Abbildung 3-10: Mittelwerte der Blutalkoholkonzentrationen aller Probanden an den beiden Studientagen, an denen Methylphenidat in Kombination mit Alkohol eingenommen wurde.

Die Verläufe der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Konditionen mit Ethanolaufnahme zeigt Abbildung 3-10. Von den Probanden wird bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH), im Mittel eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,66 ‰ 1 h nach Methylphenidateinnahme erreicht. Bei Einnahme der Methylphenidatdosis besteht bereits eine Blutalkoholkonzentration von im Mittel 0,31 ‰. Im Gegensatz dazu wird bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+Ethanol) im Mittel eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,55 ‰ 2,5 h nach Einnahme der Methylphenidatdosis erreicht.

3.3.3 Evaluierung der Serumproben

Nach Abnahme des EDTA-Bluts aus der Venenverweilkanüle, werden die Blutproben zentrifugiert, abesert und bis zur Messung mittels LC TOF MS bei -20°C eingefroren. Am Tag der Analyse werden die Serumproben nach dem Auftauen wie in 2.4.6 beschrieben durch basische Extraktion eluiert und unter Benutzung der LC TOF MS

gemessen. Nach Auswertung der Messergebnisse werden die Konzentrations-Zeit-Kurven erstellt und die pharmakokinetischen Parameter (2.1.6) berechnet.

3.3.3.1 TH 01-07

3.3.3.1.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband TH 01-07 nimmt zu den Bedingungen der alleinigen Methylphenidateinnahme (MPH alleine) zusätzlich zur Studienmedikation folgende Medikamente ein: Ibuprofen 600 mg (4x pro Tag), Omeprazol 40 mg (1x am Tag) und Sandoparin 0,3 ml (1x am Tag). Diese Medikation wurde für die Probandenstudie vom Prüfarzt als nicht kontraindiziert eingestuft. Der Proband konnte deshalb die Teilnahme an der Studie fortsetzen.

Der Proband klagt zu allen drei Studientagbedingungen über Mundtrockenheit, zu den beiden Studientagen mit Ethanolaufnahme auch über ein Hitzegefühl. Ansonsten bemerkt er die Einnahme der Prüfsubstanzen nicht. Der Blutdruck bleibt bei Messung über die Studientage unauffällig in einem Bereich zwischen 100/70 mmHg und 124/71 mmHg, der Puls in einem Bereich zwischen 70 bis 90/Minute.

Abbildung 3-11 zeigt den Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit kombinierter Ethanol- und Methylphenidateinnahme.

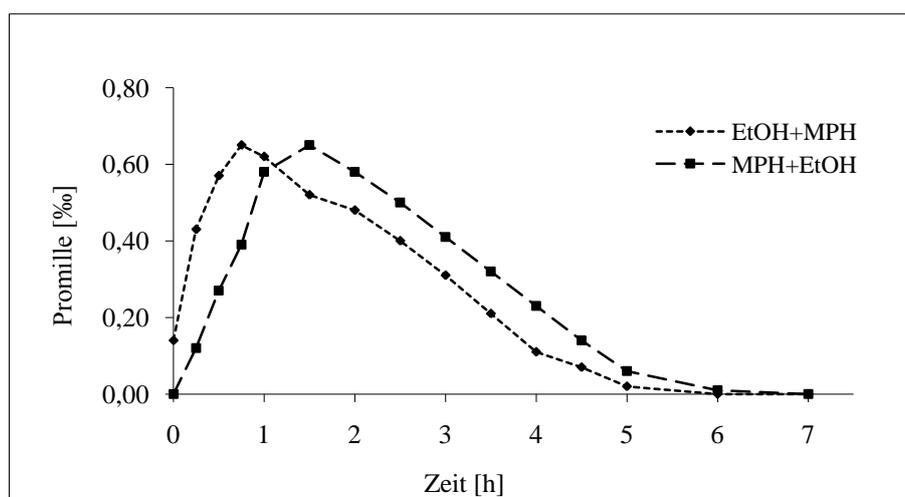


Abbildung 3-11: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband TH 01-07.

TH 01-07 erreicht bei kombinierter Ethanolaufnahme eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,65 ‰ bei Ethanol+MPH 0,75 h nach Einnahme der Methylphenidatdosis, bei der umgekehrten Reihenfolge nach 1,5 h. Bei Einnahme der Methylphenidatdosis bei Ethanol+MPH ist bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,14 ‰ messbar.

3.3.3.1.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Bei Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven dieses Probanden zeigt sich im Vergleich zu den restlichen Probanden ein auffälliges Datenprofil. Methylphenidat wird zu den Bedingungen aller drei Studientage im Vergleich zu den restlichen 8 Probanden in sehr hohen Konzentrationen ($> 30 \mu\text{g/l}$ vs. $< 10\mu\text{g/l}$ für die restlichen Probanden) nachgewiesen. Die Elimination verläuft dagegen sehr langsam, so dass bei Beendigung der Studientage bei MPH alleine und MPH+Ethanol immer noch Konzentrationen $> 20 \mu\text{g/l}$ messbar sind.

Die Bildung von Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht festgestellt. Vergleicht man die beiden Studientage mit Ethanolaufnahme, so wird bei MPH+Ethanol eine höhere Ethylphenidatkonzentration gebildet als bei der umgekehrten Reihenfolge und dies zu einem früheren Zeitpunkt (0,25 h vs. 1 h nach Methylphenidateinnahme).

Ritalinsäure wird dagegen zu den Bedingungen aller drei Studientage, verglichen mit den Daten der restlichen Probanden in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich nachgewiesen ($< 100 \mu\text{g/l}$ vs. $< 300 \mu\text{g/l}$ für die restlichen Probanden). Bei Ethanol+MPH wird eine höhere Ritalinsäurekonzentration in den Konzentrations-Zeit-Kurven dargestellt als zu den anderen beiden Konditionen, an denen die Konzentrations-Zeit-Kurven ähnlich verlaufen. Bei Beendigung der Messung können auch für Ritalinsäure noch Konzentrationen $> 40 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen werden.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Analyte Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat zu den Bedingungen der drei Studientage zeigt Abbildung 3-12.

Dadurch, dass bei diesem Probanden Methylphenidat auffällig im Vergleich zu den anderen Probanden nur zu einem sehr geringen Anteil zu Ritalinsäure metabolisiert wird, wird der Proband aus der zusammenfassenden Auswertung der pharmakokinetischen Daten ausgenommen und gesondert aufgeführt. Dies dient der weiteren Gewährleistung einer Vergleichbarkeit der Probanden-Messergebnisse

untereinander. Der Proband selbst wird in Bezug auf die Funktion der humanen Carboxylesterase 1A als „poor metabolizer“ klassifiziert.

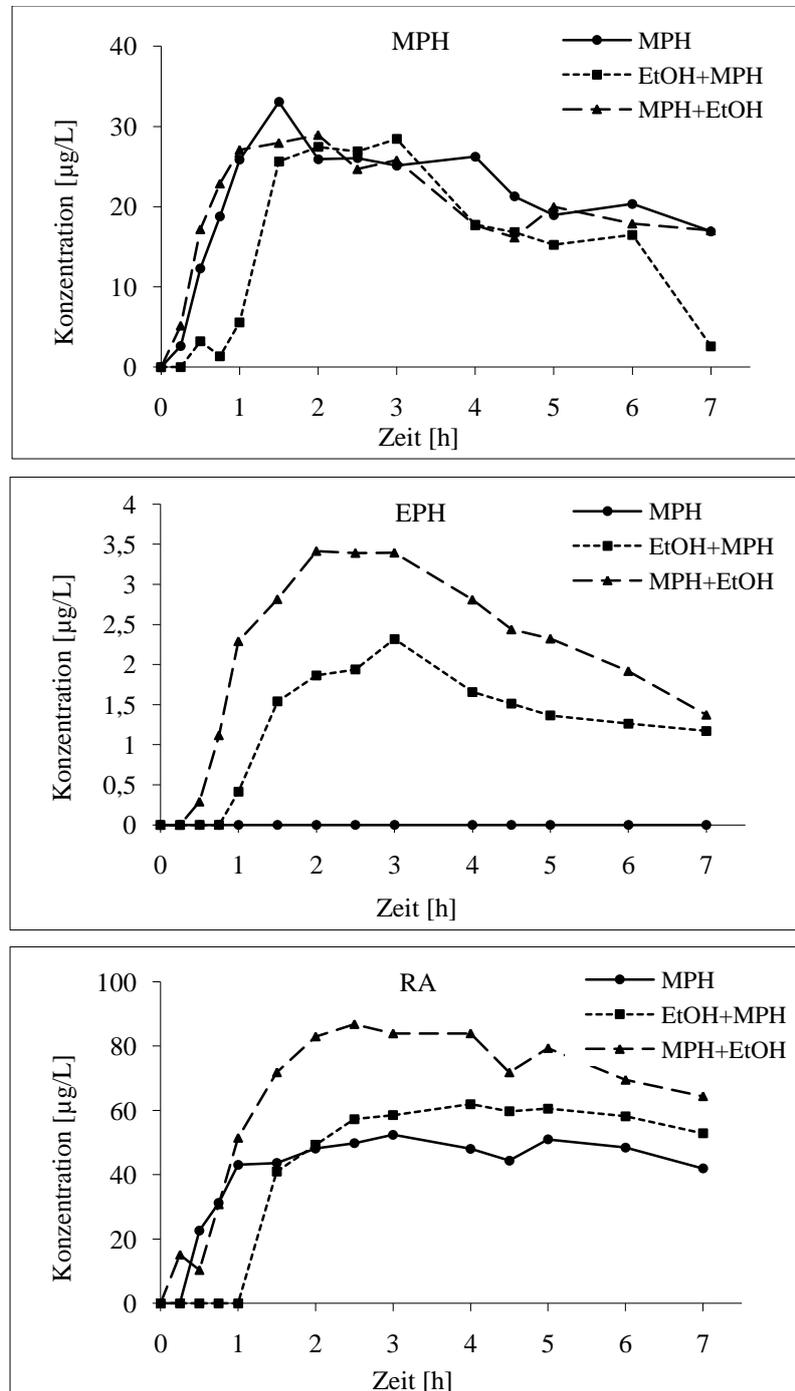


Abbildung 3-12: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von TH 01-07.

3.3.3.2 FM 04-07

3.3.3.2.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband FM 04-07 bemerkte zu den Bedingungen aller drei Studientage nach Einnahme von Methylphenidat vor allem einen wachmachenden Effekt, der aber nach ein bis zwei Stunden wieder nachlässt. Danach beschreibt er eine stark ausgeprägte Müdigkeit mit Schlaflosigkeit, die bei Ethanol+MPH am stärksten ausgeprägt ist. Die Überwachung der Vitalparameter zeigt einen maximalen Blutdruck von 140/90 mmHg am zweiten Studientag etwa 2,5 h nach Methylphenidateinnahme, ansonsten bleibt der Blutdruck in einem Bereich zwischen 99/68 mmHg und 122/66 mmHg. Der Puls liegt bei Messung der Safety-Parameter zwischen 71 und 101/Minute.

FM 04-07 erreicht bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,62 ‰ 0,5 h nach Tabletteneinnahme. Bei Einnahme der Methylphenidatdosis besteht bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,17 ‰. Bei MPH+Ethanol wird maximal eine Blutalkoholkonzentration von 0,47 ‰ 2,5 h nach Methylphenidateinnahme gemessen. Bei diesem Probanden zeigt sich also eine Diskrepanz der maximalen Blutalkoholkonzentrationen an den beiden Studientagen mit Ethanolaufnahme von 0,15 ‰ Unterschied. Tmax der BAK bei MPH+Ethanol ist im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge um 2 h verzögert. Abbildung 3-13 zeigt den Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der ethanolabhängigen Studientage.

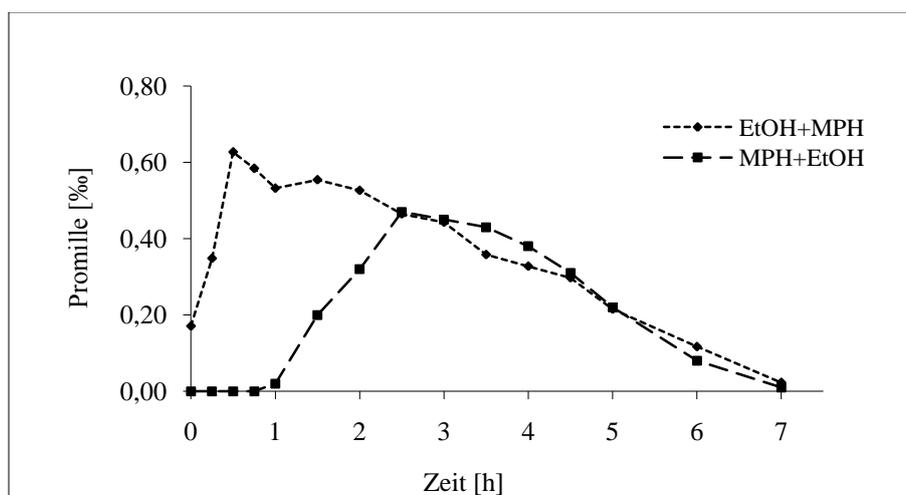


Abbildung 3-13: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband FM 04-07.

3.3.3.2.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der gemessenen Analyte für FM 04-07 werden in Abbildung 3-14 gezeigt.

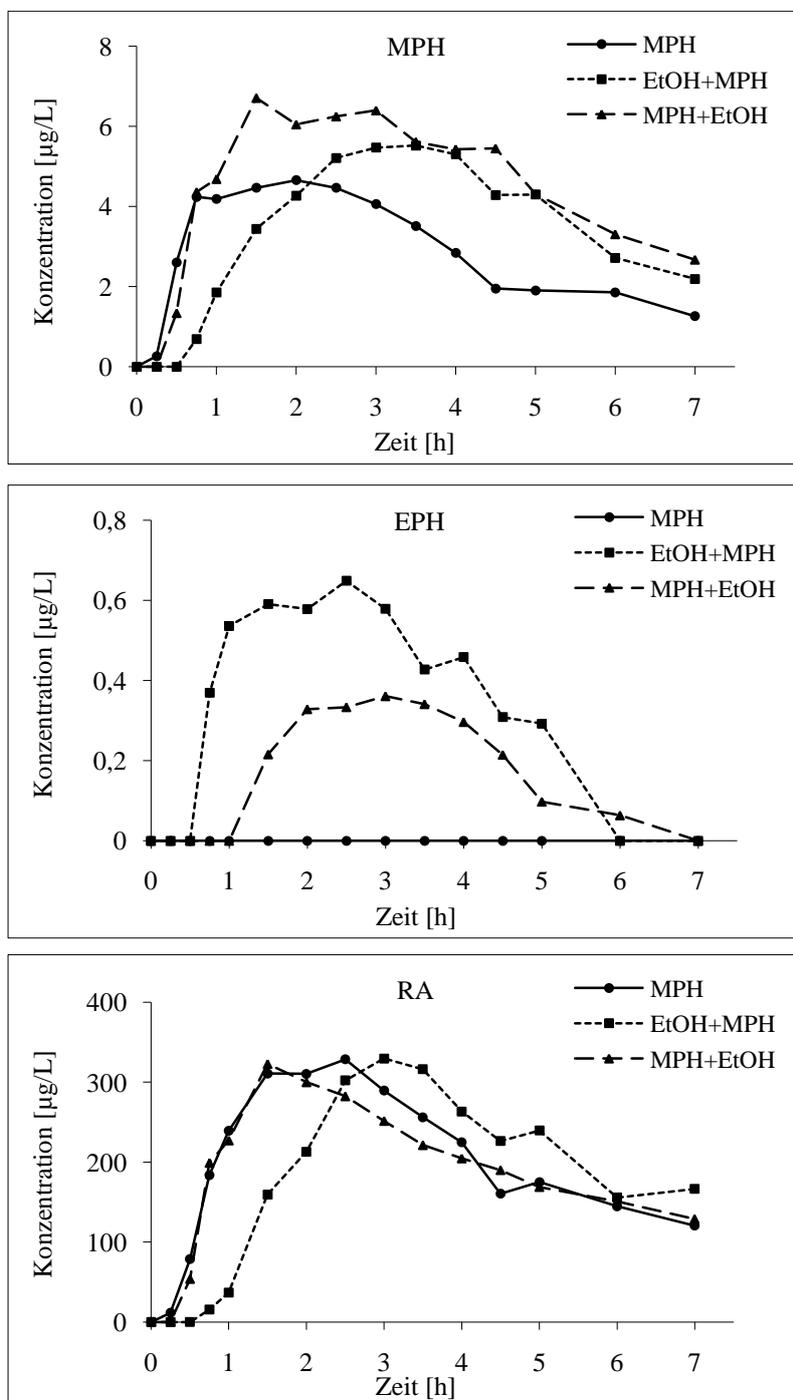


Abbildung 3-14: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von FM 04-07.

Methylphenidat wird bei MPH+Ethanol im Vergleich zu den beiden anderen Studientagen in der höchsten maximalen Konzentration nachgewiesen. Bei MPH alleine wird der niedrigste Konzentrations-Zeit-Verlauf für Methylphenidat erreicht. Die Anstiegsphase des Verlaufs für MPH alleine verläuft ähnlich steil wie bei MPH+Ethanol. Bei Ethanol+MPH zeigt sich eine deutliche Verzögerung von t_{max} .

Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH kann Ethylphenidat früher und in einer höheren Konzentration bestimmt werden als bei umgekehrter Reihenfolge.

Ritalinsäure wird bei MPH alleine und bei MPH+Ethanol in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verläufen gebildet. Bei Ethanol+MPH wird Ritalinsäure verzögert nachgewiesen. Jedoch wird eine ähnlich hohe Ritalinsäurekonzentration wie zu den anderen beiden Bedingungen erreicht. Am Ende des Messzeitraums nach 7 h kann Ritalinsäure zu allen drei Bedingungen noch immer mit $> 100 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen werden.

3.3.3.3 CD 05-07

3.3.3.3.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband CD 05-07 klagt besonders an den beiden ersten Studientagen (MPH alleine, Ethanol+MPH) über starke Kopfschmerzen, die über den Studientagverlauf wieder rückläufig sind und nicht über den Studientag hinaus persistieren. Die Kontrolle der Vitalparameter verläuft unauffällig. An den drei Studientagen werden Blutdruckwerte zwischen 95/68 mmHg und 115/85 mmHg dokumentiert, der Puls liegt in einem Bereich zwischen 85 und 123/Minute.

Bei Ethanol+MPH wird 1 h nach Methylphenidateinnahme die maximale Blutalkoholkonzentration in Höhe von 0,58 ‰ erreicht. Zu Beginn der Messungen besteht bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,29 ‰. Bei MPH+Ethanol wird nach 1,5 h die maximale Blutalkoholkonzentration von 0,53 ‰ erreicht. Abbildung 3-15 zeigt die Verläufe der Blutalkoholkonzentrationen dieses Probanden.

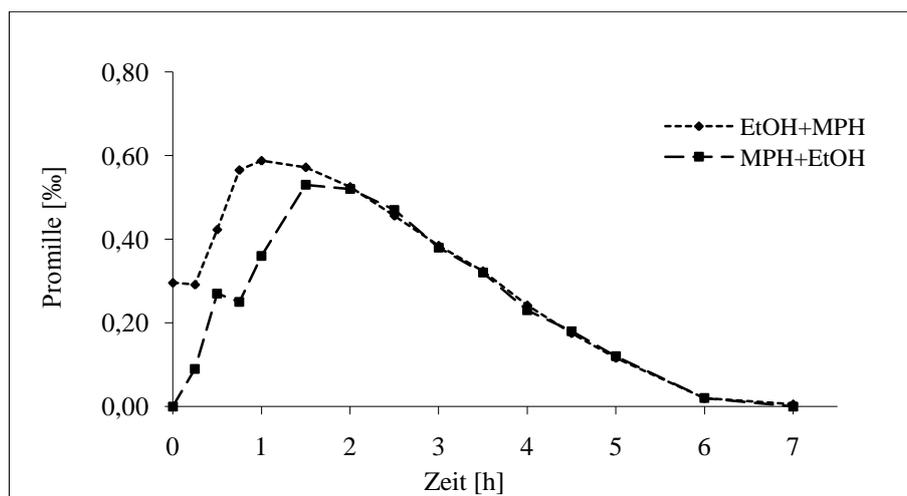


Abbildung 3-15: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband CD 05-07.

3.3.3.3.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Methylphenidat wird zu den Bedingungen aller drei Studientage in einem vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verlauf gemessen. Bei MPH alleine ist die maximale Konzentration geringfügig niedriger als zu den beiden Bedingungen mit kombinierter Ethanolaufnahme. Die maximale Methylphenidatkonzentration ist dann bei MPH alleine früher als die maximal erreichte Konzentration von Ethanol+MPH nachweisbar.

Ethylphenidat wird bei alleiniger Methylphenidateinnahme nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH wird eine wesentlich höhere Konzentration erreicht als bei der umgekehrten Reihenfolge, wobei t_{max} im Vergleich zu MPH+Ethanol 1h später erreicht wird.

Ritalinsäure wird bei MPH alleine in einer höheren Konzentration gebildet als an den beiden Studientagen mit Ethanolbeteiligung. Bei MPH+Ethanol wird die maximale Ritalinsäurekonzentration früher erreicht als bei umgekehrter Reihenfolge. Nach der letzten Messung bei 7 h sind geringe Konzentrationen von Methylphenidat und Ritalinsäure ($< 100 \mu\text{g/l}$) noch nachweisbar.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Messung von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure von CD 05-07 zeigt Abbildung 3-16.

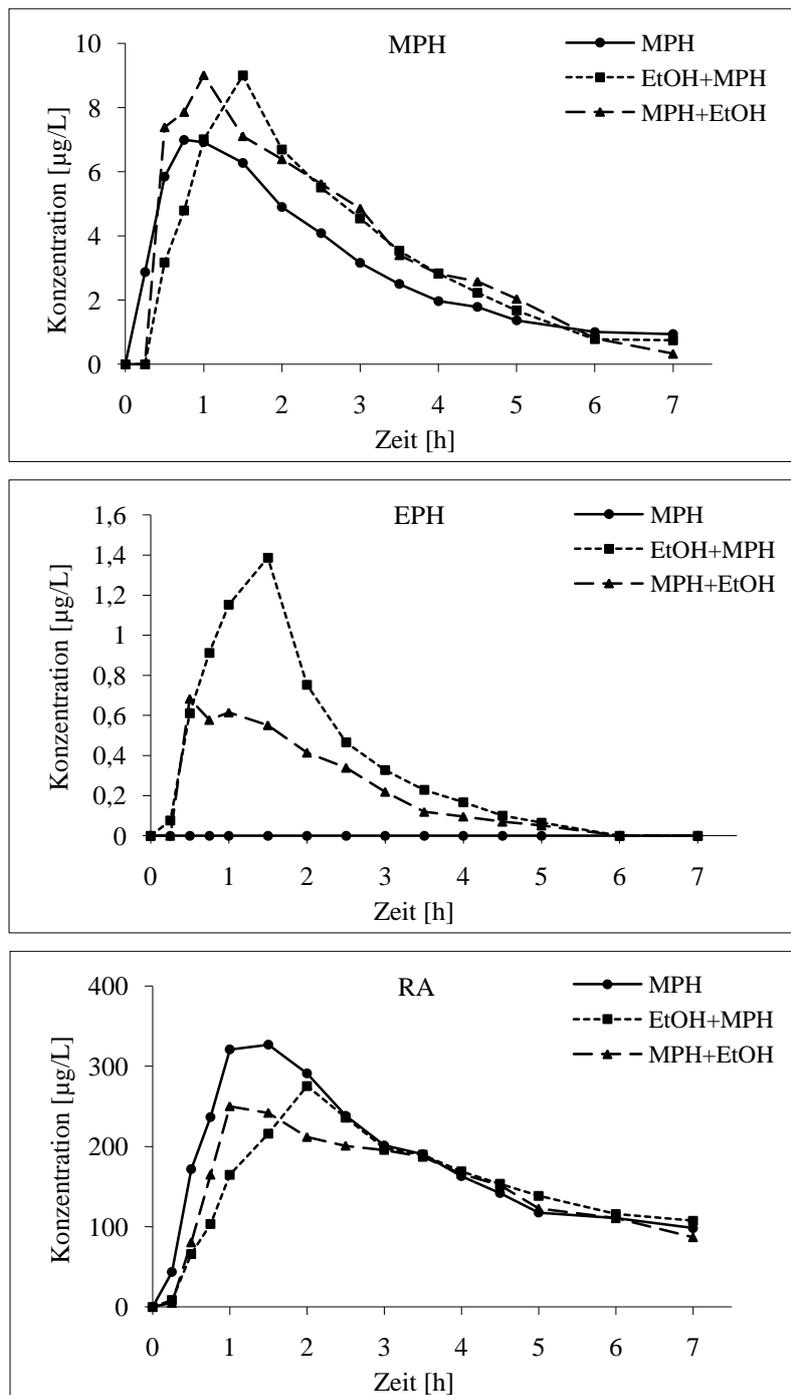


Abbildung 3-16: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von CD 05-07.

3.3.3.4 ST 07-07

3.3.3.4.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband ST 07-07 klagt besonders bei MPH alleine über mäßige bis starke Kopfschmerzen und ein leicht gedämpftes Gefühl im Kopf. Auch an den beiden

folgenden Studientagen, an denen zusätzlich Ethanol eingenommen wird, treten Kopfschmerzen auf, die im Vergleich dazu jedoch nicht mehr so stark ausgeprägt sind. Es werden zu den drei Bedingungen Blutdruckwerte zwischen 104/68 mmHg und 153/108 mmHg gemessen, die Kontrolle des Pulses zeigt Werte zwischen 66 und 87/Minute.

ST 07-07 erreicht bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 1,11 ‰ 0,75 h nach Messbeginn. Bei Einnahme von Methylphenidat beträgt die BAK bereits 0,40 ‰. Bei MPH+Ethanol wird eine maximale BAK von 0,69 ‰ 2,5 h nach Methylphenidateinnahme nachgewiesen. Es zeigt sich eine Diskrepanz der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von 0,29 ‰ Unterschied. Der Verlauf der BAK ist bei MPH+Ethanol deutlich flacher als bei Ethanol+MPH, t_{max} der BAK ist im Vergleich um 1,75 h verzögert. Abbildung 3-17 zeigt den Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage, an denen Methylphenidat in Kombination mit Ethanol eingenommen wird.

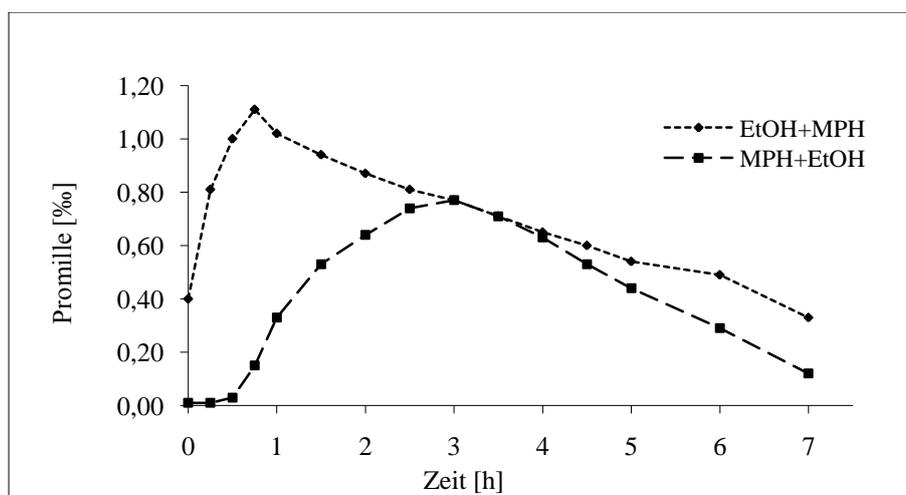


Abbildung 3-17: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband ST 07-07.

3.3.3.4.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Die Konzentrations-Zeit-Kurven von Proband ST 07-07 für Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure sind in Abbildung 3-18 gezeigt.

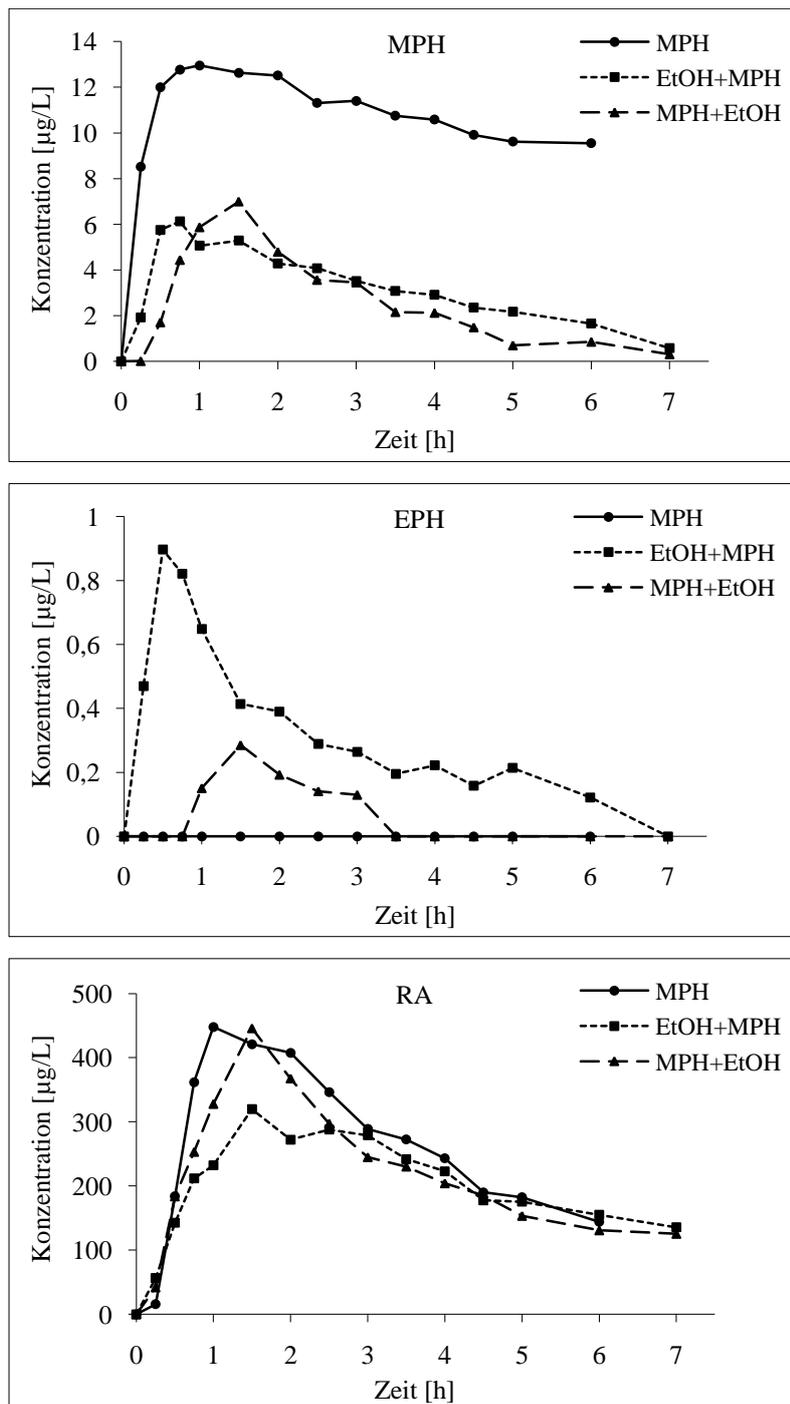


Abbildung 3-18: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von ST 07-07.

Methylphenidat wird bei MPH alleine in einer wesentlich höheren Konzentration nachgewiesen als an den beiden Studientagen mit kombinierter Ethanolaufnahme. Bei Beendigung des Messzeitraums nach 7 h, wird bei dieser Bedingung immer noch eine hohe Methylphenidatkonzentration von $> 9 \mu\text{g/l}$ festgestellt. Im Vergleich zu den

anderen Probanden kommt es bei ST 07-07 also scheinbar nur zu einem sehr langsamen Methylphenidatmetabolismus in der Leber bei dieser Bedingung. Die Konzentrations-Zeit Verläufe der beiden Studientage mit Ethanolbeteiligung sind im Hinblick auf den Metabolismus von Methylphenidat wieder mit denen der restlichen Probanden zu diesen Bedingungen vergleichbar.

Ethylphenidat kann bei MPH alleine nicht nachgewiesen werden. Bei Ethanol+MPH kommt es zu einer wesentlich höheren Bildung von Ethylphenidat, die auch wesentlich früher im Vergleich zu der umgekehrten Reihenfolge auftritt.

Ritalinsäure kann zu allen drei Studientagbedingungen in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verläufen nachgewiesen werden. Die maximale Konzentration bei Ethanol+MPH erreicht den niedrigsten Wert zum spätesten t_{max} der drei Bedingungen. Die Konzentrations-Zeit-Kurven von MPH alleine und MPH+Ethanol verlaufen ähnlich.

3.3.3.5 DP 09-07

3.3.3.5.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband DP 09-07 bemerkt zu den Bedingungen der drei Studientage ebenfalls eine aufweckende Wirkung des Methylphenidats, die nach ein bis zwei Stunden zu einer starken Müdigkeit führt. Es werden in der Kontrolle des Blutdruck Werte zwischen 106/75 mmHg und 140/76 mmHg festgestellt, der Puls liegt an den drei Studientagen in einem Bereich zwischen 64 und 89/Minute.

Abbildung 3-19 zeigt den Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen an beiden ethanolabhängigen Studientagen. DP 09-07 erreicht über den siebenstündigen Messzeitraum bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,46 ‰ 1,5 h nach Tabletteneinnahme. Es besteht bei Einnahme der Methylphenidatdosis bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,22 ‰. Bei MPH+Ethanol wird eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,40 ‰ 3 h nach Einnahme von Methylphenidat erreicht.

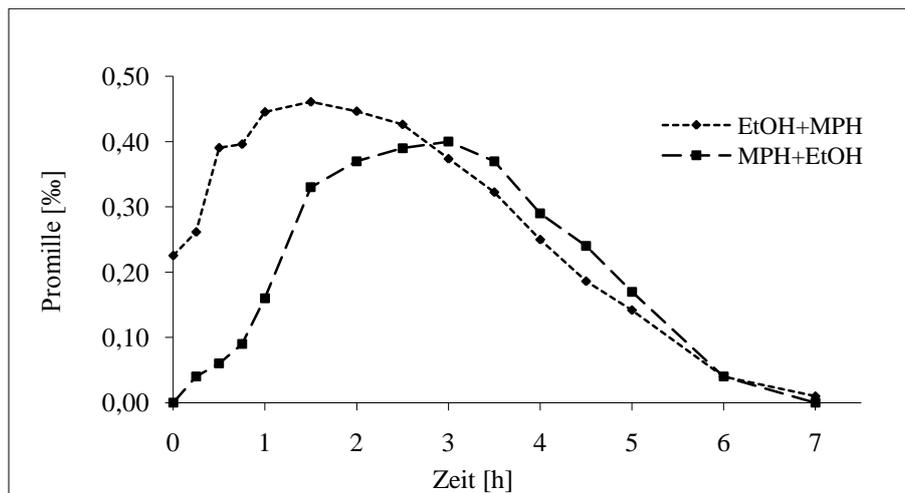


Abbildung 3-19: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband DP 09-07.

3.3.3.5.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Methylphenidat wird in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verläufen an allen drei Studientagen über den Messzeitraum nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH findet sich eine weniger steile Elimination als zu den beiden restlichen Konditionen, sowie eine geringfügig verzögerte maximale Konzentration mit geringfügig höherer Konzentration. Ethylphenidat wird bei alleiniger MPH alleine nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH wird es in einer wesentlich höheren Konzentration gebildet als bei der umgekehrten Reihenfolge (1,2 µg/l vs. 0,2 µg/l C_{max}). Auch der Zeitpunkt des ersten Nachweises der Ethylphenidatbildung ist im Vergleich zu MPH+Ethanol wesentlich früher. Ethylphenidat ist bei Ethanol+MPH außerdem fast über den gesamten Messzeitraum nachweisbar, während der Nachweis bei der umgekehrten Reihenfolge auf einen Zeitraum von 4 h begrenzt ist.

Ritalinsäure wird bei MPH alleine und MPH+Ethanol in einem vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verlauf gebildet. Bei Ethanol+MPH wird es in einer verminderten Konzentration und zu einem späteren Zeitpunkt gebildet. Der Verlauf der Elimination ist bei dieser Kondition wieder mit dem der anderen beiden Konditionen vergleichbar.

Abbildung 3-20 zeigt die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure von DP 09-07.

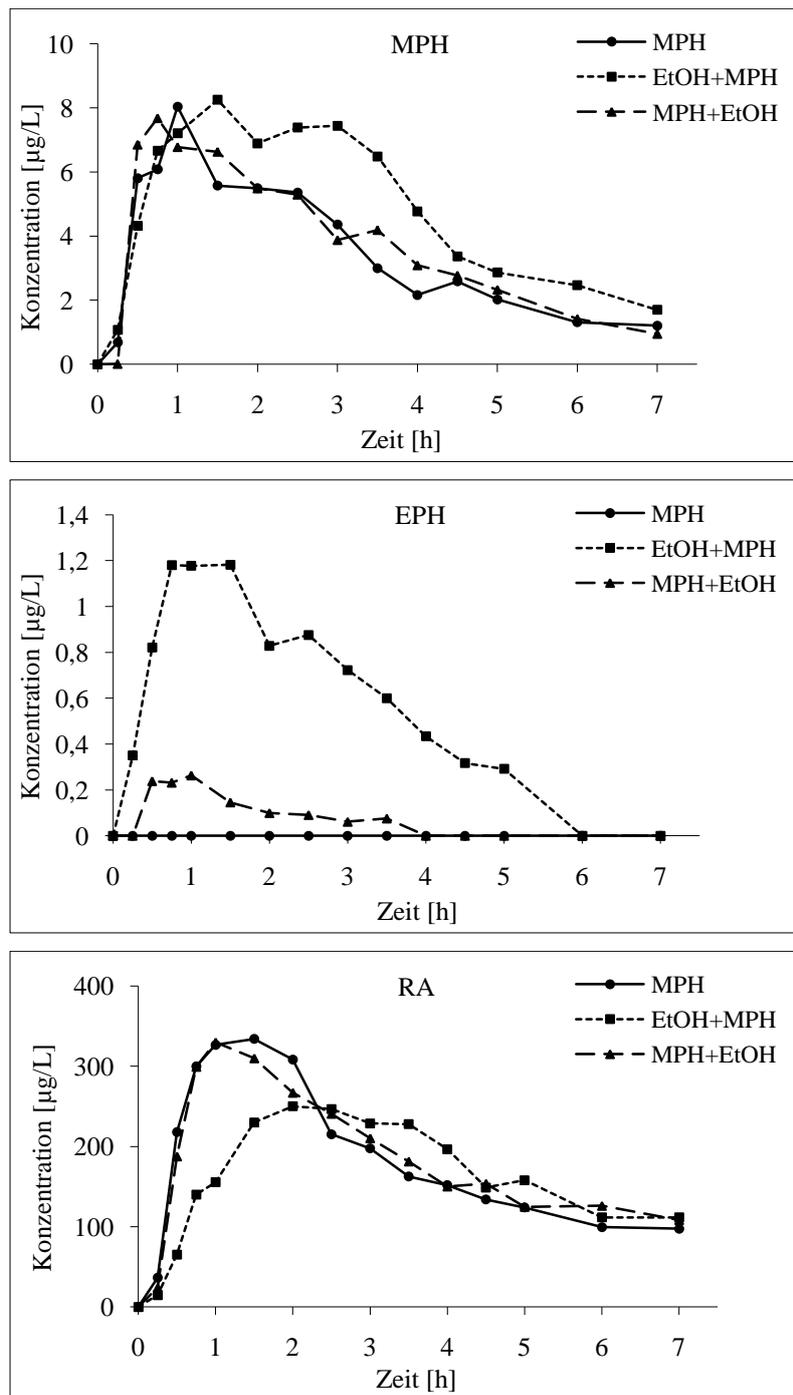


Abbildung 3-20: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von DP 09-07.

3.3.3.6 AM 10-07

3.3.3.6.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband AM 10-07 beschreibt zu den Bedingungen aller Studientage mäßige Kopfschmerzen, die bei MPH alleine im Vergleich zu den beiden Studientagen mit

kombinierter Ethanolaufnahme stärker ausgeprägt sind. Der Blutdruck bewegt sich in einem Bereich zwischen 114/96 mmHg und 164/86 mmHg bei MPH alleine 5 h nach Tabletteneinnahme. Der Puls liegt in einem Bereich zwischen 78 und 128/Minute.

Bei Ethanol+MPH wird eine maximale Blutalkoholkonzentration in Höhe von 0,70 ‰ 1 h nach Tabletteneinnahme erreicht. Zu Beginn der Messung besteht bereits eine BAK in Höhe von 0,34 ‰. Bei MPH+Ethanol wird eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,69 ‰ 2,5 h nach Tabletteneinnahme festgestellt. T_{max} der BAK ist bei den beiden Bedingungen also um 1 h verzögert. Abbildung 3-21 zeigt die Verläufe der Blutalkoholkonzentration der beiden Studientage, an denen Methylphenidat in Kombination mit Ethanol eingenommen wird.

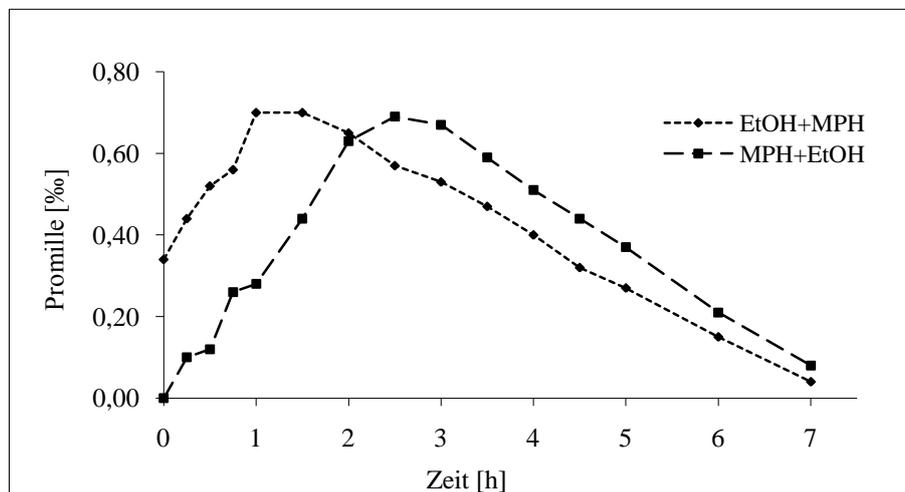


Abbildung 3-21: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband AM 10-07.

3.3.3.6.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Methylphenidat zeigt bei MPH+Ethanol und der umgekehrten Reihenfolge eine ähnliche Anstiegsphase in den Konzentrations-Zeit-Verläufen. Bei Ethanol+MPH wird dabei jedoch eine höhere maximale Konzentration erreicht als bei der umgekehrten Reihenfolge. MPH alleine zeigt einen verminderten und verzögerten Konzentrations-Zeit-Verlauf.

Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH zeigt der Konzentrations-Zeit-Verlauf eine wesentlich höhere Ethylphenidatbildung als bei der umgekehrten Reihenfolge (3 µg/l vs. 0,5 µg/l für C_{max}), sowie eine verlängerte Elimination, da Ethylphenidat nach 7 h Messung immer noch nachweisbar ist.

Ritalinsäure zeigt bei Ethanol+MPH und bei der umgekehrten Reihenfolge einen ähnlichen Konzentrations-Zeit-Verlauf. Bei MPH alleine wird die maximale Konzentration verzögert erreicht. Diese ist außerdem im Vergleich zu den beiden anderen Konditionen unwesentlich erhöht. (Abbildung 3-22)

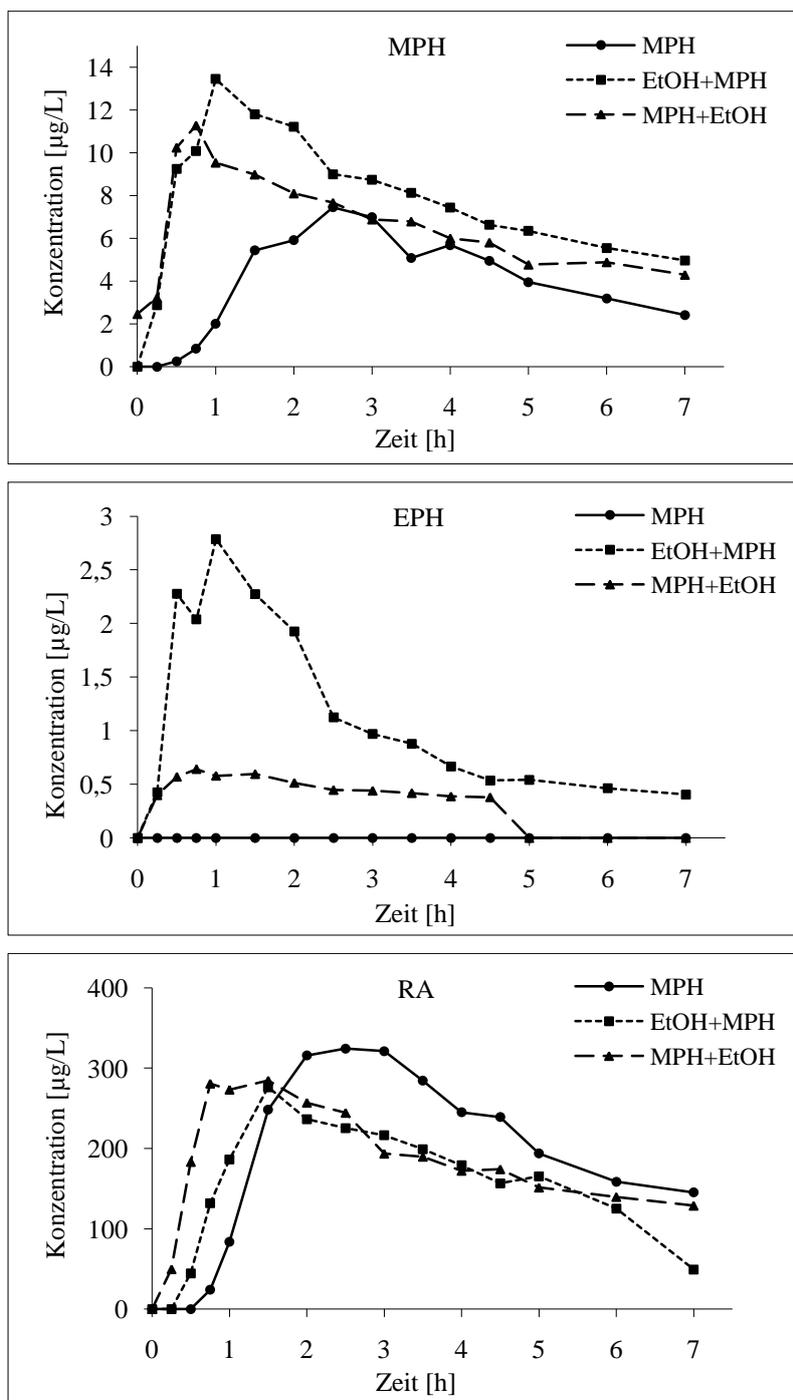


Abbildung 3-22: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von AM 10-07.

3.3.3.7 DD 13-07

3.3.3.7.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband DD 13-07 klagt am ersten Studientag bei MPH alleine und über den ersten Studientag hinaus bis zum nächsten Tag über Appetitlosigkeit. Bei Ethanol+MPH beschreibt er leichte Kopfschmerzen, bei der umgekehrten Reihenfolge Mundtrockenheit. Die Kontrolle der Blutdruckwerte zeigt Werte in einem Messbereich zwischen 124/88 mmHg und 164/98 mmHg, der Puls unterliegt einer Schwankung zwischen 73 und 109/Minute.

DD 13-07 erreicht bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 1,08 ‰ 0,75 h nach Einnahme der Methylphenidatdosis. Zum Zeitpunkt der Tabletteneinnahme besteht bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,77 ‰. Bei MPH+Ethanol wird 1,5 h nach Messbeginn eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,74 ‰ gemessen. Es besteht bei diesem Probanden also ebenfalls eine Diskrepanz der maximalen Blutalkoholkonzentration dieser beiden Konditionen von 0,31 ‰ Unterschied, sowie eine Verzögerung von t_{max} der BAK bei MPH+Ethanol im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge von 0,75 h Unterschied. Bei der letzten Messung ist zu beiden Bedingungen immer noch eine Rest-Blutalkoholkonzentration in den Serumproben des Probanden nachweisbar. Abbildung 3-23 zeigt die Blutalkoholkonzentrations-Verläufe der beiden Studientage mit kombinierter Aufnahme von Ethanol für diesen Probanden.

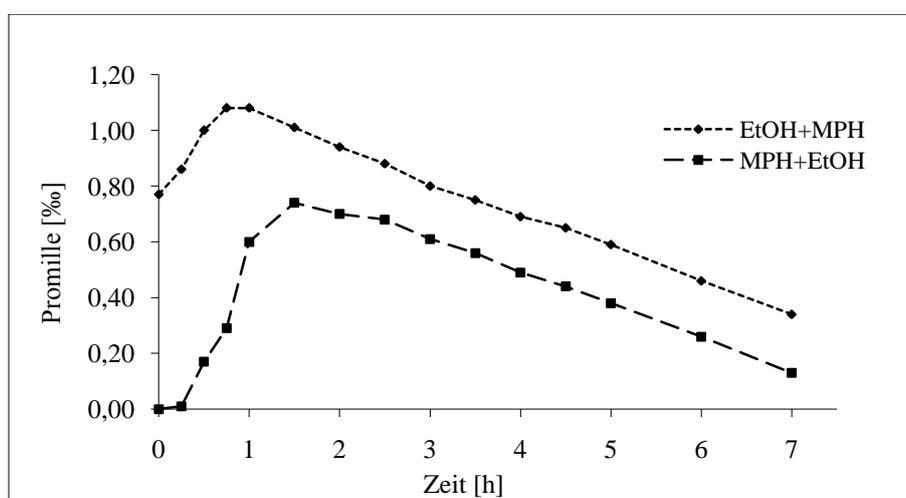


Abbildung 3-23: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband DD 13-07.

3.3.3.7.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Abbildung 3-24 zeigt die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Substanzen Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure von DD 13-07 zu den Bedingungen der drei Studientage.

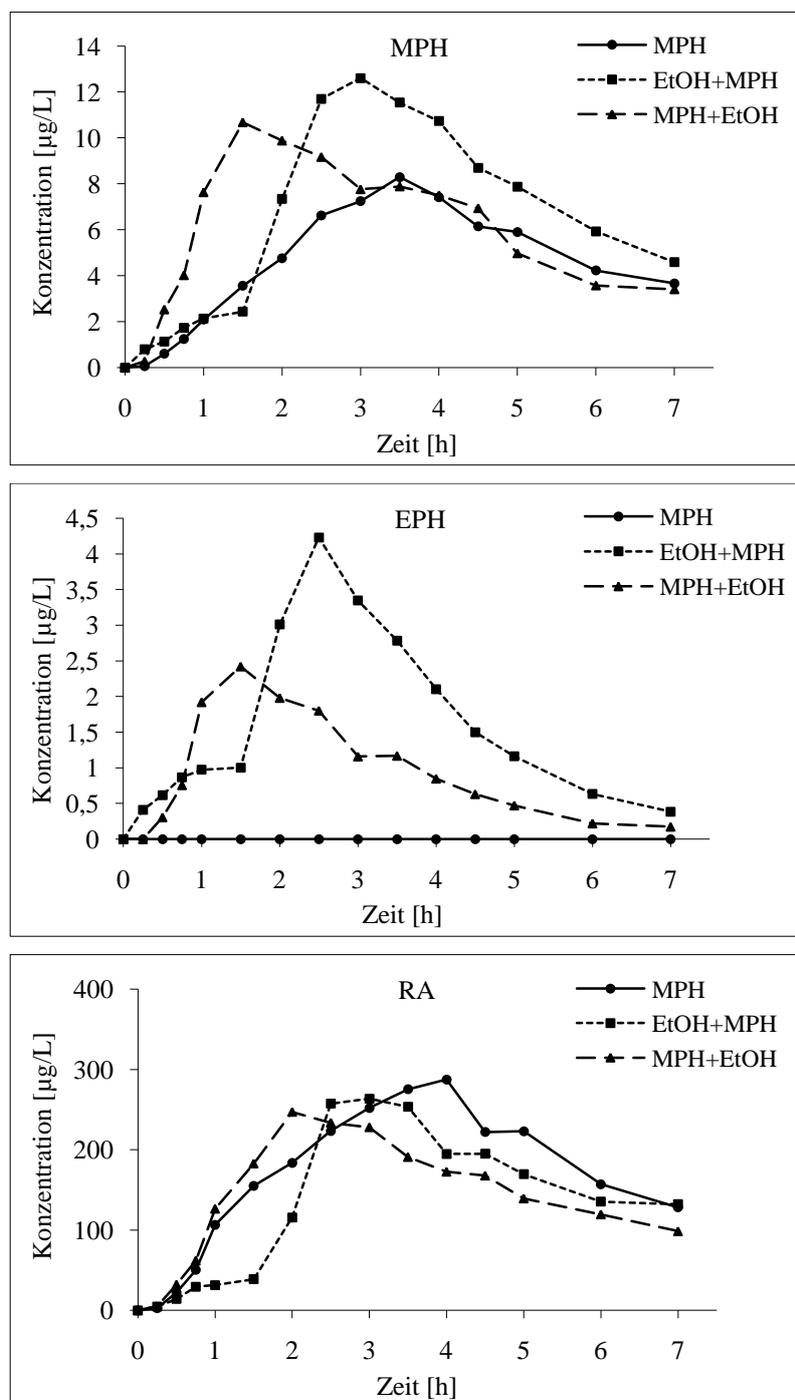


Abbildung 3-24: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von DD 13-07.

Methylphenidat wird bei MPH alleine in einer geringeren maximalen Konzentration und mit einem flacheren Konzentrations-Zeit-Verlauf nachgewiesen vergleicht man diese Bedingung mit den beiden anderen. Bei MPH+Ethanol wird die maximale Konzentration früher erreicht als bei der umgekehrten Reihenfolge. Bei Ethanol+MPH wird dagegen die höchste maximale Konzentration erreicht. Diese ist jedoch im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge 1,5 h verzögert.

Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH wird die maximale Konzentration zwar im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge zu einem späteren Zeitpunkt erreicht, es wird jedoch in einer wesentlich höheren Konzentration gebildet (C_{max} 4,5 $\mu\text{g/l}$ bei 2,5 h vs. 2,5 $\mu\text{g/l}$ bei 1,5 h). Die Elimination verläuft für beide Konditionen über den gesamten Messbereich hinaus.

Ritalinsäure wird bei MPH alleine und MPH+Ethanol mit einem vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verlauf gezeigt. Bei Ethanol+MPH wird die maximale Konzentration 1 h später als bei der umgekehrten Reihenfolge erreicht, die Ausscheidungsphase ist aber mit der der beiden anderen Konditionen vergleichbar. Die höchste maximale Konzentration wird bei MPH alleine nach 4 h erreicht.

Alle drei Analyte sind über den Messbereich von 7 h hinaus noch nachweisbar.

3.3.3.8 CS 14-07

3.3.3.8.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband CS 14-07 klagt bei MPH alleine über Nebenwirkungen in Form von leichten Kopfschmerzen, die ebenfalls zu den beiden Konditionen mit kombinierter Ethanolaufnahme auftreten und bei MPH+Ethanol besonders ausgeprägt sind. Es werden über die drei Studientage Blutdruckwerte zwischen 107/76 mmHg und 133/69 mmHg dokumentiert, der Puls liegt dabei in einem Bereich zwischen 76 und 89/Minute.

CS 14-07 erreicht bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,49 ‰ 1,5 h nach Tabletteneinnahme. Bei Einnahme der Methylphenidatdosis besteht bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,22 ‰. Bei MPH+Ethanol wird eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,64 ‰ 1 h nach Tabletteneinnahme festgestellt.

Abbildung 3-25 zeigt den Blutalkoholkonzentrationsverlauf für die beiden Studientage, an denen Methylphenidat in Kombination mit Ethanol konsumiert wurde.

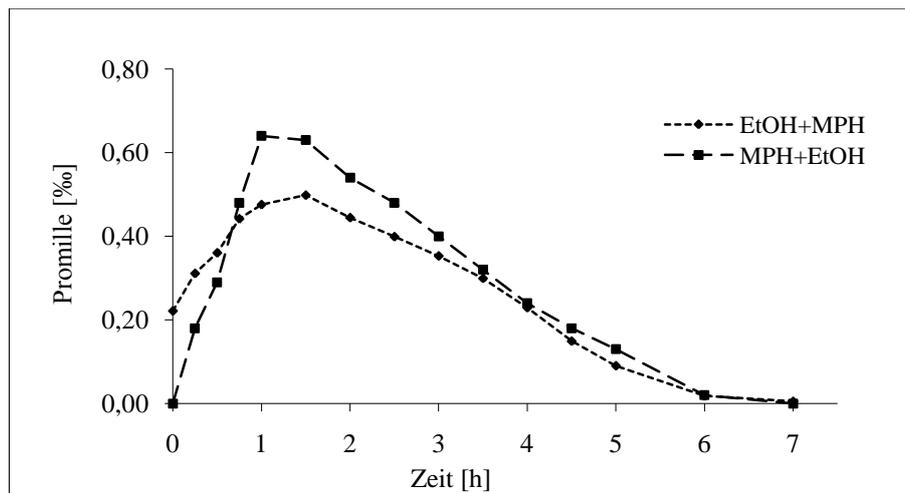


Abbildung 3-25: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband CS 14-07.

3.3.3.8.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Methylphenidat wird bei MPH alleine in einer im Vergleich zu den beiden Studientagen mit Ethanolaufnahme geringeren Konzentration und mit einem verzögerten t_{max} nachgewiesen. Die höchste maximale Konzentration von Methylphenidat wird bei MPH+Ethanol erreicht. Diese erfolgt später als bei Ethanol+MPH, bei der eine geringere Konzentration nachgewiesen wird.

Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht gebildet. Bei Ethanol+MPH wird es in annähernd vergleichbarer maximaler Konzentration zur umgekehrten Reihenfolge, aber zu einem früheren Zeitpunkt gebildet.

Ritalinsäure kann zu den Bedingungen der drei Studientage in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verläufen bestimmt werden, wobei bei Ethanol+MPH ein geringerer Konzentrations-Zeit-Verlauf im Vergleich zu den beiden anderen Konditionen, aber mit vergleichbarer Eliminationsphase, gezeigt wird.

Abbildung 3-26 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurven von Methylphenidat, Ethylphenidat und Ritalinsäure von Proband CS 14-07 zu den Bedingungen der drei Studientage.

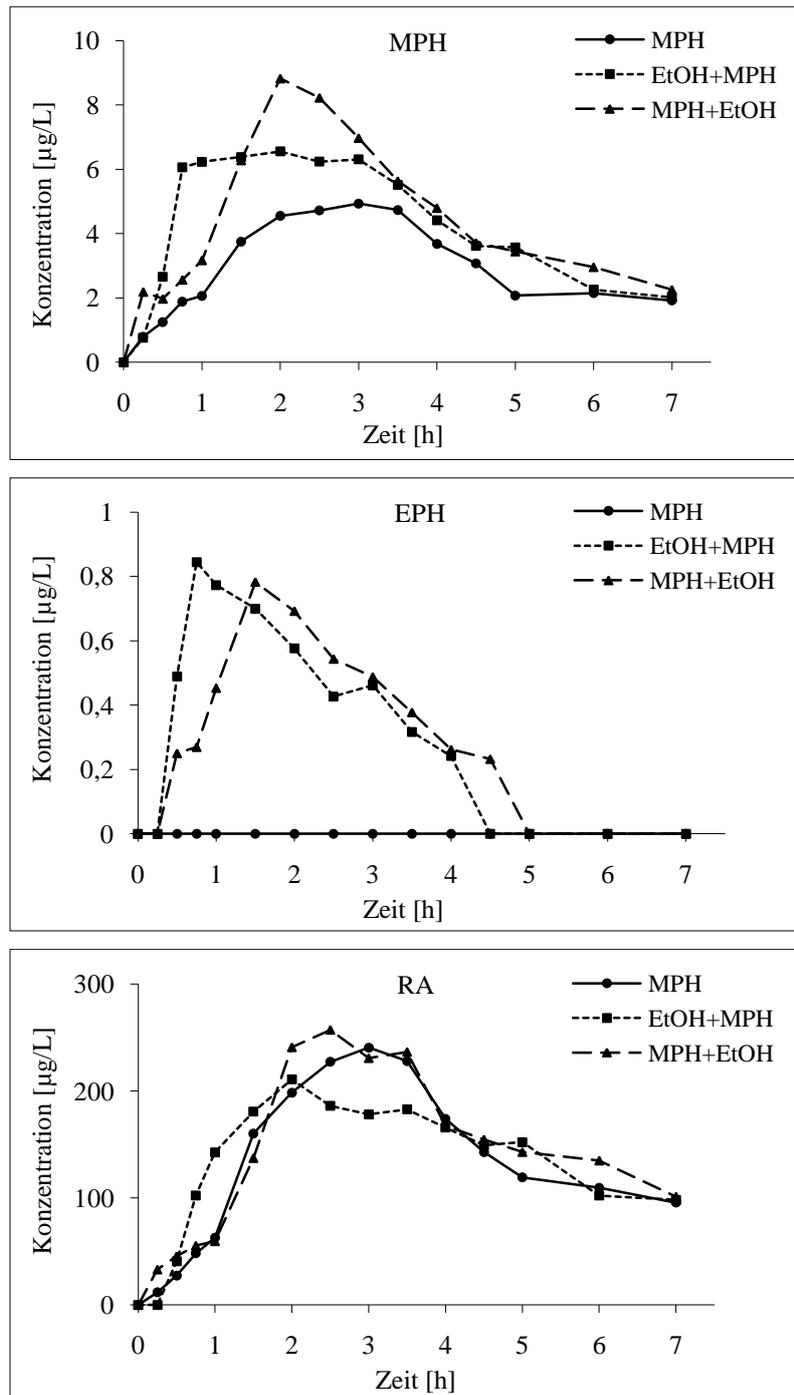


Abbildung 3-26: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von CS 14-07.

3.3.3.9 SN 18-07

3.3.3.9.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Der Proband SN 18-07 klagt, wie ein Großteil der restlichen Probanden, zu den Bedingungen der drei Studientage über leichte bis mäßige Kopfschmerzen. Diese sind

bei den Konditionen mit kombinierter Ethanolaufnahme stärker ausgeprägt als bei MPH alleine. Die Kontrollen der Blutdruckwerte zeigen einen Messbereich zwischen 108/84 mmHg und 167/90 mmHg bei Ethanol+MPH 3 h nach Tabletteneinnahme.

Der Proband erreicht bei Ethanol+MPH eine maximale Blutalkoholkonzentration von 0,48 ‰ gemessen 1,5 h nach Tabletteneinnahme. Zum Zeitpunkt der Einnahme dieser Prüfsubstanz liegt bereits eine Blutalkoholkonzentration von 0,25 ‰ vor. Bei MPH+Ethanol wird eine maximale BAK von 0,54 ‰ 2,5 h nach Einnahme der Prüfsubstanz erreicht. Es findet sich also eine geringe Diskrepanz der BAK von 0,06 ‰ Unterschied, bei deutlich verzögertem t_{max} der BAK von 1 h Unterschied.

Den Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen dieser beiden Studientage für SN 18-07 zeigt Abbildung 3-27.

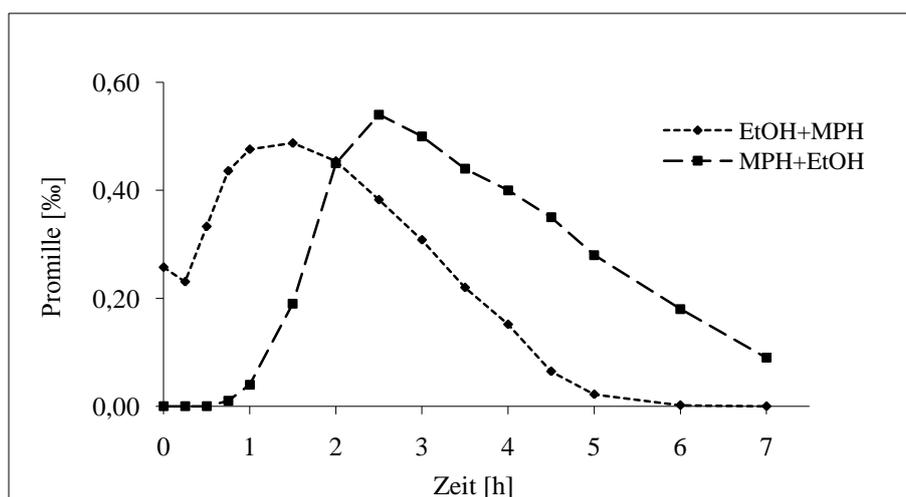


Abbildung 3-27: Verlauf der Blutalkoholkonzentrationen der beiden Studientage mit Ethanolaufnahme von Proband SN 18-07.

3.3.3.9.2 Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven

Methylphenidat wird in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Verläufen zu allen drei Bedingungen nachgewiesen. Bei MPH alleine lässt sich eine schnellere Elimination feststellen als an den beiden anderen Studientagen. Bei Ethanol+MPH wird die geringste maximale Konzentration nachgewiesen.

Ethylphenidat wird bei MPH alleine nicht nachgewiesen. Bei Ethanol+MPH wird eine höhere Ethylphenidatkonzentration in den Serumproben gemessen (C_{max} 1 µg/l vs. 0,4 µg/l), die im Vergleich zu MPH+Ethanol früher auftritt (t_{max} 2 h vs. 2,5 h).

Ritalinsäure kann bei MPH alleine und bei MPH+Ethanol in vergleichbaren Konzentrations-Zeit-Kurven dargestellt werden. Bei Ethanol+MPH zeigt sich im Vergleich zu den Bedingungen der anderen beiden Konditionen eine verminderte Ritalinsäurebildung, deren Konzentrations-Zeit-Verlauf flacher verläuft und länger persistiert. Sowohl Ritalinsäure, als auch Methylphenidat können über den Messzeitraum von 7 h im Serum hinaus nachgewiesen werden. (Abbildung 3-28)

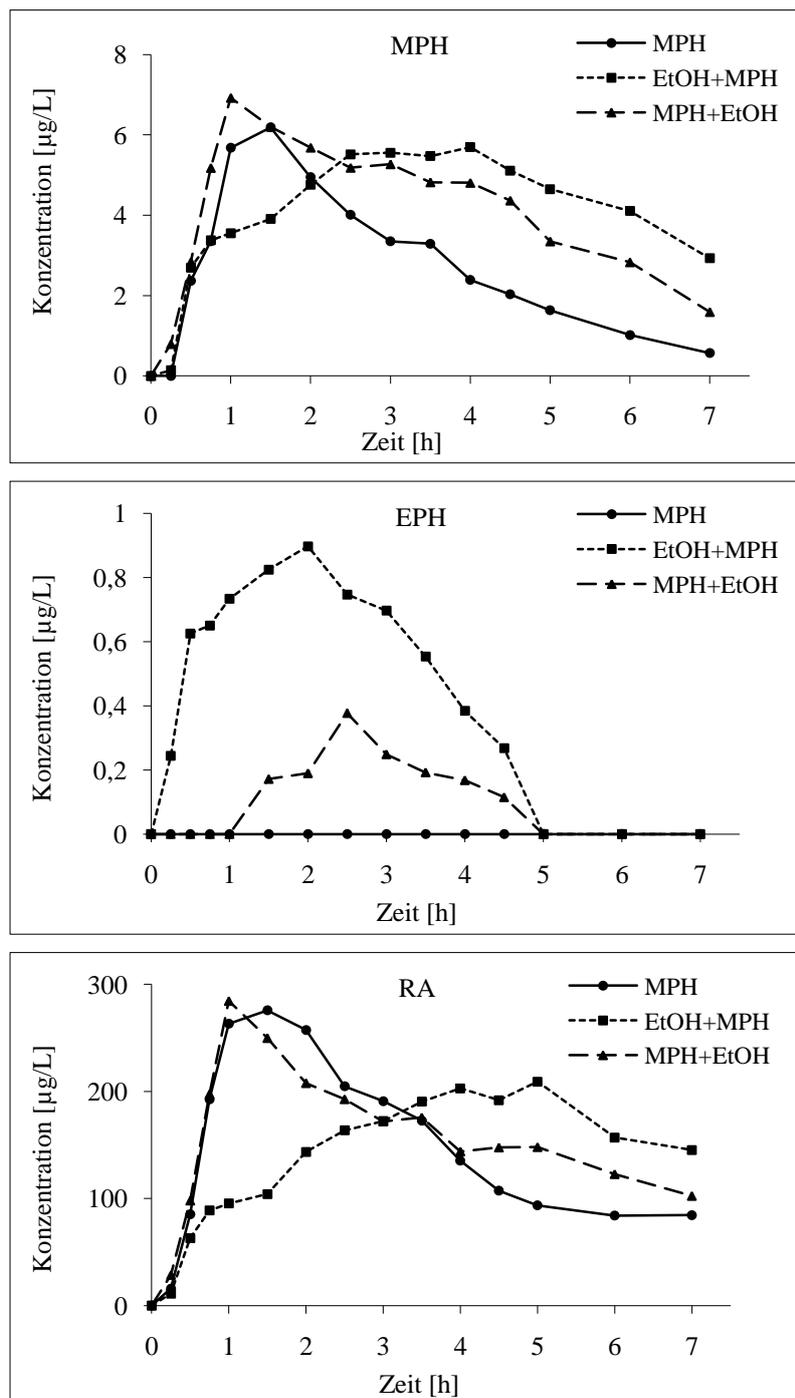


Abbildung 3-28: Konzentration-Zeit-Verläufe von Methylphenidat (MPH), Ethylphenidat (EPH) und Ritalinsäure (RA) von SN 18-07.

3.3.4 Pharmakokinetische Auswertung

Die pharmakokinetische Auswertung der hier durchgeführten Probandenstudie setzt sich aus den berechneten pharmakokinetischen Parametern eines jeden einzelnen Probanden, sowie aus der zusammenfassende Auswertung der Daten von 8 der 9 Probanden zusammen. Der Proband TH 01-07 wird aus der zusammenfassenden Auswertung ausgeschlossen, da seine Konzentrations-Zeit-Verläufe bei sehr hohen Methylphenidatkonzentrationen einen gehemmten Methylphenidatmetabolismus mit nur geringfügiger Ritalinsäurebildung, aber normaler bis hoher Ethylphenidatbildung zeigt. Bei ihm die höchste Ethylphenidatkonzentration aller Probanden bei der Bedingung MPH+Ethanol erreicht. In der zusammenfassenden Auswertung der pharmakokinetischen Parameter ist dieser Proband nicht berücksichtigt. Seine Daten werden in der Auswertung der pharmakokinetischen Auswertung der einzelnen Probanden dargestellt.

Um die Pharmakokinetik der kombinierten Einnahme von Methylphenidat zusammen mit Ethanol zu charakterisieren, werden aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen der Probanden die in 2.1.6.1 beschriebenen pharmakokinetischen Parameter berechnet. Dazu zählen die maximale Konzentration (C_{max}), die maximale Zeit (t_{max}), die Area under the curve (AUC) für den Messzeitraum und über den Messzeitraum hinaus (AUC_{inf}), die Mean residence time (MRT), die Latenzzeit (t_{lag}), Clearance (Cl_f) und Verteilungsvolumen (V_f) in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit von Methylphenidat und die Halbwertszeiten der Absorption bzw. Bildung der Analyte (HL K01) und der Elimination (HL K10).

Die wesentlichen Ergebnisse für Methylphenidat bei alleiniger Methylphenidateinnahme (MPH alleine) der Einzelauswertung der Probanden sind in Tabelle 3-13 gezeigt. Auffällig sind die Daten von Proband TH 01-07 und SN 18-07, die vor allem eine hohe C_{max} mit 28,6 $\mu\text{g/l}$ mit korrespondierender AUC und AUC_{inf} zeigen, aber auch ein wesentlich erniedrigtes Verteilungsvolumen im Vergleich zu den restlichen Probanden aufweisen.

Tabelle 3-14 zeigt die zusammenfassende Auswertung der pharmakokinetischen Daten der Auswertung für Methylphenidat bei alleiniger Methylphenidateinnahme (MPH alleine).

MPH alleine	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	Cl_f [l/h]	V_f [L]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	28,6	1,6	151,3	310,5	10,6	65	610	0,3	6,5	0,3
FM 04-07	4,9	1,9	20,2	24,9	5,0	742	2738	0,4	2,6	0,5
CD 05-07	7,0	1,0	21,4	23,8	3,5	794	2101	0,2	1,8	0,2
ST 07-07	12,9	1,0	69,5	236,4	18,4	84	1475	0,04	12,1	0,1
DP 09-07	7,1	0,9	23,8	27,5	3,6	738	2224	0,2	2,1	0,2
AM 10-07	6,7	2,8	29,2	36,5	5,6	534	1623	1,0	2,1	0,8
DD 13-07	7,0	3,6	33,8	43,3	6,5	407	1057	1,0	1,8	1,8
CS 14-07	4,6	2,8	21,1	25,5	5,8	708	1592	0,5	1,6	1,6
SN 18-07	28,6	1,8	19,2	25,1	11,6	59	607	0,4	7,2	0,3

Tabelle 3-13: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Methylphenidat (MPH) bei alleiniger Methylphenidateinnahme (MPH alleine).

MPH alleine	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	Cl_f [l/h]	V_f [L]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	4,6	0,9	19,2	23,8	3,5	59	607	0,04	1,6	0,2
Max	28,6	3,6	69,5	236,4	18,4	794	2738	1,0	12,1	1,8
Median	7,0	1,9	22,6	26,5	5,7	621	1607	0,4	2,1	0,4
Mittelwert	9,8	2,0	29,8	55,4	7,5	508	1677	0,5	3,9	0,7
Stabw	8,0	1,0	16,8	73,5	5,1	298	675	0,4	3,8	0,7
VK %	81,2	50,6	0,6	1,3	67,7	58,6	40,2	75,5	97,1	92,8

Tabelle 3-14: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Methylphenidat für die alleinige Methylphenidateinnahme (MPH alleine) für n=8 Probanden.

Tabelle 3-15 zeigt die Übersicht der Einzelauswertung der pharmakokinetischen Daten der Probanden für Methylphenidat bei Ethanolaufnahme 30 Minuten vor Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH). Auch bei dieser Bedingung sind die pharmakokinetischen Daten von TH 01-07 auffällig. Er zeigt auch bei dieser Bedingung, im Gegensatz zu SN 18-07, wieder eine hohe Cmax mit 29,1 µg/l bei korrespondierend hoher AUC bzw. AUCinf. Das Verteilungsvolumen ist bei dieser Bedingung im Vergleich zu den Daten der restlichen Probanden wiederum mit 477 L vermindert.

Die zusammenfassende Auswertung der Pharmakokinetik für Methylphenidat unter der Bedingung Ethanol+MPH wird in Tabelle 3-16 gezeigt.

EtOH+MPH	C _{max} [µg/l]	t _{max} [h]	AUC [h*µg/l]	AUC _{inf} [h*µg/l]	MRT _{inf} [h]	Cl _f [l/h]	V _f [L]	t _{lag} [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	29,1	2,1	125,7	134,2	3,7	144	477	0,9	2,3	0,4
FM 04-07	5,4	3,0	24,6	29,5	5,5	626	1386	0,8	1,5	1,5
CD 05-07	7,8	1,4	24,2	25,5	2,9	806	1342	0,3	1,2	0,5
ST 07-07	6,0	0,7	21,7	24,0	2,9	724	2904	0,2	2,8	0,1
DP 09-07	8,3	1,6	33,5	37,9	3,8	528	1390	0,2	1,8	0,6
AM 10-07	11,9	1,1	54,9	83,1	8,5	250	1422	0,2	3,9	0,2
DD 13-07	11,9	3,0	48,4	59,9	5,6	348	873	1,4	1,7	0,8
CS 14-07	7,0	1,74	30,2	37,3	4,5	535	1899	0,3	2,5	0,5
SN 18-07	5,6	3,0	29,9	38,4	6,2	459	1322	0,1	2,0	2,0

Tabelle 3-15: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Methylphenidat bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH).

EtOH+MPH	C _{max} [µg/l]	t _{max} [h]	AUC [h*µg/l]	AUC _{inf} [h*µg/l]	MRT _{inf} [h]	Cl _f [l/h]	V _f [L]	t _{lag} [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	5,4	0,7	21,7	24,0	2,9	250	873	0,1	1,2	0,1
Max	12,0	3,0	54,9	83,1	8,5	806	2904	1,4	3,9	2,0
Median	7,4	1,7	30,1	37,6	5,0	531	1388	0,2	1,9	0,6
Mittelwert	8,0	2,0	33,4	41,9	5,0	535	1567	0,4	2,2	0,8
Stabw	2,6	0,9	12,0	20,1	1,9	185	607	0,5	0,9	0,7
VK %	33,0	47,4	0,4	0,5	37,7	34,6	38,7	104,7	40,2	83,5

Tabelle 3-16: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Methylphenidat bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH) für n=8 Probanden.

Für die Methylphenidateinnahme 30 Minuten vor Ethanolaufnahme (MPH+Ethanol) von Methylphenidat werden für die pharmakokinetische Einzelauswertung der Probandendaten die in Tabelle 3-17 gezeigten Daten berechnet. Auch bei dieser Bedingung zeigt TH 01-07 eine auffällig hohe C_{max} mit 27,2 µg/l im Vergleich zu den restlichen Probanden. Auch das Verteilungsvolumen ist wieder deutlich erniedrigt. Bei dieser Bedingung fällt jedoch auch eine deutliche Erhöhung der MRT auf, die bei 13,2 h liegt, die Halbwertszeit der Elimination ist mit 5,7 h leicht erhöht.

Tabelle 3-18 zeigt die zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung der Probandendaten für Methylphenidat unter der Bedingung MPH+Ethanol.

MPH+EtOH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	Cl_f [l/h]	V_f [L]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	27,2	1,5	29,1	42,1	13,2	78	636	0,3	5,7	0,3
FM 04-07	6,7	2,0	45,8	67,7	5,4	424	2155	0,4	3,5	0,5
CD 05-07	8,8	1,2	32,0	39,1	2,8	685	1813	0,6	1,8	0,2
ST 07-07	6,3	1,3	31,8	36,0	2,8	1070	1997	0,5	1,3	0,3
DP 09-07	7,6	0,7	25,5	28,8	3,2	652	2288	0,3	2,4	0,1
AM 10-07	10,5	0,8	141,8	250,9	7,7	277	1772	0,3	4,4	0,1
DD 13-07	10,0	1,9	17,6	18,7	5,5	357	1317	0,4	2,6	0,6
CS 14-07	6,8	2,3	26,1	26,8	4,8	524	1083	0,3	1,4	1,4
SN 18-07	6,4	1,6	43,5	59,0	4,1	510	2315	0,2	3,2	0,4

Tabelle 3-17: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Methylphenidat bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH).

MPH+EtOH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	Cl_f [l/h]	V_f [L]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	6,3	0,7	17,6	18,7	2,8	277	1083	0,2	1,3	0,1
Max	10,5	2,3	141,8	250,9	7,7	1070	2315	0,6	4,4	1,4
Median	7,2	1,5	31,9	37,5	4,4	517	1905	0,3	2,5	0,4
Mittelwert	7,9	1,5	45,5	65,9	4,5	562	1842	0,4	2,6	0,5
Stabw	1,7	0,6	40,0	76,5	1,7	247	447	0,1	1,1	0,4
VK %	21,1	39,3	0,9	1,2	37,2	44,0	24,3	35,1	41,9	98,1

Tabelle 3-18: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Methylphenidat bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH) für n=8 Probanden.

Für Ritalinsäure errechnen sich für die Einzelauswertung der pharmakokinetischen Parameter der Probanden für die alleinige Methylphenidateinnahme (MPH alleine) die in Tabelle 3-19 dargestellten Daten. Auch bei dieser Bedingung zeigt TH 01-07 außergewöhnliche Werte. Es zeigt sich eine deutlich verminderte Cmax mit 49,8 µg/l, sowie eine deutlich verlängerte MRTinf von 11,6 h. Außerdem ist die Halbwertszeit der Elimination mit 27,0 h stark erhöht.

Die zusammenfassende Auswertung der pharmakokinetischen Daten für MPH alleine ist in Tabelle 3-20 dargestellt.

MPH alleine	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	49,8	2,5	305,3	1935,5	11,6	0,2	27,0	0,4
FM 04-07	321,9	2,3	1434,5	1925,1	6,7	0,6	2,8	0,6
CD 05-07	308,9	1,5	1257,6	1651,0	5,6	0,3	2,8	0,4
ST 07-07	442,8	1,3	1674,0	2378,1	5,7	0,4	3,4	0,2
DP 09-07	329,1	1,1	1253,6	1589,0	5,7	0,2	2,4	0,3
AM 10-07	323,6	2,6	1402,7	2065,5	7,0	1,1	3,2	0,5
DD 13-07	250,5	3,6	1246,6	1588,3	6,2	0,9	1,9	1,8
CS 14-07	220,8	3,0	978,2	1181,5	9,7	0,8	1,5	1,5
SN 18-07	272,6	1,5	1040,9	1367,7	5,4	0,4	2,7	0,3

Tabelle 3-19: Übersicht der pharmakokinetischen Auswertung aller Studienprobanden für Ritalinsäure bei alleiniger Methylphenidateinnahme (MPH alleine).

MPH alleine	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	220,8	1,1	978,2	1181,5	5,4	0,2	1,5	0,2
Max	442,8	3,6	1674,0	2378,1	9,7	1,1	3,4	1,8
Median	315,4	1,9	1255,6	1620,0	5,9	0,5	2,7	0,4
Mittelwert	308,8	2,1	1286,0	1718,3	6,5	0,6	2,6	0,7
Stabw	66,8	0,9	221,8	386,9	1,4	0,3	0,6	0,6
VK %	21,6	42,5	0,2	0,2	21,8	53,6	25,1	90,5

Tabelle 3-20: Allgemeine pharmakokinetische Auswertung für Ritalinsäure bei alleiniger Methylphenidateinnahme für n=8 Probanden.

Tabelle 3-21 zeigt die Übersicht der Einzelauswertung der Probandendaten für Ethanol+MPH für Ritalinsäure. Auch bei dieser Bedingung ist Cmax von Ritalinsäure bei Proband TH 01-07 mit 60,3 µg/l deutlich verringert. Wie bereits bei der alleinigen Methylphenidateinnahme beschrieben, ist auch bei dieser Bedingung die MRTinf deutlich verlängert (16,6 h), ebenso wie die Halbwertszeit der Elimination mit 25,2 h. Tabelle 3-22 zeigt die zusammenfassende Auswertung der pharmakokinetischen Probandendaten für Ritalinsäure bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH).

EtOH+MPH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	60,3	3,4	327,5	2245,9	16,6	1,0	25,2	0,4
FM 04-07	298,6	3,2	1341,0	1774,2	7,2	1,0	1,8	1,2
CD 05-07	235,0	2,0	1097,9	1554,8	7,0	0,4	3,0	0,6
ST 07-07	292,6	2,0	1444,5	2020,3	8,2	0,1	2,9	0,7
DP 09-07	246,1	2,2	1163,3	1583,9	6,4	0,3	2,6	0,7
AM 10-07	243,1	2,2	1132,2	1280,4	3,8	0,4	2,1	0,8
DD 13-07	243,0	3,1	1012,0	1130,2	7,4	1,4	0,6	2,5
CS 14-07	199,0	2,2	981,9	1527,2	6,6	0,5	3,9	0,5
SN 18-07	188,0	4,1	1047,5	1636,6	7,7	0,1	2,8	2,8

Tabelle 3-21: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Ritalinsäure bei Ethanol Aufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH).

EtOH+MPH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	Tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	187,9	2,0	981,9	1130,2	3,8	0,1	0,6	0,5
Max	298,6	4,1	1444,5	2020,3	8,2	1,4	3,9	2,8
Median	243,0	2,2	1115,0	1569,3	7,1	0,4	2,7	0,8
Mittelwert	243,2	2,6	1152,5	1563,4	6,8	0,5	2,5	1,2
Stabw	38,9	0,8	162,2	274,7	1,4	0,5	1,0	0,9
VK %	16,0	28,8	0,1	0,2	20,0	90,2	39,2	73,1

Tabelle 3-22: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Ritalinsäure bei Ethanol Aufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH) für n=8 Probanden.

Eine Übersicht über die pharmakokinetischen Daten der Einzelauswertung der Probanden für die Bedingung MPH+Ethanol für Ritalinsäure zeigt Tabelle 3-23. TH 01-07 zeigt auch bei dieser Bedingung eine außergewöhnlich niedrige Cmax für Ritalinsäure, die aber im Vergleich der drei Bedingungen den höchsten Wert erreicht. Im Vergleich zu den restlichen Probanden ist MRTinf mit 11,0 h deutlich verlängert, während die Halbwertszeit der Elimination mit 4,5 h nur eine geringfügige Verlängerung zeigt ist. Bei dieser Bedingung finden sich für den Probanden, der in Bezug auf die Funktion der humanen Carboxylesterase als „poor metabolizer“ eingestuft wird, außerdem ein geringfügig verlängertes tmax (3,3 h), sowie eine erniedrigte AUC (479,4 h*µg/l).

Die zusammenfassende Auswertung der Probandendaten der pharmakokinetischen Parameter für Ritalinsäure bei MPH+Ethanol zeigt Tabelle 3-24.

MPH+EtOH	C _{max} [µg/l]	t _{max} [h]	AUC [h*µg/l]	AUC _{inf} [h*µg/l]	MRT _{inf} [h]	t _{lag} [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	86,4	3,3	479,4	895,2	11,0	0,3	4,5	1,1
FM 04-07	302,9	1,67	1376,4	2043,5	7,2	0,4	3,6	0,3
CD 05-07	239,1	1,8	1079,2	1544,1	6,0	0,7	3,7	0,3
ST 07-07	368,4	1,6	1538,6	1984,2	5,9	0,3	2,5	0,4
DP 09-07	322,5	1,0	1281,4	1758,9	5,7	0,4	3,1	0,1
AM 10-07	277,0	1,4	1306,2	2077,3	12,2	0,3	4,2	0,3
DD 13-07	227,3	2,4	1056,8	1383,3	6,8	0,5	2,3	0,9
CS 14-07	237,6	2,7	1061,3	1422,9	6,4	1,0	2,5	0,6
SN 18-07	235,5	1,5	1117,7	1685,5	6,2	0,3	3,9	0,3

Tabelle 3-23: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Ritalinsäure bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH).

MPH+EtOH	C _{max} [µg/l]	t _{max} [h]	AUC [h*µg/l]	AUC _{inf} [h*µg/l]	MRT _{inf} [h]	t _{lag} [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	227,3	1,0	1056,8	1383,3	5,7	0,3	2,3	0,1
Max	368,4	2,7	1538,6	2077,3	12,2	1,0	4,2	0,9
Median	258,0	1,6	1199,5	1722,2	6,3	0,4	3,3	0,3
Mittelwert	276,3	1,8	1227,2	1737,5	7,0	0,5	3,2	0,4
Stabw	51,1	0,6	176,8	276,5	2,1	0,3	0,7	0,2
VK %	18,5	31,6	0,1	0,2	30,5	58,6	22,6	59,5

Tabelle 3-24: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Ritalinsäure bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH) für n=8 Probanden.

Für Ethylphenidat, dass einzig an den beiden Studientagen mit kombinierter Methylphenidateinnahme und Ethanolaufnahme nachgewiesen werden kann, ergeben sich die in Tabelle 3-25 dargestellten pharmakokinetischen Daten in der Einzelauswertung der Probanden für die Bedingung Ethanol+MPH. Auffällig bei der Übersicht dieser Daten ist ebenfalls das Datenprofil von TH 01-07. Zwar zeigt sich bei ihm eine im Vergleich zu den restlichen Probanden normale C_{max} des gebildeten Ethylphenidats. Jedoch sind MRT_{inf} (14 h) und die Halbwertszeit der Elimination (4 h) auch bei diesem Analyten wieder deutlich verlängert. Für t_{max} und AUC bzw. AUC_{inf}

zeigt sich ebenfalls eine Verlängerung bzw. Erhöhung, die aber nur geringfügig ausgeprägt ist.

Die zusammenfassende Auswertung der pharmakokinetischen Daten der Probanden für Ethylphenidat bei Ethanol+MPH zeigt Tabelle 3-26.

EtOH+MPH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	2,0	2,5	10,2	16,9	14,0	0,9	4,0	0,5
FM 04-07	0,7	1,8	2,3	3,4	4,2	0,5	2,5	0,4
CD 05-07	1,2	1,1	2,6	2,6	1,9	0,4	0,5	0,5
ST 07-07	0,9	0,4	2,0	2,3	3,1	0,2	1,5	0,03
DP 09-07	1,2	1,1	3,7	4,4	2,9	0,2	1,7	0,3
AM 10-07	2,6	0,8	7,5	8,4	5,6	0,2	1,6	0,2
DD 13-07	3,2	2,4	11,5	12,1	3,5	0,9	1,0	1,0
CS 14-07	0,8	0,9	2,0	2,7	2,6	0,5	1,9	0,1
SN 18-07	0,9	1,6	2,8	3,2	2,7	0,1	1,0	1,0

Tabelle 3-25: Übersicht der pharmakokinetischen Daten aller Studienprobanden für Ethylphenidat bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH).

EtOH+MPH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	0,7	0,4	2,0	2,3	1,9	0,1	0,5	0,03
Max	3,2	2,4	11,5	12,1	5,6	0,9	2,5	1,0
Median	1,1	1,1	2,7	3,3	3,0	0,3	1,6	0,4
Mittelwert	1,4	1,2	4,3	4,9	3,3	0,4	1,5	0,4
Stabw	0,9	0,6	3,4	3,5	1,1	0,3	0,6	0,4
VK %	65,5	50,7	0,8	0,7	34,6	76,1	42,1	87,6

Tabelle 3-26: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Ethylphenidat bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme (EtOH+MPH) für n=8 Probanden.

Bei der umgekehrten Reihenfolge (MPH+Ethanol), berechnen sich die in Tabelle 3-27 dargestellten Daten für die Einzelauswertung der Probanden. Auch bei dieser Bedingung sind die berechneten pharmakokinetischen Daten von TH 01-07 auffällig. Neben der deutlich erhöhten Cmax von 3,3 µg/l mit korrespondierender hoher AUC bzw. AUCinf, bewegen sich die Werte der restlichen Parameter in einem mit den restlichen Probanden vergleichbaren Bereich.

Für die zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung ergeben sich aus den in Tabelle 3-27 gezeigten Daten die in Tabelle 3-28 dargestellten Werte.

MPH+EtOH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
TH 01-07	3,3	2,4	15,9	22,1	5,8	0,5	3,1	0,6
FM 04-07	0,4	2,5	1,2	1,3	3,5	1,2	0,9	0,9
CD 05-07	0,7	1,0	1,5	1,6	2,4	0,6	1,4	0,1
ST 07-07	0,3	1,2	0,4	0,6	3,2	1,0	1,1	0,04
DP 09-07	0,3	0,7	0,5	0,6	2,5	0,3	0,9	0,1
AM 10-07	0,6	1,0	2,2	4,8	9,9	0,1	4,7	0,2
DD 13-07	2,2	1,6	6,7	6,9	3,0	0,5	1,0	0,6
CS 14-07	0,7	1,8	2,0	2,3	3,4	0,4	1,0	0,9
SN 18-07	0,3	2,5	0,7	0,9	3,7	1,4	0,8	0,8

Tabelle 3-27: Übersicht der pharmakokinetischen Auswertung aller Studienprobanden für Ethylphenidat bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH).

MPH+EtOH	Cmax [µg/l]	tmax [h]	AUC [h*µg/l]	AUCinf [h*µg/l]	MRTinf [h]	tlag [h]	HL K10 [h]	HL K01 [h]
Min	0,3	0,7	0,4	0,6	2,4	0,1	0,76	0,04
Max	2,2	2,5	6,7	6,9	9,9	1,4	4,7	0,9
Median	0,5	1,4	1,3	1,4	3,3	0,5	1,0	0,4
Mittelwert	0,7	1,5	1,9	2,4	4,0	0,7	1,5	0,5
Stabw	0,6	0,7	2,0	2,3	2,5	0,45	1,3	0,4
VK %	94,5	44,5	1,1	1,0	61,8	66,5	89,2	84,5

Tabelle 3-28: Zusammenfassende pharmakokinetische Auswertung für Ethylphenidat bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme (MPH+EtOH) für n=8 Probanden.

3.3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der statistischen Auswertung der Probandendaten wird auf Grund der großen Heterogenität der Daten, die sich aus den Schwankungen der Blutalkoholkonzentrationen der Probanden an den beiden Studientagen mit Ethanolaufnahme und den inter-individuellen Unterschieden im Methylphenidatmetabolismus erklären lassen, nicht von einer Normalverteilung ausgegangen. Zum Vergleich der drei Konditionen, der alleinigen Methylphenidateinnahme (MPH alleine), der Ethanolaufnahme vor

Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH) und der Methylphenidateinnahme vor der Ethanolaufnahme (MPH+Ethanol), werden über SPSS (Version 14) nicht-parametrische Tests wie der Mann-Whitney-Test verwendet. Außerdem werden bei diesem Vergleich nur 8 der 9 Probanden berücksichtigt. TH 01-07 wird durch die bei ihm beobachteten im Vergleich zu den restlichen Probanden hohen Methylphenidat-Wirkstoffkonzentrationen bei niedrigen Ritalinsäurekonzentrationen, sowie durch die beobachteten Unterschiede in den pharmakokinetischen Parametern der drei Bedingungen, aus der vergleichenden Bewertung der pharmakokinetischen Daten ausgenommen.

Für Methylphenidat ergeben sich bei Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der drei Konditionen über den Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell sind die Methylphenidat-Wirkstoffkonzentrationen bei MPH alleine niedriger als bei Einnahme in Kombination mit Ethanol, unabhängig von der Reihenfolge.

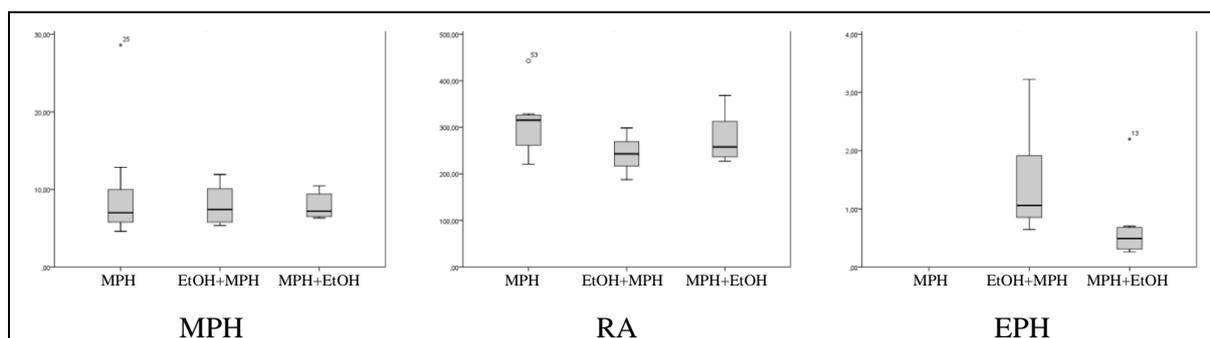


Abbildung 3-29: Boxplots für die maximale Konzentration C_{max} von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) der verschiedenen Studientagbedingungen.

Für Ritalinsäure ergibt sich im Vergleich der Bedingungen von MPH alleine zu Ethanol+MPH ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für C_{max} . Die Ritalinsäurekonzentration nimmt im Vergleich zur alleinigen Methylphenidateinnahme bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme signifikant ab.

Für Ethylphenidat ergeben sich bei Vergleich der Studientage mit Ethanolbeteiligung ebenfalls signifikante Unterschiede in C_{max} ($p < 0,01$). Die maximale Konzentration nimmt bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme zur umgekehrten Reihenfolge signifikant ab (Abbildung 3-29).

Vergleicht man die pharmakokinetischen Parameter für Ritalinsäure, die bei Ethanol+MPH und der umgekehrten Einnahmereihenfolge gemessen werden, ergibt

sich außerdem ein signifikanter Unterschied für die Halbwertszeit der Ritalinsäurebildung ($p < 0,01$). Diese nimmt von der Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme zur umgekehrten Reihenfolge signifikant ab. Bei Vergleich von MPH alleine zu Ethanol+MPH, zeigt sich ein annähernder signifikanter Unterschied für die Halbwertszeit der Bildung mit $p = 0,065$. Diese nimmt von der alleinigen Methylphenidateinnahme zu Ethanol vor Methylphenidat zu (Abbildung 3-30).

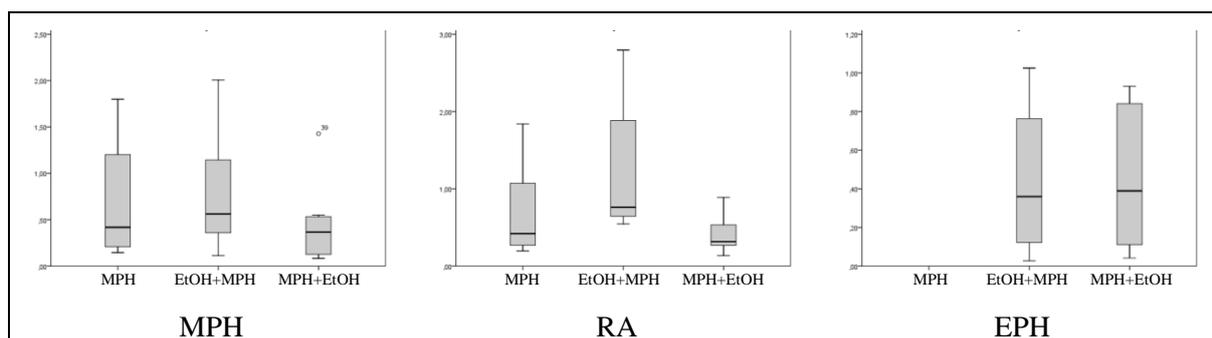


Abbildung 3-30: Boxplots für die Halbwertszeit der Absorption von Methylphenidat (MPH) bzw. der Bildung von Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) der verschiedenen Studientagbedingungen .

Auch t_{max} ist für Ritalinsäure bei Vergleich dieser Studientagbedingungen signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Es nimmt von Ethanol+MPH zu MPH+Ethanol signifikant ab (Abbildung 3-31).

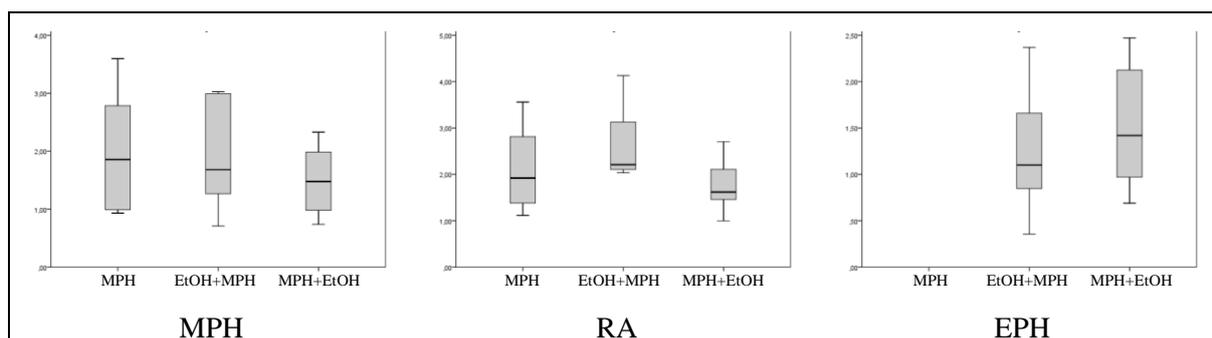


Abbildung 3-31: Boxplots für t_{max} von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) der verschiedenen Studientagbedingungen.

Für Ethylphenidat ergeben sich bei Vergleich der Studientage mit Ethanolbeteiligung, signifikante Unterschiede für die AUC ($p < 0,05$). Die AUC nimmt von Ethanol+MPH zur umgekehrten Einnahmereihenfolge der Prüfsubstanzen signifikant ab, dargestellt als Boxplots in Abbildung 3-32.

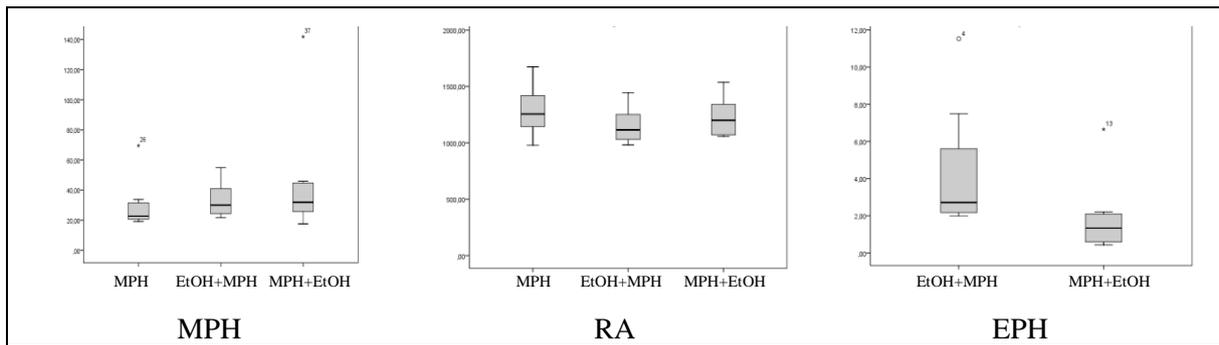


Abbildung 3-32: Boxplots für die AUC von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) der verschiedenen Studientagbedingungen.

Auch für die AUCinf errechnen sich für Ethylphenidat signifikante Unterschiede bei Vergleich der Studientage mit Ethanolbeteiligung ($p < 0,05$) (Abbildung 3-33). Auch hier nimmt die AUCinf signifikant ab, wird Alkohol vor Methylphenidat eingenommen.

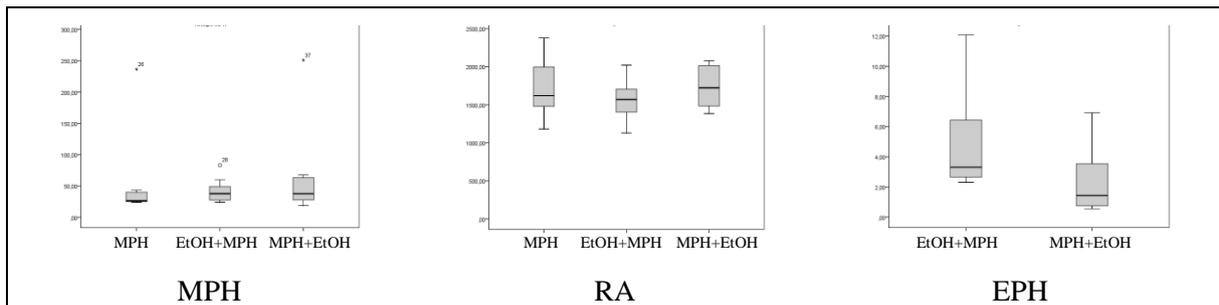


Abbildung 3-33: Boxplots für die AUCinf von Methylphenidat (MPH), Ritalinsäure (RA) und Ethylphenidat (EPH) der verschiedenen Studientagbedingungen.

Vergleicht man die Eliminationshalbwertszeiten von Methylphenidat und Ethylphenidat, zeigt sich bei MPH+Ethanol ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Die Eliminationshalbwertszeit von Methylphenidat ist deutlich höher als die von Ethylphenidat. Der Vergleich der beiden anderen Konditionen zeigt dagegen keine signifikanten Unterschiede.

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben dem Metabolismus von Methylphenidat, die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Methylphenidateinnahme in Kombination mit Ethanol zu untersuchen. Dazu wurden in-vitro Inkubationsversuche in humanem Leberhomogenat unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die sich an den Kokain-Inkubationsversuchen von Bailey orientierten (1995a; 1994; 1995b), und darin der enzymatische Prozess des Methylphenidatmetabolismus ohne und zusammen mit Ethanol beobachtet, sowie die Konzentrationen von Methylphenidat und Ethanol für eine Enzymsättigung bestimmt. Eine Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz, die 9 gesunde männliche Probanden einschloss, die Methylphenidat in Kombination mit Alkohol einnahmen, wurde zur näheren Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat in Serumproben, unter besonderer Berücksichtigung der Reihenfolge der Einnahme beider Prüfsubstanzen durchgeführt. Da Methylphenidat eine ähnliche chemische Struktur und einen ähnlichen zentralnervösen Angriffspunkt wie Kokain besitzt (Sonders et al. 1997; Jatlow et al. 1991; Volkow et al. 1995; Schweri et al. 1985), sollten die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchung von Methylphenidat mit pharmakokinetischen Studien über Kokain, vor allem in kombinierter Einnahme mit Ethanol, verglichen werden. Denn bei der Kombination des Konsums von Kokain und Ethanol konnte die Bildung von Kokaethylen, dem Ethylester von Kokain, festgestellt werden (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998; Bourland et al. 1998; Farré et al. 1993), wobei sich pharmakokinetische und pharmakodynamische Änderungen für Kokain und dessen Metabolite zeigten, veränderte sich die Reihenfolge der Einnahme beider Prüfsubstanzen (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; Farré et al. 1993).

4.1 Inkubation in humanem Leberhomogenat

Methylphenidat und Ethanol wurden in humanem Leberhomogenat bei 37°C unter leichtem Schütteln unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Dieser Versuchsaufbau orientierte sich an den Versuchen von Bailey (1995a; 1994; 1995b), der in-vitro

Inkubationsversuche von Kokain zusammen mit verschiedenen Alkoholen durchführte, um die dabei gebildeten Kokainmetabolite zu untersuchen. Auch die Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Leberhomogenat führte neben der Bildung des regulären Abbauprodukts Ritalinsäure, das auch bei alleiniger Inkubation von Methylphenidat ohne Ethanol entsteht, zur Bildung des Ethylesters Ethylphenidat. Die Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure nahm bei Inkubation zusammen mit Ethanol im Vergleich zur Inkubation ohne Ethanol um 69 % signifikant ($p < 0,01$) ab, bei gleichzeitigem Nachweis der Ethylphenidatbildung. Der Metabolismus von Methylphenidat zu Ritalinsäure wurde also durch Ethanol bzw. durch Bildung von Ethylphenidat gehemmt. Die Abhängigkeit der Ethylphenidatbildung von Lebergewebe konnte bei Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Ethanol in Puffer (pH-Wert 7,4) bestätigt werden, da dabei keine Bildung von Ethylphenidat nachweisbar war. Dass es sich um einen enzymatischen Prozess handelte, konnte durch Hemmung der enzymatischen Prozesse von Esterasen durch Natriumfluorid (Dean et al. 1991) gezeigt werden. Unter dieser Bedingung wurden die Bildungsgeschwindigkeiten beider Metabolite, Ritalinsäure und Ethylphenidat, signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt. Die Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure verringerte sich im Vergleich zur Inkubation ohne Natriumfluorid um 92 %, die Bildungsgeschwindigkeit von Ethylphenidat sogar um 96 %. Die gleichzeitige Inkubation von Methylphenidat und Ethanol zusammen mit einer äquimolaren Konzentration von Kokain zeigte ebenfalls eine signifikante Hemmung der Bildungsgeschwindigkeiten beider Metabolite, bei gleichzeitigem Nachweis der Kokainmetabolite Benzoylecgonin und Kokaethylen. Die Bildungsgeschwindigkeit der Ritalinsäure wurde im Vergleich zur Inkubation ohne Kokain um 80 % verringert, die für Ethylphenidat um 84 %. Dies ist offensichtlich auf die erwartete Hemmung des Methylphenidatmetabolismus durch das konkurrierende Substrat Kokain zurückzuführen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sowohl der Metabolismus von Kokain als auch der Metabolismus von Methylphenidat über ein und den selben enzymatischen Prozess katalysiert werden (Sun et al. 2004). Dies ist für Kokain die humane Carboxylesterase 1A (Dean et al. 1991; Dean et al. 1995; Boyer, Petersen 1991), die den Metabolismus zu Benzoylecgonin und Kokaethylen katalysiert, im Gegensatz zur humanen Carboxylesterase 2, die am Metabolismus zum Ecgoninmethylester von Kokain beteiligt ist (Laizure et al. 2003). Die hier beobachtete mehr als 50 % Hemmung der Bildungsgeschwindigkeiten von Ritalinsäure und Ethylphenidat durch gleichzeitige Kokaininkubation, sowie das im

Vergleich höhere Verhältnis von Kokain zur Kokaethylenbildung deuten darauf hin, dass Kokain eine höhere Affinität zur humanen Carboxylesterase aufweist als Methylphenidat.

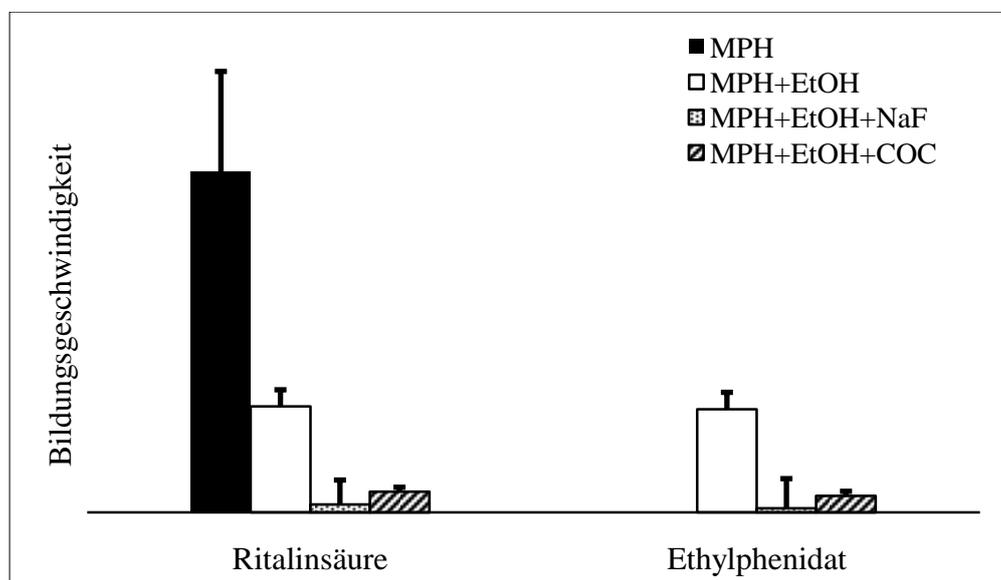


Abbildung 4-1: Leberinkubationsversuche zur Charakterisierung der Eigenschaften des Metabolismus von Methylphenidat in Kombination mit Ethanol. (MPH: Methylphenidat, RA: Ritalinsäure, EPH: Ethylphenidat, NaF: gesättigte Natriumfluoridlösung, COC: Kokain)

Die Sättigung des am Methylphenidatmetabolismus beteiligten Enzyms durch das Substrat selbst, sowie durch Ethanol wurde ebenfalls in Inkubationsversuchen untersucht. Bei Erhöhung der Ethanolkonzentration nahm bei vermehrter Ethylphenidatbildung gegenläufig die Bildungsgeschwindigkeit der Ritalinsäure ab. Die Bildung von Ritalinsäure wurde demnach durch Ethanol bzw. durch die Bildung von Ethylphenidat gehemmt, wobei diese eine Abhängigkeit zur Ethanoldosis aufwies. Die Sättigung des Enzyms für Ethanol zeigte sich erst ab einer Konzentration von 5,3 g/l, für Methylphenidat ab einer Konzentration von 0,7 mg/l, was 700 ng/ml entspricht. Vergleicht man diesen Sättigungsbereich mit dem therapeutische Bereich von Methylphenidat, der für eine Dosis von 7,5 mg bzw. 12,5 mg, zwischen 0,15 und 0,30 mg/kg Körpergewicht (Wargin et al. 1983; Kimko et al. 1999) liegt (entspricht 3,5 bis 7,8 ng/ml), so kann die Enzymsättigung nur unter besonderen Umständen, wie der Anflutungsphase nach Medikamenteneinnahme, erreicht werden. Geht man von einer

therapeutischen Dosis von 20 mg Methylphenidat mit einer konstanten Resorption innerhalb 1 h aus, so berechnet sich für die Anflutungsphase unter Annahme einer Leberdurchblutung von 1,2 l/Min eine Konzentration von 2 mg pro 3 Min. bzw. 2 mg pro 3,6 l. Dies ergibt einen ungefähren Wert von 0,5 mg/l in der Anflutungsphase, was an den gemessenen Sättigungsbereich für Methylphenidat von 0,7 mg/l durchaus heranreicht. Die Sättigung ist allerdings nur in der ersten Anflutungsphase im first-pass Effekt zu erwarten. Ähnliches lässt sich für Ethanolkonzentration bestimmen. Konsumiert man 1 l Wein (12 Vol%), so nimmt man 96 g Alkohol auf. Wird dieser Alkohol etwa über 30 Minuten konstant aufgenommen, ergibt sich eine Konzentration von etwa 3,6 g Alkohol pro Minute. Dies würde bei einer Durchblutung der Leber von 1,2 l/Min etwa 3,6 g Alkohol pro 1,2 l, also 2,9 g/l entsprechen. Man kann davon ausgehen, dass die Aufnahme des Alkohols im Organismus nicht konstant verläuft und die Werte in der Anflutung somit initial höher liegen, als hier berechnet. Es ist also nicht auszuschließen, dass während der Anflutungsphase, nach Aufnahme von Ethanol bzw. Methylphenidat, Konzentrationen dieser Höhe für beide Substanzen vorliegen könnten, um eine Enzymsättigung hervorzurufen, bevor die Elimination beider Substanzen einsetzt.

4.2 Inkubation in humanem Serum

Zur Bestimmung der Serumstabilität von Methylphenidat und dessen Metaboliten Ethylphenidat und Ritalinsäure, wurden Methylphenidat und Ethanol bei 37°C analog zu den Lebersversuchen in Serum (pH-Wert 8) inkubiert. Die Versuchsbedingungen der Leberinkubationen, wie Temperatur (37°C) und Durchmischung, sowie die Konzentrationen der Inkubationslösungen wurden dazu übernommen (siehe 2.2.2). Da Kokain über Butyrylcholinesterasen im Serum abgebaut wird (Mattes et al. 1996), sollte überprüft werden, ob dies auch für Methylphenidat zutrifft. Es zeigte sich bei Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Serum eine Abnahme der Methylphenidatkonzentration bei gleichzeitiger Bildung von Ritalinsäure und Ethylphenidat. Im Vergleich zur Leberinkubation über 4 Stunden wurden aber bei der Inkubation in Serum für die Bildung der beiden Metabolite Ritalinsäure und Ethylphenidat nur Geschwindigkeiten von < 0,01 % erreicht. Da der pH-Wert mit pH 8 in einem leicht alkalischen Bereich lag, wird bei der Bildung der Ritalinsäure von einer alkalischen Hydrolyse ausgegangen, wie sie auch Wargin et al. (1983) bei

Untersuchung der Stabilität von Methylphenidat in Serum bzw. Puffer feststellten. Die Bildung von Ethylphenidat ist allerdings enzymabhängig, wie in 3.1.5 demonstriert werden konnte. Demnach könnte eine Metabolisierung des Methylphenidats zu Ethylphenidat durch Serumesterasen stattgefunden haben. Deshalb wurde eine weitere Seruminkubation durchgeführt, bei der neben Methylphenidat und Ethanol ebenfalls Natriumfluorid zur Hemmung einer möglichen Esteraseaktivität inkubiert wurde. Dabei konnte die vollständige Hemmung der Bildung von Ethylphenidat für n=3 beobachtet werden. Eine Hemmung der Ritalinsäurebildung wurde dagegen nicht festgestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Bildung von Ritalinsäure im Serum mit der bei Inkubation in Phosphat-Puffer (pH 7,4), wurde in einer weiteren Versuchsbedingung der pH-Wert des Serums auf 7,4 eingestellt. Es zeigte sich dabei eine deutlich höhere Bildung ($p < 0,05$) von Ritalinsäure im Bereich von 39% im Vergleich zur Phosphat-Puffer-Inkubation. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung der Ritalinsäure ebenfalls enzymatisch katalysiert wird, eine durch Fluorid hemmbare Serumesterase ist dabei jedoch nicht beteiligt.

Für die Aufbewahrung der Serumproben aus der hier durchgeführten Probandenstudie ist die geringe Bildung von Ethylphenidat und Ritalinsäure im Serum bei Körpertemperatur jedoch vernachlässigbar, da die Serumproben bis zur Probenbearbeitung bei -20°C aufbewahrt werden. Durch diese Maßnahme sollte die Bildungsrate der beiden Metabolite zumindest stark verringert, wenn nicht sogar gestoppt werden.

4.3 Probandenstudie nach Arzneimittelgesetz

Die hier durchgeführte Probandenstudie wurde als in-vivo Untersuchung der pharmakokinetischen Eigenschaften der kombinierten Methylphenidateinnahme mit Ethanol nach GCP-Richtlinie (GCP-Verordnung) geplant und durchgeführt. In den von Markowitz et al. (2000) durchgeführten Vorversuchen, wurde die Pharmakokinetik von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat bei Einnahme einer therapeutischen Methylphenidatdosis (20mg) 30 Minuten vor Ethanolkonsum (BAK bis 0,6 g/kg Alkohol) untersucht. Dabei zeigte sich, dass es zu einer sehr geringen Bildung von Ethylphenidat im Bereich zwischen 0,12 bis 0,81 ng/ml kam. Außerdem wurden die Prüfsubstanzen in der Kombination gut vertragen. Darauf baute die hier durchgeführte Probandenstudie auf. Hierbei sollte jedoch besonders die Reihenfolge der Einnahme der

Prüfsubstanzen berücksichtigt werden, da für Kokain und dessen Ethylester Kokaethylen eine Abhängigkeit von der Einnahmereinfolge der Prüfsubstanzen Kokain und Ethanol sowohl für die Pharmakokinetik als auch für die Pharmakodynamik beschrieben werden konnte (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998; Farré et al. 1993). In diesem Zusammenhang erwartete man als Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Methylphenidat und dessen Metaboliten bei kombinierter Aufnahme mit Ethanol bei Einnahme des Alkohols vor der Methylphenidatdosis durch das frühe Vorliegen des Ethanols einen höheren Umsatz zu Ethylphenidat als bei umgekehrter Reihenfolge, ebenso wie die Hemmung der Ritalinsäurebildung bei gleichzeitiger Ethanolaufnahme und einen Anstieg der Serumkonzentration von Methylphenidat bei kombinierter Einnahme mit Ethanol. Die Ausgangskonzentrationen für die Ethanoleinnahme wurden im Vergleich zu Markowitz et al. (2000) erhöht. Neben einer therapeutischen Methylphenidatdosis von ebenfalls 20 mg, wurde Ethanol in Form von Wein bis zu einer BAK von ca. 0,8 g/kg von den 9 gesunden männlichen Probanden unter ärztlicher Aufsicht eingenommen. Die an drei verschiedenen Studientagen untersuchten Konditionen beinhalteten die alleinige Methylphenidateinnahme ohne zusätzliche Ethanolaufnahme (MPH alleine), die Einnahme von Methylphenidat 30 Minuten vor der Ethanolaufnahme (MPH+Ethanol) und die Aufnahme von Ethanol 30 Minuten vor der Methylphenidateinnahme (Ethanol+MPH). Die neu entwickelte analytische Methode für den Nachweis von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat wurde erfolgreich nach den Richtlinien der GTFCh validiert (Peters F. T. et al. 2004), die Konzentrations-Zeit-Kurven durch die validierte Analytik der Serumproben ermittelt. Zur Beschreibung der pharmakokinetischen Eigenschaften der drei Analyte wurden die pharmakokinetische Parameter mittels WinNonLin (Version 5.2) und Microsoft Excel (Office Version 2003, 2007) anhand eines Einkompartimentmodells aus den Konzentrations-Zeit-Kurven berechnet und die drei Konditionen untereinander verglichen. Folgende pharmakokinetischen Parameter wurden dabei berücksichtigt: Für Methylphenidat wurden das Verteilungsvolumen (V_f) als Parameter für die fiktive Größe des Raums, in dem sich Methylphenidat verteilt, in Abhängigkeit von dessen Bioverfügbarkeit und die Clearance (Cl_f), als Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit von Methylphenidat befreit wird, ebenfalls in Abhängigkeit von dessen Bioverfügbarkeit, bestimmt. Für alle drei Analyte wurden die Latenzzeit (t_{lag}), als Zeitraum zwischen Verabreichung der Dosis bis zum Auftreten der ersten quantifizierbaren Serumkonzentration, C_{max} als

maximale Konzentration, die während des Messzeitraums nachgewiesen wird, die dazugehörige Zeit (t_{max}) und die Area under the curve (AUC) als Fläche unter dem Zeitverlauf der Serumkonzentrationen bestimmt. Die Area under the curve diene dabei als Maß für die Substanzmenge im Organismus. Zusätzlich wurde die ins Unendliche extrapolierte Area under the Curve (AUC_{inf}) als Maß für die komplette, über den Messzeitraum hinausgehende Fläche unter der Serumkonzentration und die Mean residence time (MRT) als mittlere Verweildauer der Substanzen im Serum als reziproker Wert der Eliminationshalbwertszeit berechnet. Außerdem wurden die Halbwertszeiten der Absorption (K_{01}) und der Elimination (K_{10}) zum Vergleich der verschiedenen Bedingungen herangezogen.

4.3.1 Auswertung der Safety-Parameter und BAK

Als Safety-Parameter diene die Überwachung des von den 9 Studienprobanden subjektiv wahrgenommenen Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrums, sowie die während des Messzeitraums der 3 Studienbedingungen gemessenen Vitalparameter Blutdruck und Puls.

Der Ablauf der Studientage der Probandenstudie gestaltete sich unkompliziert. Nach Legen der Venenverweilkanülen und Einnahme des standardisierten Frühstücks, wurde die Studienmedikation ausgeteilt. An den beiden ethanolabhängigen Studientagbedingungen wurde der Alkohol in Form von Wein bis zu einer BAK von ca. 0,8 g/kg unter ärztlicher Kontrolle eingenommen.

Im Verlauf der einzelnen Studientage klagten 7 der 9 rekrutierten Probanden über Kopfschmerzen, 3 von 9 Probanden über Appetitlosigkeit und Schlaflosigkeit. Diese Nebenwirkungen, auf die in der Fachinformation von Methylphenidat bereits hingewiesen wurde (UCB 2006), konnten als erwartete Nebenwirkungen sowohl in den Case Report Forms als auch im Studienabschlussbericht dokumentiert werden. Diese Nebenwirkungen hielten nicht über den jeweiligen Studientag hinaus an, waren noch am selben Studientag rückläufig und beeinträchtigten die Probanden nur mäßig. Schwerwiegende Nebenwirkungen traten nicht auf, das Medikament wurde ansonsten auch in Kombination mit Ethanol gut vertragen.

Die Auswertung der Vitalparameter Blutdruck und Puls zeigte keine gravierenden Veränderungen nach Einnahme der Prüfsubstanzen. Maximalwerte der Blutdruckmessung lagen im Mittelwert bei 150/90 mmHg und waren bei wiederholter

Blutdruckmessung nicht reproduzierbar. Eine geringe hypertensive Wirkung von Methylphenidat, wie sie in dessen Fachinformation beschrieben wird (UCB 2006), wurde somit bestätigt.

Die 9 Probanden erreichten maximale Blutalkoholkonzentrationen (BAK) zwischen 0,40 – 0,77 ‰ (Median 0,64 ‰) 1-3 Stunden (Median 2,5 h) nach Trinkbeginn bei der Bedingung MPH+Ethanol und 0,46 – 1,11 ‰ (Median 0,63 ‰) 0,5 – 1,5 h (Median 1,0 h) nach Trinkbeginn bei Ethanol+MPH. Bei Methylphenidateinnahme, also 30 Minuten nach Trinkbeginn, bestand bei den Probanden bei dieser Bedingung bereits eine BAK von 0,33 – 1,00 ‰ (Median 0,52 ‰). Die angestrebte Blutalkoholkonzentration von 0,8 ‰ wurde also bei beiden Bedingungen im Mittel nicht erreicht.

4.3.2 Vergleich der pharmakokinetischen Parameter

Bei Auswertung der Konzentrations-Zeit-Kurven der Probanden zeigte sich eine große Heterogenität der pharmakokinetischen Daten, die sich zum größten Teil durch Unterschiede der Blutalkoholkonzentrationen der einzelnen Probanden an den beiden Studientagen mit Ethanoleinnahme, aber auch durch interindividuelle Unterschiede im Methylphenidatmetabolismus erklären lassen. FM 04-07, ST 07-07 und DD 13-07 zeigten dabei besonders Unterschiede in der Blutalkoholkonzentration an den beiden Studientagen mit Ethanolaufnahme, die sich in einem Bereich zwischen 0,15 und 0,42 ‰ Unterschied zwischen beiden Konditionen bewegte. Bei FM 04-07 und ST 07-07 konnte zusätzlich eine deutliche Verzögerung von t_{max} der Blutalkoholkonzentration, im Mittel 2 h Unterschied zwischen beiden Bedingungen, festgestellt werden, was im Vergleich zu den restlichen Probanden eine Verzögerung von t_{max} um im Mittel 1 h bedeutete. Bei AM 10-07, DD 13-07, CS 14-07 und SN 18-07 konnte die deutliche Verzögerung von t_{max} der maximalen Methylphenidatkonzentration um im Mittel 2 h Unterschied, sowie die Verringerung der maximalen Methylphenidatkonzentration bei alleiniger Methylphenidateinnahme im Vergleich zur kombinierten Einnahme mit Ethanol unabhängig von der Reihenfolge festgestellt werden. Die Konzentrations-Zeit-Kurven für Methylphenidat waren dabei deutlich abgeflacht und verliefen ohne steilen Anstieg im Vergleich zu den Bedingungen mit kombinierter Ethanolaufnahme.

Auf Grund der großen Heterogenität der Daten wurde bei deren Vergleich nicht von einer Normalverteilung ausgegangen. Stattdessen wurden die Ergebnisse der

pharmakokinetischen Auswertung der Konditionen durch nicht-parametrische Tests wie dem Mann-Whitney-Test verglichen.

4.3.2.1 Pharmakokinetik von TH 01-07

Nach Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurven aller Probanden stellte TH 01-07 offensichtlich einen Sonderfall im Probandenkollektiv dar. Bei ihm wurde im Vergleich zu den restlichen 8 Probanden zu allen drei Konditionen eine erhöhte Methylphenidatkonzentration bei erniedrigter Ritalinsäurekonzentration festgestellt. Maximal wurden Methylphenidatkonzentration zu den drei Konditionen von $> 25 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen, im Vergleich dazu erreichten die restlichen Probanden nur Konzentrationen $< 10 \mu\text{g/l}$. Die maximalen Ritalinsäurekonzentrationen lagen unter $90 \mu\text{g/l}$, bei Konzentrationen, die bei den restlichen Probanden im Vergleich dazu deutlich über $240 \mu\text{g/l}$ lagen. Außerdem war die in den unendlichen Bereich extrapolierten Mean residence time im Vergleich zu den anderen Probanden für Methylphenidat erhöht. Für die Pharmakokinetik von Ethylphenidat fanden sich interessanterweise bei Ethanolaufnahme vor Methylphenidateinnahme eine mit den Ergebnissen der anderen Probanden vergleichbare Ethylphenidatkonzentration bei erhöhter Area under the curve und Mean residence time. Latenzzeit und Halbwertszeit der Elimination waren für Ethylphenidat zu dieser Bedingung erhöht. Bei Einnahme von Methylphenidat vor Ethanol fand sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der restlichen Probanden, die die maximale Konzentration von Ethylphenidat bei der umgekehrten Reihenfolge erreichten, eine erhöhte maximale Ethylphenidatkonzentration, die mit einem Wert von $> 3 \mu\text{g/l}$ bei erhöhter Area under the curve und hoher extrapolierten Area under the curve die höchste Ethylphenidatkonzentration des Probandenkollektivs während des gesamten Studienverlaufs widerspiegelte. Die Einnahme einer zusätzlichen Medikation lag ausschließlich bei der ersten Studienbedingung vor, so dass dieser Bias in der Auswertung aller drei Bedingungen ausgeschlossen werden konnte. Alle diese im Vergleich zu den pharmakokinetischen Daten der restlichen 8 Probanden außergewöhnlichen Parameter deuteten darauf hin, dass bei diesem Probanden der Metabolismus von Methylphenidat durch einen Enzymdefekt verringert war und dadurch zu einem verzögerten Abbau zu Ritalinsäure führte, was die hohen Methylphenidatkonzentrationen und die verminderten Ritalinsäurekonzentrationen erklären würde. In Anlehnung zum verminderten Metabolismus über das Cytochrom 2D9 könnte man diesen Probanden als einen „poor metabolizer“ in Bezug auf die

Funktion der humanen Carboxylesterase Isoform 1A, die den Methylphenidatmetabolismus katalysiert, bezeichnen. Die Tatsache, dass bei kombinierter Einnahme von Ethanol Ethylphenidat in vergleichbarer bis hoher Konzentration gebildet wurde, zeigte, dass nur der Metabolismus zu Ritalinsäure verlangsamt ablief, während die Bildung von Ethylphenidat nicht beeinträchtigt war. Dies war scheinbar bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme besonders ausgeprägt. Auch in der Studie von Patrick et al. (2007) wurde auf einen „poor metabolizer“ aufmerksam gemacht. Dieser Proband wurde dadurch auffällig, dass Methylphenidat in besonders hohen Konzentrationen in der l-Enantiomerform nachgewiesen wurde, während es bei Alkoholaufnahme zu keiner Ethylphenidatbildung kam. Demnach könnte man annehmen, dass der Enzymdefekt dieses Probanden stärker ausgeprägt war als bei TH 01-07, bei dem der Metabolismus zu Ritalinsäure und Ethylphenidat weiterhin bestand. In welcher Enantiomerform das Methylphenidat bei TH 01-07 vorlag, wurde nicht bestimmt. Für die therapeutische Bedeutung der erhöhten Methylphenidatkonzentration wäre der Nachweis der Enantiomerform jedoch ausschlaggebend. Läge bei dieser erhöhte Methylphenidatkonzentration hauptsächlich die l-Enantiomerform vor, die nachweislich antagonistisch auf den therapeutischen Effekt von d-Methylphenidat (Quinn et al. 2004) wirkt, müsste man den Proband als einen non-responder in Bezug auf die Therapie des ADHS klassifizieren, da mit einer abgeschwächten Wirkung des Methylphenidats zu rechnen wäre. Der von Patrick et al. (2007) beobachtete „poor metabolizer“ würde demnach zu dieser Gruppe gehören, da bei ihm ein sehr hoher Anteil l-Methylphenidat nachgewiesen wurde. Wäre jedoch hauptsächlich die aktive d-Methylphenidatform nachweisbar, hätte dies die gegenteilige therapeutische Bedeutung als Folge. Denn bei Vorliegen dieser aktiven Enantiomerform, müsste man zum Erreichen der therapeutischen Dosis von Methylphenidat die Dosis dieses Probanden in Bezug auf die ADHS-Therapie herunter regulieren. Die Tatsache, dass bei zwei unterschiedlichen Studien jeweils ein Proband aus einem frei zusammengestellten Probandenkollektiv gesunder Probanden durch ein abweichendes Datenprofil in Bezug auf die Methylphenidat-Pharmakokinetik auffällig wurde, zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für Defekte im Methylphenidatmetabolismus sehr hoch ist. Dies könnte ein Hinweis auf die Ursache der festgestellten Rate an ‚non-responder‘ in der Methylphenidat-Therapie sein, die bei Kindern bei etwa 30% liegt (Swanson, Volkow 2003). Dadurch wird aber auch die Dosierung des Methylphenidats

in der Therapie des ADHS für das Erreichen des exakten therapeutischen Bereichs schwierig.

Zur Vergleichbarkeit der Daten aller Probanden wurden die pharmakokinetischen Daten von TH 01-07 in der Auswertung der Pharmakokinetik nicht berücksichtigt und gesondert aufgeführt.

4.3.2.2 Pharmakokinetik von Methylphenidat

Zwischen den drei Konditionen konnten in der hier durchgeführten Studie keine signifikanten Unterschiede der pharmakokinetischen Parameter für Methylphenidat festgestellt werden. Die Mittelwerte der maximalen Konzentration lagen für die alleinige Methylphenidateinnahme (MPH alleine) bei 9,8 ng/ml, für Ethanol+MPH bei 8 ng/ml und bei der umgekehrten Reihenfolge bei 7,9 ng/ml. T_{max} wurde für MPH alleine und Ethanol+MPH bei 2 h, für MPH+Ethanol bei 1,5 h bestimmt. Die Halbwertszeit der Elimination lag für MPH alleine bei 3,9 h, bei 2,2 h für Ethanol+MPH und bei 2,6 h für MPH+Ethanol, die Clearance lag zu den drei Bedingungen bei 508 l/h für MPH alleine, 535 l/h für Ethanol+MPH, sowie bei 562 l/h für MPH+Ethanol. Dies entspricht den für Methylphenidat gemessenen pharmakokinetischen Werten aus anderen Studien (Wargin et al. 1983; Kimko et al. 1999; González et al. 2002; Patrick et al. 1987; Shaywitz et al. 1982; Wolraich, Doffing 2004). Die Pharmakokinetik von Methylphenidat im menschlichen Organismus zeigte darin bei einer therapeutischen Dosis von 0,15 (7,5 mg Dosis) bis 0,3 mg/kg (12,5 mg Dosis) Körpergewicht eine maximale Konzentration von Methylphenidat im Bereich von $3,5 \pm 0,4$ ng/ml bis $7,8 \pm 0,8$ ng/ml bei Erwachsenen. T_{max} lag in einem Bereich zwischen $2,1 \pm 0,3$ bis $2,2 \pm 0,4$ h, bei einer Halbwertszeit der Elimination von 2,05 bis 2,14 h und einer Clearance von $10,5 \pm 1,7$ l/h/kg (z.B. bei 70 kg Körpergewicht bei 735 ± 119 l/h) (Wargin et al. 1983).

Die Wirkstoffkonzentrationen von Methylphenidat änderten sich unter den drei Bedingungen nicht. T_{max} nahm bei kombinierter Ethanolaufnahme tendenziell ab. Bei einer langen Halbwertszeit der Elimination für MPH alleine, zeigte diese bei kombinierter Ethanolaufnahme ein tendenzielles Absinken, bewegte sich aber immer noch im Normalbereich, ebenso wie die Clearance. In 6 der 8 Fälle ließ sich ein Anstieg der Methylphenidatkonzentration bei kombinierter Ethanolaufnahme unabhängig von der Reihenfolge feststellen, die aber keine Signifikanz zeigte (siehe 3.3.4).

Markowitz et al. (2000) untersuchten die Pharmakokinetik von Methylphenidat, Ritalinsäure und Ethylphenidat bei Methylphenidateinnahme vor Ethanolaufnahme. Dabei zeigte sich für Methylphenidat eine auffällige Verlängerung der Halbwertszeit auf 3,6 h. Dies ließ sich in der hier durchgeführten Probandenstudie nicht bestätigen. Die Halbwertszeit von Methylphenidat lag mit 2,2 h im Normalbereich. Patrick et al. (2007) führten ebenfalls eine Studie durch, die den Einfluss der Einnahmehinfolge beider Prüfsubstanzen Ethanol (0,6 g/kg) und Methylphenidat (12,5 mg Dosis) auf männliche und weibliche Probanden untersuchte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine signifikante Erhöhung der maximalen Serumkonzentration von d-Methylphenidat (21,5 ng/ml bzw. 21,4 ng/ml vs. 15,3 ng/ml bei Einnahme ohne Ethanol) und die Erhöhung der AUC (105,2 ng h/ml bzw. 102,9 ng h/ml vs. 82,9 ng h/ml) für Methylphenidat mit Alkoholaufnahme (Patrick et al. 2007), so wie es auch von der Pharmakokinetik von Kokain bei kombinierter Einnahme mit Ethanol bekannt ist (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998; Farré et al. 1993). L-Methylphenidat wurde dabei ebenfalls nachgewiesen. Bei alleiniger Methylphenidateinnahme erreicht es etwa 1% der d-Methylphenidatkonzentration, bei Einnahme in Kombination mit Ethanol konnte eine Steigerung auf etwa 3% gezeigt werden. Die Erhöhung der Methylphenidatkonzentration bei Ethanolaufnahme führten Patrick et al. (2007) auf eine Hemmung durch Ethanol bzw. auf die Metabolismusumstellung in Richtung Ethylphenidatbildung zurück. Dadurch würde Methylphenidat langsamer metabolisiert und sei deshalb in einer erhöhten Wirkstoffkonzentration über den Studientagverlauf nachweisbar. Dies hätte zur Folge, dass sich die Wirkung von Methylphenidat im zentralen Nervensystem verstärkt, da die aktive para-Hydroxyform vermehrt gebildet werden könnte (Wargin et al. 1983). was außerdem eine Erklärung für die erhöhte Substanzmissbrauch-Gefahr bei Methylphenidateinnahme (Volkow, Insel 2003) ist. Diese Beobachtung bestätigte sich in der hier durchgeführten Probandenstudie für Methylphenidat nicht.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus klinischen Studien, die die pharmakokinetischen Eigenschaften von Kokain in kombinierter Aufnahme mit Ethanol untersuchten, so findet man Ähnlichkeiten. Vor allem die Erhöhung der Wirkstoffkonzentration von Kokain als auch tendenziell von Methylphenidat bei zusätzlicher Ethanolaufnahme im Vergleich zur alleinigen Methylphenidat- bzw. Kokainaufnahme unabhängig von der Einnahmehinfolge der Prüfsubstanzen, ist bei beiden Substanzen ähnlich (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-

Katz et al. 1998; Farré et al. 1993). Diese war für Kokain signifikant nachweisbar (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998; Farré et al. 1993). Es zeigte sich eine Erhöhung von $225 \pm 80,7$ ng/ml (AUC $38.353,8 \pm 16.190$ h*ng/ml) bei alleiniger Kokainaufnahme auf $343,8 \pm 935$ ng/ml (AUC $54.037 \pm 19.152,8$ h*ng/ml) bei Aufnahme von Kokain in Kombination mit Ethanol (Farré et al. 1993). Für Kokain zeigte sich außerdem eine signifikante Reduktion der Clearance ($1,424$ vs. 2196 ng/ml/min) und des Verteilungsvolumens ($153 \pm 45,2$ vs. $238 \pm 81,9$ l) (Farré et al. 1993). im Vergleich der alleinigen Kokaineinnahme zur Kokaineinnahme zusammen mit Ethanol, was sich für Methylphenidat nicht feststellen ließ.

4.3.2.3 Pharmakokinetik von Ritalinsäure

Die maximale Konzentration (C_{max}) des Analyten Ritalinsäure zu den untersuchten Bedingungen lag im Mittel im Bereich zwischen $243,2$ ng/ml für die Kondition Ethanol+MPH bis $308,8$ ng/ml für MPH alleine, t_{max} lag im Bereich zwischen $1,8$ h bei MPH+Ethanol und $2,6$ h bei der umgekehrten Reihenfolge. Bei alleiniger Methylphenidateinnahme fand sich ein mittleres t_{max} von $2,1$ h. Die Halbwertszeit der Elimination ließ sich bei dieser Kondition bei im Mittel $2,6$ h, bei Ethanol+MPH bei $2,5$ h und bei der umgekehrten Reihenfolge bei $3,2$ h feststellen. Die pharmakokinetischen Angaben anderer Studien (Wargin et al. 1983; Kimko et al. 1999; González et al. 2002; Patrick et al. 1987; Shaywitz et al. 1982; Wolraich, Doffing 2004) zeigen im therapeutischen Dosisbereich von Methylphenidat bei $7,5$ bis $12,5$ mg für Ritalinsäure eine maximale Konzentration zwischen $182,6 \pm 24,9$ ng/ml (Dosis $0,15$ mg/kg Körpergewicht) und $322,5 \pm 32,9$ ng/ml (Dosis $0,3$ mg/kg Körpergewicht), sowie ein t_{max} im Bereich von $2,2 \pm 0,3$ h und eine Halbwertszeit der Elimination im Bereich von $2,79$ bis $4,03$ h, was sich mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Probandenstudie für die untersuchten Konditionen deckt.

Bei Vergleich von MPH allein mit Ethanol+MPH zeigten sich für Ritalinsäure Unterschiede in der maximalen Konzentration. Diese nahm mit $p < 0,05$ signifikant ab, was sich wahrscheinlich auf die Konkurrenz um den Metabolismus zu Ritalinsäure und Ethylphenidat bei kombinierter Ethanolaufnahme zurückführen lässt. Die Hydrolyse von Methylphenidat zu Ritalinsäure würde demnach durch das Vorhandensein von Ethanol bzw. durch die Umstellung des Metabolismus auf die zusätzliche Veresterung zu Ethylphenidat gehemmt und somit verringert. Die Halbwertszeit der Bildung von

Ritalinsäure nahm ebenfalls mit $p = 0,065$ von MPH alleine zu Ethanol+MPH annähernd signifikant zu. Also verzögerte sich die Bildung bei Ethanol+MPH, was die These des hemmenden Effekts von Ethanol auf den Metabolismus von Ritalinsäure unterstützt. Dieser konnte außerdem bereits in den in-vitro Inkubationsversuchen mit humanem Leberhomogenat demonstriert werden. Dort zeigte sich bei Inkubation von Methylphenidat zusammen mit Ethanol im Vergleich zu der alleinigen Inkubation von Methylphenidat ebenfalls eine signifikante Verminderung der Bildungsgeschwindigkeit von Ritalinsäure bei Nachweis der Bildung von Ethylphenidat. (siehe 3.1.7)

Auch bei Vergleich der beiden Studienbedingungen mit Ethanolaufnahme zeigte sich in den pharmakokinetischen Daten der Probanden für Ethanol+MPH eine mit $p < 0,05$ signifikant Verlängerung von t_{max} (2,6 h vs. 1,8 h), was sich wiederum durch den hemmenden Effekt von Ethanol auf die Ritalinsäurebildung erklären lässt, da bei dieser Bedingung bereits bei Einnahme der Methylphenidatdosis eine ausreichend hohe Blutalkoholkonzentration von im Mittel 0,66 ‰ vorlag, um den Metabolismus über die humane Carboxylesterase 1A in Richtung Ethylphenidat umzustellen, wodurch die Bildung von Ritalinsäure verzögert wurde. Diese Hypothese wird außerdem durch die Daten der Halbwertszeit der Ritalinsäurebildung bekräftigt. Diese nahm von MPH+Ethanol zu der umgekehrten Reihenfolge signifikant zu ($p < 0,01$).

Vergleicht man die pharmakokinetischen Daten von Ritalinsäure mit den Daten aus klinischen Studien mit Kokain, zeigt sich in Bezug auf Benzoylcegonin, dem zur Ritalinsäure korrespondierenden Metaboliten von Kokain, ebenfalls eine Verringerung der Plasmakonzentration bei kombinierter Einnahme mit Ethanol im Vergleich zur alleinigen Kokaineinnahme (Farré et al. 1993). Dies zeigte sich entsprechend in AUC und C_{max} . Die maximale Konzentration sank von einem Wert von 778 ± 388 ng/ml bei alleiniger Kokainaufnahme auf 537 ± 154 ng/ml bei kombinierter Einnahme mit Ethanol, während sich die AUC von 239.685 ± 97.405 h* μ g/l bei alleiniger Kokainaufnahme auf 165.293 ± 52.922 h* μ g/l verringerte. Es wurden keine Unterschiede in der Halbwertszeit der Elimination und in t_{max} festgestellt. Demnach lässt sich also in Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der Ritalinsäure bei kombinierter Einnahme von Methylphenidat und Ethanol eine Analogie zur kombinierten Einnahme von Kokain und Ethanol demonstrieren.

4.3.2.4 Pharmakokinetik von Ethylphenidat

Ethylphenidat wurde ausschließlich bei Einnahme von Methylphenidat in Kombination mit Ethanol nachgewiesen. Für Ethylphenidat zeigten sich maximale Konzentrationen von im Mittel 1,44 ng/ml für Ethanol+MPH und 0,68 ng/ml für MPH+Ethanol. T_{max} lag bei 1,2 h für Ethanol+MPH und bei 1,5 h bei der umgekehrten Reihenfolge, die Halbwertszeit der Elimination bei 1,5 h für Ethanol+MPH und bei 1,3 h für MPH+Ethanol. Im Vergleich dazu konnten in der Studie von Markowitz et al. (2000) für die Kondition MPH+Ethanol maximale Ethylphenidatkonzentrationen im Mittel von 0,43 ng/ml bei einem t_{max} von 1,8 h und einer Eliminationshalbwertszeit von 1,5 h nachgewiesen werden. Dies entsprach für diese Kondition den in der hier durchgeführten Probandenstudie gemachten Beobachtungen. Die leicht erhöhten Ethylphenidatkonzentrationen der hier durchgeführten Probandenstudie im Vergleich zu Markowitz et al. (2000) (0,43 ng/ml bei Markowitz vs. 0,68 ng/ml in der Probandenstudie) lassen sich durch die in der Probandenstudie erzielten höheren BAK-Werte von im Mittel 0,66 ‰, bei angepeilten 0,8 ‰ erklären, während von Markowitz et al. nur eine BAK von im Mittel 0,4 g/l erreicht wurde. Dies bekräftigt die These, dass Ethylphenidat ethanoldosisabhängig gebildet wird, was bereits in den Inkubationsversuchen mit humanem Leberhomogenat beobachtet werden konnte. Patrick et al. (2007) zeigten für die Bedingung MPH+Ethanol l-Ethylphenidatkonzentrationen für Männer mit einer maximalen Konzentration von im Mittel 1,01 ng/ml, für Frauen von 0,77 ng/ml. Für die Bedingung Ethanol+MPH konnten C_{max}-Werte im Bereich von 0,89 ng/ml für Männer und für Frauen im Bereich von 0,55 ng/ml nachgewiesen werden. Die Konzentrationen für d-Ethylphenidat erreichten nur selten 10% der l-Ethylphenidatkonzentrationen, wiesen dabei aber ein verlängertes t_{max} von 2-3 h auf. T_{max} für l-Ethylphenidat lag dagegen in einem Bereich von 1-2 h, so wie es in der hier durchgeführten Probandenstudie ebenfalls beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der gemessenen maximalen Ethylphenidatkonzentrationen der Konditionen mit Ethanolaufnahme von Patrick et al. (2007) stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der hier durchgeführten Probandenstudie. Patrick et al. stellten bei der Bedingung MPH+Ethanol eine höhere C_{max} für Ethylphenidat im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge fest, in der hier durchgeführten Studie zeigte sich eine signifikante Erhöhung der C_{max} bei der Bedingung Ethanol+MPH. Diese Beobachtung ließe sich zudem nachvollziehbar durch das frühe Vorliegen des Ethanol vor

Methylphenidateinnahme und der damit verbundenen frühen Metabolismusumstellung zur Ethylphenidatbildung erklären. Auch die Area under the Curve ($2,7 \text{ h} \cdot \mu\text{g/l}$ vs. $1,3 \text{ h} \cdot \mu\text{g/l}$) war bei Ethanol+MPH in der hier durchgeführten Probandenstudie signifikant erhöht, was ebenfalls für die AUC_{inf} mit $p < 0,05$ galt.

In klinischen Studien mit Kokain zeigte sich analog zur Bildung von Ethylphenidat ausschließlich bei kombinierter Einnahme von Ethanol und Methylphenidat, einzig bei kombiniertem Konsum von Ethanol und Kokain die Bildung von Kokaethylen (Perez-Reyes 1994; McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998; Farré et al. 1993). Die Halbwertszeit von Kokaethylen war dabei im Vergleich zu Kokain, dessen Plasmahalbwertszeit $1,3 \text{ h}$ beträgt, mit $1,65 \text{ h}$ leicht verlängert. Dies ließ sich für Methylphenidat/Ethylphenidat nicht feststellen. Die Halbwertszeit der Elimination von Ethylphenidat, die für beide ethanolabhängigen Konditionen bei $1,5 \text{ h}$ lag, war kürzer als die von Methylphenidat bei Vergleich der drei Konditionen ($3,9 \text{ h}$ bzw. $2,2 \text{ h}$ bzw. $2,6 \text{ h}$). Für Kokain gab es außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der AUC von Kokaethylen und der von Kokain und Benzoyllecgonin. Eine Korrelation konnte außerdem zwischen der Halbwertszeit der Elimination von Kokain und Kokaethylen gefunden werden (Farré et al. 1993). Für die Halbwertszeiten der Elimination von Methylphenidat und Ethylphenidat konnte nur bei der Bedingung MPH+Ethanol ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) nachgewiesen werden. Die Eliminationshalbwertszeit von Methylphenidat war bei dieser Bedingung im Vergleich zu der von Ethylphenidat signifikant verlängert.

4.3.3 Pharmadynamik von Ethylphenidat

In den Probandenstudien, die von Patrick et al. (2007) und Markowitz et al. (2000) durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass bei kombinierter Einnahme von Methylphenidat mit Ethanol Ethylphenidat gebildet wird. Dabei wurde hauptsächlich enantioselektiv die l-Form nachgewiesen, während die d-Form nur etwa 10% der l-Ethylphenidatkonzentration erreichte (Patrick et al. 2007). In anderen Studien wurde außerdem gezeigt, dass vor allem die d-Formen von sowohl Methylphenidat als auch Ethylphenidat pharmakologisch aktiv sind (Patrick et al. 2005b). Durch in-vitro Versuche wurde beobachtet, dass d-Ethylphenidat eine höhere Affinität zum Dopamin- und Noradrenalin-Transporter besitzt als Kokain. Die Bindungselektivität für den Dopamin-Transporter ist für d-Ethylphenidat außerdem etwa 10fach höher als für den

Noradrenalin-Transporter. Für die Bindung am Serotonin-Transporter zeigte sich für d-Ethylphenidat jedoch eine geringere Bindungsaffinität als für Kokain (Patrick et al. 2005b). In-vivo konnte dabei für d- und d,l-Ethylphenidat eine dosisabhängige Erhöhung der lokomotorischen Wirkung beobachtet werden. Für das l-Isomer zeigten sich dagegen keine dieser Effekte. Die Motoraktivität über die 90-minütige Testdauer wurde bei gleicher Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht von d-Ethylphenidat weniger stark beeinflusst als die von d-Methylphenidat. Durch Ethylphenidat wurde nur eine etwa 25% Wirkung im Vergleich zu Methylphenidat erreicht. Bei einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht waren die Wirkungen auf die Motoraktivität beider Substanzen vergleichbar, was möglicherweise auf einen Ceiling-Effekt in Bezug auf Methylphenidat hindeutete (Williard et al. 2007). Es ließen sich trotz kürzerer Eliminationshalbwertszeit außerdem verlängert Ethylphenidatkonzentrationen im Gehirn nachweisen. Dies lässt sich wahrscheinlich durch den aktiven Transport von Methylphenidat über das Efflux-Transporter P-Glycoprotein aus dem zentralen Stimulationsgebiet erklären (Zhu et al. 2006).

In den Probandenstudien über die kombinierte Einnahme von Methylphenidat und Ethanol, die durch Markowitz et al. (2000) und Patrick et al. (2007) durchgeführt wurden, konnte von den Probanden keine signifikanten pharmakodynamische Wirkungen der Interaktion beider Prüfsubstanzen und der Bildung von Ethylphenidat festgestellt werden. Die subjektive pharmakodynamische Wirkung wurde dabei über eine visuelle analoge Skala, die neun Fragen beinhaltete, ermittelt. Vor allem die weiblichen Probanden beschrieben eine Verstärkung der Medikamentenwirkung bei kombinierter Einnahme der Prüfsubstanzen.

In der hier durchgeführten Probandenstudie, in der die Pharmakodynamik objektiv nicht ermittelt wurde, wurden bei nachgewiesenen nur unwesentlich höheren Konzentrationen von Ethylphenidat von den Probanden subjektiv vor allem Nebenwirkungen in Bezug auf Methylphenidat festgestellt. Dazu gehörten hauptsächlich Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit, sowie Schlaflosigkeit. Es wurden keine Unterschiede in der Intensität der Wirkung im Vergleich der drei Konditionen beobachtet. Die Wirkung von Methylphenidat veränderte sich also bei den Konditionen mit Ethanoleinnahme im Vergleich zur alleinigen Methylphenidat Einnahme offensichtlich subjektiv nicht.

4.4 Analogie zu Kokain

Methylphenidat weist in seiner chemischen Struktur Ähnlichkeiten zu Kokain auf. Das Molekül besteht ebenfalls aus einem Amin, einem Phenylring und einem Methylester (Froimowitz et al. 1995). Auch der Angriffspunkt beider Substanzen im zentralen Nervensystem am Dopamin- bzw. Noradrenalin-Transporter ist vergleichbar (Sonders et al. 1997; Jatlow et al. 1991; Volkow et al. 1995; Schveri et al. 1985), wobei Kokain außerdem eine hemmende Wirkung auf den Serotonin-Transporter besitzt, die für Methylphenidat nur geringfügig ausgeprägt ist (Volkow et al. 2000). Seit langem wird diskutiert, ob Methylphenidat durch seine chemische und pharmakodynamische Ähnlichkeit zu Kokain, die Therapie der Kokain-Abhängigkeit positiv beeinflussen kann (Castaneda et al. 1999; Khantzian et al. 1984; Sofuoglu, Kosten 2005). Bisher zeigte sich in den durchgeführten Studien allerdings kein positiver Effekt auf die Entzugssymptomatik der Kokainabhängigen.

Sowohl der Metabolismus von Methylphenidat zu Ritalinsäure bzw. bei Ethanolkonsum zu Ethylphenidat als auch der Metabolismus von Kokain zu Benzoyllecgonin und Kokaethylen wird über die humane Carboxylesterase 1 katalysiert (Bourland et al. 1997; Sun et al. 2004; Dean et al. 1991; Laizure et al. 2003). Die maximale Plasmakonzentration von Kokain und dessen Area under the Curve steigen bei kombinierter Einnahme mit Ethanol signifikant an (Farré et al. 1993). Es zeigte sich dabei außerdem eine signifikante Verringerung der Clearance und des Verteilungsvolumens im Vergleich zur alleinigen Kokaineinnahme. Die Bildung des regulären Metaboliten Benzoyllecgonin ist dabei verzögert und verringert. Für Methylphenidat und dessen Metabolite konnten ähnliche pharmakokinetische Verläufe bei kombinierter Einnahme mit Ethanol unter anderem in der hier durchgeführten Studien gezeigt werden. Analog zu Kokain wurde Methylphenidat bei kombinierter Aufnahme mit Ethanol in höheren Konzentrationen nachgewiesen als bei alleiniger Methylphenidateinnahme. Diese Beobachtung war in der hier durchgeführten Probandenstudie weniger ausgeprägt als bei den Studien von Patrick et al. (2007), wo es zu einer signifikanten Änderung der maximalen Konzentration und der Area under the Curve von Methylphenidate kam. Ethanol hatte ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Hydrolyse von Methylphenidat zu seinem primären Metaboliten Ritalinsäure. Die Bildung von Ritalinsäure war besonders bei Ethanol+MPH verzögert und vermindert. Für die Bildung von Ethylphenidat im Vergleich zu Kokaethylen konnten jedoch in

Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften einige Unterschiede nachgewiesen werden. Kokaethylen als Ethylester von Kokain wird nach kombinierter Einnahme von Kokain und Ethanol über die humane Carboxylesterase 1 gebildet (Brzezinski et al. 1994). Dabei wird Kokain dosisabhängig fast 1:1 zu Kokaethylen umgesetzt (McCance-Katz et al. 1993; McCance-Katz et al. 1998). Kokaethylen ist eine pharmakologisch aktive Substanz, deren Effekte auf das zentrale Nervensystem denen von Kokain entsprechen, aber sich in gleicher Dosis eine geringere Wirkung zeigt (Jatlow et al. 1996; Perez-Reyes 1994). Es weist jedoch eine leicht verlängerte Halbwertszeit der Elimination (im Mittel 1,65 h vs. 1,3 h) zu Kokain auf. Kokaethylen beeinflusst ebenso wie Kokain Herzfrequenz und Blutdruck und erhöht damit zusammen mit der durch den hemmenden Effekt von Ethanol auf die Hydrolyse von Kokain erhöhten Kokain-Plasmakonzentration die Sterblichkeitsrate nach Drogenkonsum (Katz et al. 1992; Jatlow et al. 1991; Bailey 1993). Auch die subjektiven Effekte, wie zum Beispiel Euphorie, sind bei kombinierter Einnahme von Kokain und Ethanol unter Bildung von Kokaethylen wesentlich stärker ausgeprägt als bei alleinigem Kokainkonsum, wobei die negativen psychischen Wirkungen von Kokain, wie Paranoia, abgeschwächt werden (McCance-Katz et al. 1998). Für Ethylphenidat, das in der hier durchgeführten Probandenstudie im Gegensatz zu Kokaethylen nur in Spuren (maximale mittlere Konzentration 1,01 ng/ml) nachgewiesen wurde, zeigte sich im Vergleich zu Methylphenidat eine Verkürzung der Eliminationshalbwertszeit (Methylphenidateinnahme ohne Alkohol für Methylphenidat 3,9 h, in Kombination mit Alkohol 2,2/2,6 h für Methylphenidat, für Ethylphenidat 1,5 h). Eine Zunahme der Wirkung von Methylphenidat bei kombinierter Einnahme von Methylphenidat mit Ethanol unter Bildung von Ethylphenidat zeigte sich subjektiv nicht. In der von Patrick et al. (2007) durchgeführten Probandenstudie bemerkten vor allem die Teilnehmerinnen eine Verstärkung der subjektiven Effekte von Methylphenidat. Diese ließen sich allerdings nicht generell von der Alkoholwirkung abgrenzen.

Die mittleren maximalen Konzentrationen (C_{max}) von Methylphenidat lagen zu den drei Konditionen bei 9,84 ng/ml bzw. 7,98 ng/ml bzw. 7,88 ng/ml. Im Vergleich dazu wurde Kokain in klinischen Studien in Plasmakonzentrationen von im Mittel 255 ng/ml bei alleiniger Kokainaufnahme und 343 ng/ml bei kombinierter Aufnahme mit Ethanol nachgewiesen. Dieser Unterschied lässt sich unter anderem auf die geringe Bioverfügbarkeit von Methylphenidat, die nur bei etwa 30 % liegt (Kimko et al. 1999) sowie auf die im Vergleich zu Kokain stark erhöhte Clearance (Kokain 0,037 l/h vs.

Methylphenidat 508 l/h (nur Methylphenidat) bzw. 562 und 535 l/h (mit Ethanol)) und das im Vergleich zu Kokain (ohne Ethanol 238 +/- 82 l, mit Ethanol 153 +/- 45 l Farré et al. 1993) stark erhöhte Verteilungsvolumen von Methylphenidat (ohne Ethanol bei 1677 l, mit Ethanol bei 1842 l bzw. 1567 l) zurückführen. Dadurch ist die Plasmakonzentration von Methylphenidat im Vergleich zu Kokain deutlich verringert (Farré et al. 1993).

4.5 Authentische Fälle in der Toxikologie

Innerhalb der letzten 2 Jahre, in denen diese Arbeit entstand, nahm im Institut für Forensische Toxikologie der Goethe-Universität in Frankfurt am Main deutlich die Häufigkeit der Fälle zu, in denen der Nachweis von Methylphenidat angefordert wurde. Wurde in den Jahren 2004 bis 2006 kein einziger Methylphenidatnachweis beauftragt, so konnten in den Jahren 2007 und 2008 bisher (Stand Juli 2008) bereits 15 Methylphenidatfälle dokumentiert werden. Davon wurde bei 5 Fällen der kombinierte Konsum von Ethanol angegeben. Vor allem ging es dabei um eine nach Alkoholkonsum nachgewiesene Fahruntüchtigkeit, wobei die Methylphenidatmedikation zusätzlich zum Alkohol eingenommen wurde. In einem der Fälle ließ sich dabei neben Methylphenidat und Ritalinsäure Ethylphenidat nachweisen. Ein anderer Fall, indem die betroffene Person, die sich in Therapie bei THC- und Amphetamin-Abhängigkeit befindet, innerhalb einer Woche zum wiederholten Mal missbräuchlich zu hohe Dosen Methylphenidat neben unter anderem Amphetamin konsumierte, demonstriert beispielhaft die Relevanz der erhöhten Substanz- und Drogenmissbrauchsgefahr bei ADHS-Erkrankten unter Methylphenidatdauertherapie (Schubiner et al. 2000). Obwohl in der Fachinformation von Methylphenidat darauf hingewiesen wird, dass die kombinierte Einnahme mit Alkohol kontraindiziert ist, wird nicht ausreichend auf die Auswirkungen der kombinierten Einnahme von Methylphenidat und Alkohol aufmerksam gemacht (UCB 2006). Vor allem Jugendlichen und Erwachsenen, die auf Grund ihrer Erkrankung Methylphenidat als Dauermedikation einnehmen, sollten darüber aufgeklärt werden, dass bei kombiniertem Konsum mit Ethanol Ethylphenidat entsteht. Schließlich weist Ethylphenidat im Vergleich zu Kokain eine stärkere Bindungsaffinität zum Dopamin- und Noradrenalin-Transporter auf. Aber auch auf die hemmenden Einflüsse von Ethanol auf den regulären Methylphenidatmetabolismus sollte deutlich hingewiesen werden. Es finden sich bei kombinierter Aufnahme von

Methylphenidat und Ethanol tendenzielle erhöhte Methylphenidatkonzentrationen im Serum, die zu einer verstärkten Methylphenidatwirkung führen können. Eine weitere Gefahr bei kombinierter Einnahme von Methylphenidat und gleichzeitiger Ethanolaufnahme besteht außerdem in der möglichen Unterschätzung der Alkoholisierung bei Abschwächung der berauschenden Wirkung des Alkohols durch die verstärkte amphetaminähnliche Wirkung des Methylphenidats, wie sie bereits bei Amphetaminkonsum und kombinierter Alkoholaufnahme beobachtet wurde (Perez-Reyes et al. 1992). Da bekannt ist, dass die Erkrankung ADHS, aber auch die Therapie mit Methylphenidat, mit einer erhöhten Gefahr der Drogenabhängigkeit und des Substanzmissbrauchs verbunden ist (Biederman et al. 1995; Schubiner et al. 2000), sollte der pharmakodynamischen Wirkung der kombinierten Einnahme von Methylphenidat und Ethanol und dem dabei gebildeten Ethylphenidat, besonders in seiner aktiven d-Form, weiter nachgegangen werden. Möglicherweise lässt sich Ethylphenidat in synthetischer Form aber auch therapeutisch nutzen, so dass es als pharmakologisch aktive Substanz die Therapie des ADHS positiv beeinflussen kann. Ein weiterer Aspekt, der einer weiteren Abklärung bedarf, ist die Pharmakogenetik in Bezug auf den Methylphenidatmetabolismus. Es ist überraschend, dass in zwei unabhängigen Studien, der hier durchgeführten Probandenstudie und der von Patrick et al. (2007) durchgeführte Studie, jeweils einer der zufällig rekrutierten gesunden Probanden einen außergewöhnlichen Methylphenidatmetabolismus aufweist. Die Ursache dieses hohen Anteils an „poor metabolizer“ bzw. das in 30 % der Fällen nicht Ansprechen auf die Methylphenidattherapie (Greenhill et al. 2002; Swanson, Volkow 2003), sollte in Bezug auf die Funktion der humanen Carboxylesterase 1A, auch im Hinblick auf die Beeinflussung des Metabolismus anderer Substrate dieses Enzyms, zum Beispiel anderer Medikamente wie Lidocain, Heroin oder Pethidin (Redinbo et al. 2003; Bourland et al. 1997), durch anschließende Studien weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Methylphenidat ist ein Dopaminreuptakehemmer, der in seiner chemischen Struktur dem Amphetamin ähnlich ist. Klinisch wird es in der Behandlung des juvenilen Aufmerksamkeitsdefizit-Syndroms (ADHS) eingesetzt. Aber auch eine steigende Anzahl Erwachsener, die am ADHS leiden, profitiert von dessen therapeutischen Wirkungen. Bei gleichzeitiger Einnahme von Methylphenidat und Ethanol wird aus beiden der aktive Metabolit Ethylphenidat gebildet.

Zur Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Methylphenidat bei gleichzeitiger Ethanolaufnahme, wurden Untersuchungen zum in-vitro Metabolismus in humanem Leberhomogenat und ein von der Ethikkommission und der Bundesbehörde genehmigter Probandenversuch nach AMG durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Konditionen mit variiertem Einnahmehintergrund der Prüfsubstanzen bei 9 gesunden männlichen Probanden untersucht, die die alleinige Aufnahme von Methylphenidat (20 mg), die Aufnahme von Methylphenidat (20 mg) 30 Minuten nach Ethanolaufnahme (Wein bis zu einer BAK von ca. 0,8 ‰) und die Einnahme von Methylphenidat (20 mg) 30 Minuten vor Ethanolaufnahme (Wein bis zu einer BAK von ca. 0,8 ‰) beinhalteten. Blutproben wurden über einen Messzeitraum bis zu 7 h entnommen und durch eine neu entwickelte validierte Methode mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Flugzeitmassenspektrometrie (LC-TOF) analysiert.

Die in-vitro Versuche zeigten, dass nur in Gegenwart von Leberenzymen Ethylphenidat gebildet wurde, bei alleiniger Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Puffer konnte die Bildung von Ethylphenidat nicht nachgewiesen werden. In-vitro zeigten die Leberenzyme außerdem für die Ethylphenidatbildung eine Sättigung durch hohe Konzentration von Methylphenidat (Sättigung ab 0,7 mg/l) und Ethanol (Sättigung ab 5,3 g/L), die durchaus in der Anflutungsphase nach Medikamentenaufnahme in der Leber vorliegen können. Der Metabolismus zu Ritalinsäure wurde durch Ethanol deutlich gehemmt. Die enzymatische Reaktion war außerdem signifikant ($p < 0,01$) durch Natriumfluorid hemmbar. Bei zusätzlicher Inkubation mit Kokain (äquimolar zu Methylphenidat), konnte ebenfalls eine signifikante Verringerung der Bildung ($p < 0,01$) von Ethylphenidat und Ritalinsäure gezeigt werden. Dies gab einen Hinweis auf das am Metabolismus beteiligte Enzym, die humane Carboxylesterase 1A, die den

Metabolismus von Kokain katalysiert. Außerdem konnte eine geringfügige Bildung von Ethylphenidat bei Inkubation von Methylphenidat und Ethanol in Serum gezeigt werden, die über eine durch Fluorid hemmbare Esterase katalysiert wurde.

Im Probandenversuch fand sich in Kombination mit Ethanol ebenfalls die Bildung von Ethylphenidat. Die Konzentrationen lagen im Bereich von 0,3-3,2 µg/l. Methylphenidat wurde im Bereich von 4,6-28,6 µg/l und Ritalinsäure in einem Bereich von 187-442 µg/l nachgewiesen, was sich mit Ergebnissen anderer Studien deckt. Aus den quantitativen Daten wurden die pharmakokinetischen Parameter nach Einkompartimentmodell ermittelt. Für Methylphenidat wurden dabei anders als bei Kokain, bei dem sich nach Ethanolaufnahme die Wirkstoffkonzentrationen signifikant erhöhen, keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der 3 untersuchten Konditionen festgestellt, obwohl sich tendenziell höhere Wirkstoffkonzentrationen bei Einnahme zusammen mit Ethanol zeigten. Die Ethanolgabe vor anstatt nach Methylphenidateinnahme verzögerte die Ritalinsäurebildung (t_{max} 2,6 vs. 1,8 h) und im Vergleich zu der Einnahme von Methylphenidat ohne Ethanol lagen die maximalen Werte (C_{max}) signifikant niedriger. Bezüglich Ethylphenidat konnte eine Erhöhung ($p < 0,05$) der C_{max} und der Area under the curve gefunden werden, wenn Alkohol vor Methylphenidat eingenommen wurde. Im Vergleich zu Kokain, das fast 1:1 zu Kokaethylen umgesetzt wird, konnte Ethylphenidat aber nur in Spuren nachgewiesen werden. Ein Proband zeigte neben hohen Methylphenidatkonzentrationen (> 25 ng/ml) niedrige Ritalinsäurekonzentrationen (< 90 ng/ml) bei normaler Ethylphenidatbildung, was auf eine Hemmung des Methylphenidatmetabolismus bezüglich der Hydrolyse zu Ritalinsäure hindeutete. Dieser Proband wurde als „poor metabolizer“ klassifiziert.

Von Kokaethylen ist bekannt, dass es bei verlängerter Halbwertszeit eine ähnlich ausgeprägte Wirkung wie Kokain besitzt. Die Eliminationshalbwertszeit von Ethylphenidat war dagegen deutlich kürzer als die von Methylphenidat (1,5 vs. 2,6 h). Die Pharmakodynamik von Ethylphenidat wurde in der Studie nicht erfasst, aus den subjektiven Berichten der Probanden ergaben sich jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Medikamentenwirkung bei gleichzeitigem Konsum von Ethanol und Methylphenidat im Vergleich zur alleinigen Methylphenidateinnahme.

6 ABSTRACT

The amphetamine-like drug methylphenidate inhibits the reuptake of dopamine and norepinephrine in the central nervous system. It is most commonly used in the therapy of children suffering from the attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) just as well as of a growing number of adults. After co-ingestion of methylphenidate and ethanol their active metabolite ethylphenidate is formed.

Metabolism and pharmacokinetics of methylphenidate, its primary metabolite ritalinic acid and ethylphenidate were studied in-vitro using human liver homogenate and in-vivo in a controlled three-way study following GCP-guidelines including 9 healthy male volunteers. For the three-way study methylphenidate (20 mg) was administered in three different conditions: without and in combination with alcohol (wine) up to 0.8 g/kg body weight 30 minutes before and 30 minutes after methylphenidate consumption. Blood samples were collected up to 7 h, assayed using a new developed validated analytical method via high performance-liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (LC TOF MS).

Only in in-vitro incubation of both, methylphenidate and ethanol in the presence of liver homogenate, ethylphenidate was formed. It was not detected in incubations of methylphenidate without ethanol or incubations of both substances in buffer. The formation of ethylphenidate was saturable by high concentrations of ethanol (beginning at 5.3 g/L) and methylphenidate (beginning at 0.7 mg/L). Such concentrations may be reached during the first pass after absorption. Ethanol inhibited the formation of ritalinic acid ($p < 0.01$) and addition of the esterase inhibitor sodium fluoride decreased both, ethylphenidate and ritalinic acid formation ($p < 0.01$). In the presence of equimolar concentrations of cocaine, the formation rate of ritalinic acid and ethylphenidate decreased significantly ($p < 0.01$). It was concluded that the formation of ethylphenidate and ritalinic acid is catalyzed by a hepatic esterase, probably human carboxylesterase 1A, which is involved in cocaine metabolism. The observation of a more than 50% inhibition of the methylphenidate metabolism indicates that cocaine has a higher affinity to the enzyme. In another assay a minor formation of ethylphenidate was shown after incubation of methylphenidate and ethanol in human serum. This process was inhibited by addition of sodium fluoride ($p < 0.01$) indicating its enzymatic nature.

The controlled three-way study involved variations in the order of the intake of methylphenidate and ethanol. The detection of ethylphenidate after combined application of methylphenidate in a therapeutic dose (20 mg) and a moderate dose of ethanol (up to 0.8 g/kg body weight) confirmed its formation as a minor metabolite of methylphenidate besides ritalinic acid, the primary metabolite. Ethylphenidate was detected in minor concentrations only reaching 0.3 to 3.2 µg/l. Methylphenidate concentrations were in range 4.6 to 28.6 µg/l, ritalinic acid concentrations were 187 to 442 µg/l, which is in accordance with results of other studies. The pharmacokinetic data was according to a one-compartmental model with one segment absorption. In contrast to the findings of cocaine and ethanol co-abuse, the additional ethanol ingestion did not significantly affect the methylphenidate concentrations though a tendency towards higher concentrations was noted. The order of drug administration influenced the metabolism of both, ritalinic acid and ethylphenidate. Ethanol ingestion prior to methylphenidate delayed the formation of ritalinic acid (t_{max} 2.6 h vs. 1.8 h). In comparison to the intake of methylphenidate only, C_{max} of ritalinic acid decreased. C_{max} and AUC of ethylphenidate increased if ethanol was ingested first ($p < 0.05$). In comparison to the formation of cocaethylene, which reaches concentrations comparable to those of cocaine, ethylphenidate was detected in small concentrations only. However, one subject exhibited high concentrations of methylphenidate (> 25 µg/l) as well as low concentrations of ritalinic acid (< 90 µg/l) while ethylphenidate was present in levels comparable to the other subjects. It was supposed that his methylphenidate metabolism was markedly reduced and he was classified as a 'poor metabolizer'.

Cocaethylene shows similar pharmacodynamic effects as cocaine and a prolonged elimination half-life than cocaine. This was not confirmed for methylphenidate/ethylphenidate. The elimination half-life of ethylphenidate was shorter than that of methylphenidate (1.5 h vs. 2.6 h) and the 9 subjects did not report differences in the effects of the combination of methylphenidate and ethanol.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Arnsten AF, Dudley AG (2005) *Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder*. Behavioral and brain functions : BBF 1 (1): 2

Asherson P, IMAGE Consortium (2004) *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era*. European child & adolescent psychiatry 13 Suppl 1: I50-70

Bailey DN (1993) *Serial plasma concentrations of cocaethylene, cocaine, and ethanol in trauma victims*. Journal of analytical toxicology 17 (2): 79–83

Bailey DN (1994) *Studies of cocaethylene (ethylcocaine) formation by human tissues in vitro*. Journal of analytical toxicology 18 (1): 13–15

Bailey DN (1995a) *Cocapropylene (propylcocaine) formation by human liver in vitro*. Journal of analytical toxicology 19 (1): 1–4

Bailey DN (1995b) *Formation of cocaisopropylene (isopropylcocaine) by human liver in vitro*. Journal of analytical toxicology 19 (4): 205–208

Basset-Grundy A, Butler N *Prevalence and adult outcomes of ADHD. Evidence from a 30-year prospective study*. Bedford Group for Lifecourse and Statistical Studies, Institute of Education, University of London, London (2004)

Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC (2006) *Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function*. Biological psychiatry 60 (10): 1111–1120

Biederman J, Spencer TJ (2000) *Genetics of childhood disorders: XIX. ADHD, Part 3: Is ADHD a noradrenergic disorder?* Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 39 (10): 1330–1333

Biederman J, Wilens T, Mick E, Milberger S, Spencer TJ, Faraone SV (1995) *Psychoactive substance use disorders in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of ADHD and psychiatric comorbidity*. The American journal of psychiatry 152 (11): 1652–1658

Biederman J, Heiligenstein JH, Faries DE, Galil N, Dittmann R, Emslie GJ, Kratochvil CJ, Laws HF, Schuh KJ, Atomoxetine ADHD Study Group (2002) *Efficacy of atomoxetine versus placebo in school-age girls with attention-deficit/hyperactivity disorder*. Pediatrics 110 (6): e75

Blank R, Remschmidt H (1994) *Hyperkinetic syndrome: The role of allergy among psychological and neurological factors*. European child & adolescent psychiatry (3): 220–228

Bosron WF, Dean RA, Brzezinski MR, Pindel EV (1997) *Human liver cocaine carboxylesterases*. NIDA research monograph 173: 27–34

Bourland JA, Martin DK, Mayersohn M (1997) *Carboxylesterase-mediated transesterification of meperidine (Demerol) and methylphenidate (Ritalin) in the presence of [2H6]ethanol: preliminary in vitro findings using a rat liver preparation*. Journal of pharmaceutical sciences 86 (12): 1494–1496

Bourland JA, Martin DK, Mayersohn M (1998) *In vitro transesterification of cocaethylene (ethylcocaine) in the presence of ethanol. esterase-mediated ethyl ester exchange esterase-mediated ethyl ester exchange*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 26 (3): 203–206

Boyer CS, Petersen DR (1991) *Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse*. Hepatology 14 (6): 1209–1216

Boyer CS, Petersen DR (1992) *Enzymatic basis for the transesterification of cocaine in the presence of ethanol: evidence for the participation of microsomal carboxylesterases*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 260 (3): 939–946

Brzezinski MR, Abraham TL, Stone CL, Dean RA, Bosron WF (1994) *Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine*. Biochemical pharmacology 48 (9): 1747–1755

Bundesministerium für Gesundheit und Soziale Sicherung (9.8.2004) *Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen*. GCP-Verordnung

Bundesministerium für Justiz (12.12.2005) *Gesetz über den Verkehr von Arzneimitteln*. AMG

Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW (2002) *Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder*.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 27 (5): 699–711

Castaneda R, Sussman N, Levy R, Trujillo M (1999) *A Treatment Algorithm for Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Cocaine-Dependent Adults: A One-Year Private Practice Study with Long-Acting Stimulants, Fluoxetine, and Bupropion*.

Substance abuse : official publication of the Association for Medical Education and Research in Substance Abuse 20 (1): 59–71

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN, Rapoport JL (2002) *Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder*. JAMA 288 (14): 1780–1788

Chan YP, Swanson JM, Soldin SS, Thiessen JJ, Macleod SM, Logan W (1983) *Methylphenidate hydrochloride given with or before breakfast: II. Effects on plasma concentration of methylphenidate and ritalinic acid*. Pediatrics 72 (1): 56–59

Cheon K, Ryu YH, Kim Y, Namkoong K, Kim C, Lee JD (2003) *Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [123I]IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder*. European journal of nuclear medicine and molecular imaging 30 (2): 306–311

Crawford CA, McDougall SA, Meier TL, Collins RL, Watson JB (1998) *Repeated methylphenidate treatment induces behavioral sensitization and decreases protein kinase A and dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in the dorsal striatum*. Psychopharmacology 136 (1): 34–43

- Dean RA, Christian CD, Sample RH, Bosron WF (1991) *Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 5 (12): 2735–2739
- Dean RA, Zhang J, Brzezinski MR, Bosron WF (1995) *Tissue distribution of cocaine methyl esterase and ethyl transferase activities: correlation with carboxylesterase protein*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 275 (2): 965–971
- DeVane CL, Markowitz JS, Carson SW, Boulton DW, Gill HS, Nahas Z, Risch SC (2000) *Single-dose pharmacokinetics of methylphenidate in CYP2D6 extensive and poor metabolizers*. Journal of clinical psychopharmacology 20 (3): 347–349
- Ding Y, Gatley SJ, Thanos PK, Shea C, Garza V, Xu Y, Carter P, King P, Warner D, Taintor NB, Park DJ, Pyatt B, Fowler JS, Volkow ND (2004) *Brain kinetics of methylphenidate (Ritalin) enantiomers after oral administration*. Synapse (New York, N.Y.) 53 (3): 168–175
- Ding Y.S., Fowler J.S., Volkow N.D., Dewey S.L., Wang G.J., Logan J., Gatley S.J., Pappas N. (1997) *Chiral drugs: comparison of the pharmacokinetics of [11C]d-threo and L-threo-methylphenidate in the human and baboon brain*. Psychopharmacology 131 (1): 71–78
- Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ (1999) *Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder*. Lancet 354 (9196): 2132–2133
- Dresel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbäumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K (2000) *Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [99mTc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment*. European journal of nuclear medicine 27 (10): 1518–1524
- Drouin C, Page M, Waterhouse B (2006) *Methylphenidate enhances noradrenergic transmission and suppresses mid- and long-latency sensory responses in the primary somatosensory cortex of awake rats*. Journal of neurophysiology 96 (2): 622–632
- Farré M, de la Torre R, Llorente M, Lamas X, Ugena B, Segura J, Camí J (1993) *Alcohol and cocaine interactions in humans*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 266 (3): 1364–1373
- Froimowitz M, Patrick KS, Cody V (1995) *Conformational analysis of methylphenidate and its structural relationship to other dopamine reuptake blockers such as CFT*. Pharmaceutical research 12 (10): 1430–1434
- Gobert A, Rivet JM, Audinot V, Newman-Tancredi A, Cistarelli L, Millan MJ (1998) *Simultaneous quantification of serotonin, dopamine and noradrenaline levels in single frontal cortex dialysates of freely-moving rats reveals a complex pattern of reciprocal auto- and heteroreceptor-mediated control of release*. Neuroscience 84 (2): 413–429
- González MA, Pentikis HS, Anderl N, Benedict MF, DeCory HH, Dirksen SJ, Hatch SJ (2002) *Methylphenidate bioavailability from two extended-release formulations*. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 40 (4): 175–184
- Greenhill LL, Pliszka S, Dulcan MK, Bernet W, Arnold V, Beitchman J, Benson RS, Bukstein O, Kinlan J, McClellan J, Rue D, Shaw JA, Stock S, American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (2002) *Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults*. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 41 2 Suppl: 26S–49S

- Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM (1995) *Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex*. Journal of neurochemistry 65 (1): 111–116
- Gualtieri CT, Wargin W, Kanoy R, Patrick K, Shen CD, Youngblood W, Mueller RA, Breese GR (1982) *Clinical studies of methylphenidate serum levels in children and adults*. Journal of the American Academy of Child Psychiatry 21 (1): 19–26
- Han DD, Gu HH (2006) *Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs*. BMC pharmacology 6: 6
- Hitri A, Hurd YL, Wyatt RJ, Deutsch SI (1994) *Molecular, functional and biochemical characteristics of the dopamine transporter: regional differences and clinical relevance*. Clinical neuropharmacology 17 (1): 1–22
- Hungund BL, Perel JM, Hurwic MJ, Sverd J, Winsberg BG (1979) *Pharmacokinetics of methylphenidate in hyperkinetic children*. British journal of clinical pharmacology 8 (6): 571–576
- Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry CW, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH (1991) *Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion*. Life sciences 48 (18): 1787–1794
- Jatlow P, McCance EF, Bradberry CW, Elsworth JD, Taylor JR, Roth RH (1996) *Alcohol plus cocaine: the whole is more than the sum of its parts*. Therapeutic drug monitoring 18 (4): 460–464
- Katz JL, Terry P, Witkin JM (1992) *Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaehtylene)*. Life sciences 50 (18): 1351–1361
- Khantzian EJ, Gawin F, Kleber HD, Riordan CE (1984) *Methylphenidate (Ritalin) treatment of cocaine dependence--a preliminary report*. Journal of substance abuse treatment 1 (2): 107–112
- Kimko HC, Cross JT, Abernethy DR (1999) *Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate*. Clinical pharmacokinetics 37 (6): 457–470
- Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K (2000) *Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography*. Neuroscience letters 285 (2): 107–110
- Laizure SC, Mandrell T, Gades NM, Parker RB (2003) *Cocaehtylene metabolism and interaction with cocaine and ethanol: role of carboxylesterases*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 31 (1): 16–20
- Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I (1997) *Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study*. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 36 (6): 737–744
- Markowitz JS, DeVane CL, Boulton DW, Nahas Z, Risch SC, Diamond F, Patrick KS (2000) *Ethylphenidate formation in human subjects after the administration of a single dose of methylphenidate and ethanol*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 28 (6): 620–624

- Markowitz JS, Logan BK, Diamond F, Patrick KS (1999) *Detection of the novel metabolite ethylphenidate after methylphenidate overdose with alcohol coingestion*. Journal of clinical psychopharmacology 19 (4): 362–366
- Markowitz JS, Patrick KS (2001) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder*. Clinical pharmacokinetics 40 (10): 753–772
- Markowitz JS, Patrick KS (2008) *Differential pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylphenidate enantiomers: does chirality matter?* Journal of clinical psychopharmacology 28 3 Suppl 2: S54-61
- Markowitz JS, Straughn AB, Patrick KS, DeVane CL, Pestreich L, Lee J, Wang Y, Muniz R (2003) *Pharmacokinetics of methylphenidate after oral administration of two modified-release formulations in healthy adults*. Clinical pharmacokinetics 42 (4): 393–401
- Mattes C, Bradley R, Slaughter E, Browne S (1996) *Cocaine and butyrylcholinesterase (BChE): determination of enzymatic parameters*. Life sciences 58 (13): PL257-61
- McCance-Katz EF, Kosten TR, Jatlow P (1998) *Concurrent use of cocaine and alcohol is more potent and potentially more toxic than use of either alone--a multiple-dose study*. Biological psychiatry 44 (4): 250–259
- McCance-Katz EF, Price LH, McDougle CJ, Kosten TR, Black JE, Jatlow PI (1993) *Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene*. Psychopharmacology 111 (1): 39–46
- Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Chen L, Jones J (1997) *ADHD is associated with early initiation of cigarette smoking in children and adolescents*. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 36 (1): 37–44
- Modi NB, Wang B, Noveck RJ, Gupta SK (2000) *Dose-proportional and stereospecific pharmacokinetics of methylphenidate delivered using an osmotic, controlled-release oral delivery system*. Journal of clinical pharmacology 40 (10): 1141–1149
- Moll GH, Heinrich H, Trott G, Wirth S, Rothenberger A (2000) *Deficient intracortical inhibition in drug-naive children with attention-deficit hyperactivity disorder is enhanced by methylphenidate*. Neuroscience letters 284 1-2: 121–125
- Okie S (2006) *ADHD in adults*. The New England journal of medicine 354 (25): 2637–2641
- Patrick KS, Caldwell RW, Ferris RM, Breese GR (1987) *Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 241 (1): 152–158
- Patrick KS, Straughn AB, Minhinnett RR, Yeatts SD, Herrin AE, DeVane CL, Malcolm R, Janis GC, Markowitz JS (2007) *Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Clinical pharmacology and therapeutics 81 (3): 346–353
- Patrick KS, González MA, Straughn AB, Markowitz JS (2005a) *New methylphenidate formulations for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder*. Expert opinion on drug delivery 2 (1): 121–143

- Patrick KS, Williard RL, VanWert AL, Dowd JJ, Oatis JE, Jr, Middaugh LD (2005b) *Synthesis and pharmacology of ethylphenidate enantiomers: the human transesterification metabolite of methylphenidate and ethanol*. *Journal of medicinal chemistry* 48 (8): 2876–2881
- Pentikis HS, Connolly M, Markowitz JS, Hatch S (2005) *Sex-based differences in the pharmacokinetics of methylphenidate*: 25th Annual Meeting Science Proceedings: AACAP/CACAP , Bd. 32: 127
- Perez-Reyes M (1994) *The order of drug administration: its effects on the interaction between cocaine and ethanol*. *Life sciences* 55 (7): 541–550
- Perez-Reyes M, Jeffcoat AR (1992) *Ethanol/cocaine interaction: cocaine and cocaethylene plasma concentrations and their relationship to subjective and cardiovascular effects*. *Life sciences* 51 (8): 553–563
- Perez-Reyes M, White WR, McDonald SA, Hicks RE (1992) *Interaction between ethanol and dextroamphetamine: effects on psychomotor performance*. *Alcoholism, clinical and experimental research* 16 (1): 75–81
- Peters F. T., Hartung M., Herbold M., Schmitt G., Daldrup T., Musshof T. (2004) *Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen - Validierung*. *Toxichem&Krimtech* (71): 146–154
- Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, Bosron WF (1997) *Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin*. *The Journal of biological chemistry* 272 (23): 14769–14775
- Quinn D, Wigal S, Swanson J, Hirsch S, Ottolini Y, Dariani M, Roffman M, Zeldis J, Cooper T (2004) *Comparative pharmacodynamics and plasma concentrations of d-threo-methylphenidate hydrochloride after single doses of d-threo-methylphenidate hydrochloride and d,l-threo-methylphenidate hydrochloride in a double-blind, placebo-controlled, crossover laboratory school study in children with attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 43 (11): 1422–1429
- Ramos L, Bakhtiar R, Majumdar T, Hayes M, Tse F (1999) *Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry enantiomeric separation of dl-threo-methylphenidate, (Ritalin) using a macrocyclic antibiotic as the chiral selector*. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 13 (20): 2054–2062
- Redinbo MR, Bencharit S, Potter PM (2003) *Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery*. *Biochemical Society transactions* 31 Pt 3: 620–624
- Remschmidt H, Schmidt MH, Poustka F *Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO*. Huber, Bern (2001)
- Rometsch (1958) *Process of the conversion of stereoisomers*: U.S. Patent 2 , Bd. 838: 519
- Rosa-Neto P, Lou HC, Cumming P, Pryds O, Karrebaek H, Lunding J, Gjedde A (2005) *Methylphenidate-evoked changes in striatal dopamine correlate with inattention and impulsivity in adolescents with attention deficit hyperactivity disorder*. *NeuroImage* 25 (3): 868–876

- Sanghani SP, Quinney SK, Fredenburg TB, Davis WI, Murry DJ, Bosron WF (2004) *Hydrolysis of irinotecan and its oxidative metabolites, 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin and 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-amino]-carbonyloxycamptothecin, by human carboxylesterases CES1A1, CES2, and a newly expressed carboxylesterase isoenzyme, CES3*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals 32 (5): 505–511
- Santosh PJ, Taylor E (2000) *Stimulant drugs*. European child & adolescent psychiatry 9 Suppl 1: I27-43
- Satoh T, Hosokawa M (1998) *The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions*. Annual review of pharmacology and toxicology 38: 257–288
- Schubiner H, Tzelepis A, Milberger S, Lockhart N, Kruger M, Kelley BJ, Schoener EP (2000) *Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder among substance abusers*. The Journal of clinical psychiatry 61 (4): 244–251
- Schweitzer JB, Cummins TK, Kant CA (2001) *Attention-deficit/hyperactivity disorder*. The Medical clinics of North America 85 (3): 757–777
- Schweri MM, Skolnick P, Rafferty MF, Rice KC, Janowsky AJ, Paul SM (1985) *[3H]Threo-(+/-)-methylphenidate binding to 3,4-dihydroxyphenylethylamine uptake sites in corpus striatum: correlation with the stimulant properties of ritalinic acid esters*. Journal of neurochemistry 45 (4): 1062–1070
- Searight HR, Burke JM, Rottnek F (2000) *Adult ADHD: evaluation and treatment in family medicine*. American family physician 62 (9): 2077-86, 2091-2
- Seeman P, Madras BK (1998) *Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine*. Molecular psychiatry 3 (5): 386–396
- Shaywitz SE, Hunt RD, Jatlow P, Cohen DJ, Young JG, Pierce RN, Anderson GM, Shaywitz BA (1982) *Psychopharmacology of attention deficit disorder: pharmacokinetic, neuroendocrine, and behavioral measures following acute and chronic treatment with methylphenidate*. Pediatrics 69 (6): 688–694
- Shibata F, Takagi Y, Kitajima M, Kuroda T, Omura T (1993) *Molecular cloning and characterization of a human carboxylesterase gene*. Genomics 17 (1): 76–82
- Sofuoglu M, Kosten TR (2005) *Novel approaches to the treatment of cocaine addiction*. CNS drugs 19 (1): 13–25
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) *Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17 (3): 960–974
- Sonuga-Barke EJ, Sanchez D, Hatch S., Markowitz JS (2005) *Sex-differences in the clinical efficacy of MPH: Evidence from the COMACS study.*: 25th Annual Meeting Science Proceedings: AACAP/CACAP , Bd. 32: 127
- Sonuga-Barke EJ, Coghill D, Markowitz JS, Swanson JM, Vandenberghe M, Hatch SJ (2007) *Sex differences in the response of children with ADHD to once-daily formulations of methylphenidate*. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 46 (6): 701–710

- Spencer TJ, Biederman J, Madras BK, Faraone SV, Dougherty DD, Bonab AA, Fischman AJ (2005) *In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter*. *Biological psychiatry* 57 (11): 1293–1300
- Srinivas NR, Hubbard JW, Korchinski ED, Midha KK (1993) *Enantioselective pharmacokinetics of dl-threo-methylphenidate in humans*. *Pharmaceutical research* 10 (1): 14–21
- Steger J, Imhof K, Coutts E, Gundelfinger R, Steinhausen HC, Brandeis D (2001) *Attentional and neuromotor deficits in ADHD*. *Developmental medicine and child neurology* 43 (3): 172–179
- Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, Bosron WF (2004) *Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310 (2): 469–476
- Swanson J, Gupta S, Guinta D, Flynn D, Agler D, Lerner M, Williams L, Shoulson I, Wigal S (1999) *Acute tolerance to methylphenidate in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children*. *Clinical pharmacology and therapeutics* 66 (3): 295–305
- Swanson JM, Volkow ND (2003) *Serum and brain concentrations of methylphenidate: implications for use and abuse*. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27 (7): 615–621
- Szponry, Gorog (1961) *Investigations into the correlations between monoamine oxidase and other effects due to methylphenidate and its isomers*. *Biochemical pharmacology* (8): 263–268
- Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ (2000) *Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen*. *Brain research* 881 (1): 69–72
- Taylor E (1999) *Development of clinical services for attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Archives of general psychiatry* 56 (12): 1097–1099
- Thapar A, Holmes J, Poulton K, Harrington R (1999) *Genetic basis of attention deficit and hyperactivity*. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 174: 105–111
- Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D (2003) *Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring*. *The American journal of psychiatry* 160 (11): 1985–1989
- Toennes SW, Kauert GF (2001) *Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse*. *Journal of analytical toxicology* 25 (5): 339–343
- UCB (2006) *Equasym 5/10/20 mg Tabletten*. In: Rote Liste Service GmbH (Hg.): Fachinfo-Service
- Vaidya CJ, Austin G, Kirkorian G, Ridlehuber HW, Desmond JE, Glover GH, Gabrieli JD (1998) *Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24): 14494–14499

- Vles JSH, Feron FJM, Hendriksen JGM, Jolles J, van Kroonenburgh MJPG, Weber WEJ (2003) *Methylphenidate down-regulates the dopamine receptor and transporter system in children with attention deficit hyperkinetic disorder (ADHD)*. *Neuropediatrics* 34 (2): 77–80
- Volkow ND, Ding YS, Wang GL, Logan J, Gatley JS, Dewey S., Ashby C., Lieberman J, Hitzemann R, Wolf AP (1995) *Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in human brain*. *Archives of general psychiatry* (52): 456–463
- Volkow ND, Gatley SJ, Fowler JS, Wang GJ, Swanson J (2000) *Serotonin and the therapeutic effects of ritalin*. *Science (New York, N.Y.)* 288 (5463): 11
- Volkow ND, Wang G, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, Ding Y, Gatley SJ, Gifford A, Franceschi D (2001) *Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (2): RC121
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N (1998) *Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate*. *The American journal of psychiatry* 155 (10): 1325–1331
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Ding YS, Gatley SJ (2002) *Role of dopamine in the therapeutic and reinforcing effects of methylphenidate in humans: results from imaging studies*. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 12 (6): 557–566
- Volkow ND, Insel TR (2003) *What are the long-term effects of methylphenidate treatment?* *Biological psychiatry* 54 (12): 1307–1309
- Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G., Ding Y., Gatley S.J. (2002) *Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies*. *Journal of attention disorders* 6 (1): 31–43
- Wargin W, Patrick K, Kilts C, Gualtieri CT, Ellington K, Mueller RA, Kraemer G, Breese GR (1983) *Pharmacokinetics of methylphenidate in man, rat and monkey*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 226 (2): 382–386
- Wilens TE. (2008) *Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder*. *Journal of clinical pharmacology* 28 (3 Suppl 2): 46–53
- Williard RL, Middaugh LD, Zhu HB, Patrick KS (2007) *Methylphenidate and its ethanol transesterification metabolite ethylphenidate: brain disposition, monoamine transporters and motor activity*. *Behavioural pharmacology* 18 (1): 39–51
- Wolraich ML, Doffing MA (2004) *Pharmacokinetic considerations in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder with methylphenidate*. *CNS drugs* 18 (4): 243–250
- Zhang K, Davids E, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2002) *Effects of dopamine D4 receptor-selective antagonists on motor hyperactivity in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions*. *Psychopharmacology* 161 (1): 100–106
- Zhu H, Wang J, DeVane CL, Williard RL, Donovan JL, Middaugh LD, Gibson BB, Patrick KS, Markowitz JS (2006) *The role of the polymorphic efflux transporter P-glycoprotein on the brain accumulation of d-methylphenidate and d-amphetamine*. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34 (7): 1116–1121

Anhang

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. G. Kauert, Leiter des Instituts für Forensische Toxikologie in Frankfurt, für die Themenstellung, die stete Unterstützung und das Interesse am Verlauf der Untersuchungen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. S. Tönnies danke ich für die ausgezeichnete Betreuung, die geduldige Einweisung in die analytische Methode und in die Auswertungssoftware, ebenso wie für die zahlreichen Hinweise und Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Forensische Toxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe während des Untersuchungsverlaufs. Werner Pogoda danke ich für die stete Präsenz und Hilfe bei jeglicher Fragestellung, Cora Wunder für die Unterstützung während des gesamten Verlaufs der Untersuchungen, vor allem aber während des Praktischen Jahrs sowie für die dabei entstandene Freundschaft. Andrea Wagner danke ich für die Hilfe und Organisation des Einsatzes am Gilson, Daniel Klinger für die Hilfe bei jeglicher analytischen bzw. TOF-technischen Frage.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung und vor allem Geduld ich diese Arbeit wahrscheinlich nie angefangen bzw. zu Ende gebracht hätte.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die im Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Effekte von Alkohol auf die Pharmakokinetik von Methylphenidat bei kombinierter Aufnahme“

im *Zentrum der Rechtsmedizin, Institut für Forensische Toxikologie*
unter Betreuung und Anleitung von *Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. G. Kauert*
mit Unterstützung durch *Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. S. Tönnes*

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation eingereicht.

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

- Koehm M, Kauert GF, Toennes SW *Influence of Ethanol on the Pharmacokinetics of Methylphenidate's Metabolites Ritalinic Acid and Ethylphenidate* (2009), *Arzneimittelforschung (Drug research)* (in press)
- Köhm M, Kauert GF, Tönnes SW *Effekte von Alkohol auf die Pharmakokinetik von Methylphenidat bei kombinierter Aufnahme*, Vortrag V53 auf der 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, September 2008, Med. Fakultät der TU Dresden, sowie als Abstract in der Zeitschrift *Rechtsmedizin*, Band 18, Heft 4, August 2008, Springer Verlag

Frankfurt am Main, d. 25.10.2009

Michaela Köhm

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michaela Köhm
Geburtsdatum	23.02.1982
Geburtsort	Frankfurt am Main

Schulbildung

1988-1992	Albrecht-Dürer Grundschule, Frankfurt Sossenheim
1992-1998	Helene-Lange Gymnasium, Frankfurt Höchst
1998-2001	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt Höchst

Hochschulbildung

2001-2008	Studium der Humanmedizin an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main
12.09.2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.06.2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.06.2008	Approbation als Ärztin